

文章编号 :1009 - 038X(2003)01 - 0096 - 03

洛伐他汀转化菌株的筛选及发酵条件

于 海 , 郭秀梅 , 方慧英 , 诸葛健

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘 要 :利用薄层层析法和 HPLC 法对 300 株放线菌进行筛选 ,结果发现一株菌 ST48 对洛伐他汀有转化作用 .研究其菌龄、菌体干重、分批加入底物及底物诱导等条件对转化率的影响表明 ,菌株 ST48 在预培养基中培养 48 h 后接入转化培养基(5% 接种量) ,此时菌体量最高 ,加入 0.3 mL 底物后 ,继续培养 48 h 转化率最高(20.78%) .一次性加入底物和分批加入底物的转化率分别为 20.02% 和 20.08% ,并且这种转化作用不需要底物诱导 .

关键词 :洛伐他汀 ;微生物转化 ;菌株筛选 ;发酵条件

中图分类号 :Q 815

文献标识码 :A

Screening of Actinomycetes and Studying on Conditions for Bioconversion of Lovastatin

YU Hai , GUO Xiu-mei , FANG Hui-ying , ZHUGE Jian

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology , Ministry of Education , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : About 300 strains of actinomycetes were screened for their capacity to convert lovastatin by thin-layer chromatography and HPLC. Strain ST48 was found to transform lovastatin effectively. The effects of the age of the culture , dry weight of biomass , and intermittent additions of lovastatin on bioconversion were studied. Strain ST48 was preinoculated for 48 h , 1 mL of the preinoculation media was incubated in biotransformation media. After 48 h of growth , 0.3 mL of calibrated lovastatin was added and incubation was continued for another 48 h. The highest conversion rate of 20.78% was achieved. And when lovastatin was added at one time or intermittently , the conversion rates were 20.02% and 20.08% , respectively. The bioconversion does not require induction with lovastatin.

Key words : lovastatin ; bioconversion ; screening ; fermentive conditions

洛伐他汀(Lovastatin ,又名乐瓦停 ,美降之)是一种羟甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂 ,它主要是真菌的次生代谢产物 .最初 ,远藤章从 *Penicillium citrinum* 的发酵液中提取出洛伐他汀 ,之后 ,Merck 公司在 20 世纪初从美国的土壤中分离得到的 *Aspergillus terreus* 也产生洛伐他汀 ,发现它

能明显降低血清中总胆固醇的含量和原发性高胆固醇血症病人的 LDL-胆固醇 ,而且具有安全性 ,1987 年获得 FDA 生产批准^[1] .

微生物对洛伐他汀的转化是在 1983 年由日本学者^[2]首次提出的 ,他们在进行美伐他汀转化成普伐他汀时 ,偶然发现 *Mucor hiemalis* SANK363672

收稿日期 2002 - 08 - 06 ; 修回日期 2002 - 10 - 23 .

作者简介 :于海(1973 -) ,男 ,吉林梨树人 ,发酵工程博士研究生 ,讲师 .

万方数据

对洛伐他汀也具有转化作用.1990 年,Merck 公司的研究人员发现 *Actinomycete* MA 6474 ATCC53828 在适合的条件下,对洛伐他汀的钠盐也具有转化作用,可生成 6-羟甲基-洛伐他汀和 8-酰基洛伐他汀,并且后者对 HMG-CoA 还原酶的抑制效果好于洛伐他汀,并申请了欧洲专利(EP381478).1997 年,Antonia Jekke^[3]发现 *Absidia coerulea* IDR705 (IDR: Institute for Drug Research Ltd., Budapest, Hungary)对洛伐他汀有转化作用,并且二者对 HMG-CoA 还原酶的抑制效果同洛伐他汀相似.国内对洛伐他汀的生物转化研究很少,作者从保藏的放线菌中筛选出对洛伐他汀有转化作用的菌株,并对发酵条件进行了研究.

1 材料与方法

1.1 试剂

洛伐他汀:Hisun PHARMA Co, Ltd 产品;甲醇:色谱级,淮阴汉邦科技有限公司产品;水解干酪素:华美公司分装;超纯水:WATER PRO PS 制备;微孔滤膜:上海亚东核级树脂有限公司产品;其余试剂均为分析纯.

1.2 菌株来源

江南大学工业微生物研究中心保藏的放线菌.

1.3 高氏一号合成培养基

组分(g/L):KNO₃ 1,无水 K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01,可溶性淀粉 20,琼脂 20. pH 7.2~7.4.

1.4 转化培养基

组分(g/L):葡萄糖 10,水解干酪素 2,牛肉膏 1,玉米浆 3. pH 7.0.

1.5 实验方法

1.5.1 初筛方法 将冷冻保藏的菌株接入高氏合成一号斜面培养基,在 28℃ 培养一周.再接入高氏合成一号液体培养基(试管装 5 mL),28℃ 静置培养 3 d.之后按 5% 的接种量接于转化培养基(试管装 5 mL).培养 2 d(28℃,200 r/min)后,加入 0.1 mL 洛伐他汀溶液(100 mg 洛伐他汀溶于 1.5 mL 二甲基酰胺和 8.5 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液),同时做对照.继续培养 2 d(28℃,200 r/min).结束转化,用稀盐酸调至培养液 pH 3,加入 5 mL 乙酸乙酯萃取,无水亚硫酸氢钠脱水,常温下浓缩,进行薄层层析.展开剂为丙酮与正己烷的体积比为 1:1,紫外分析仪观察.

1.5.2 薄层层析板的制备 参照文献[4].

1.5.3 复筛方法 通过初筛,对洛伐他汀有转化

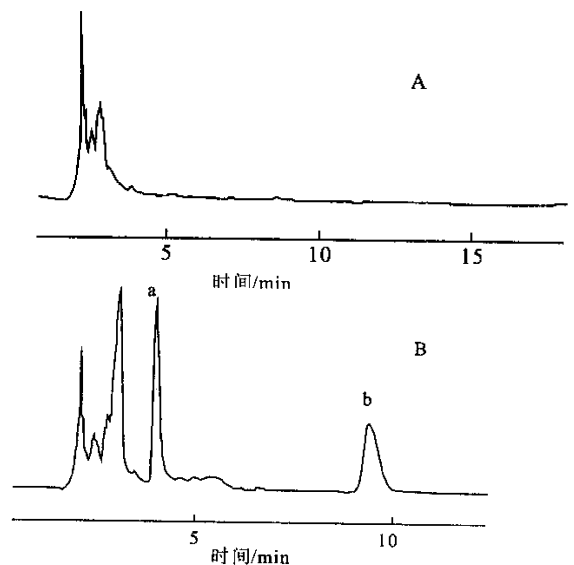
作用的菌株,挑入高氏合成一号液体培养基中,摇床上培养 2 d(250 mL 三角瓶中装入培养基 20 mL,28℃,200 r/min).接于转化培养基(接种量 5%).同样条件继续培养 2 d,加入 0.3 mL 洛伐他汀溶液,同时做对照.继续培养 2 d,离心去菌丝体,上清液用甲醇稀释一倍,微孔膜过滤,高压液相色谱分析.根据出峰情况确定具有转化能力的菌株.

1.5.4 HPLC 条件 色谱柱:Alltima ODS-2(5 μ, 250 mm×4.6 mm);流动相为甲醇-0.1%磷酸;体积流量为 1 mL/min;柱温为室温;进样量为 20 μL,检测波长为 237 nm.

2 结果与分析

2.1 发酵液的 HPLC 分析

通过对 300 株放线菌进行筛选,在薄层层析中有新点出现时,对该菌株进行 HPLC 复筛,结果发现有一株菌 ST48 对洛伐他汀有转化作用(见图 1).通过 HPLC-MS 分析发现转化产物的相对分子质量比洛伐他汀高 16,在薄层层析中有新点出现,但在 HPLC 中没有检测到.这是因为 HPLC 检测的是在特定波长有吸收峰的物质,而薄层层析检测的是对紫外光有吸收的物质,所以会出现上述情况.



A. 未加入洛伐他汀的发酵液 B. 加入洛伐他汀的发酵液;
a. 产物峰 b. 洛伐他汀峰

图 1 菌株 ST48 发酵液的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC spectrum of broth

2.2 发酵条件对 ST48 菌株的影响

2.2.1 不同菌龄对转化率的影响 菌株 ST48 先在高氏合成 1 号液体培养基上培养 2 d,之后接入转化培养基(接种量 5%)培养,分别在培养的第 2 天、第 3 天、第 4 天加入 0.3 mL 洛伐他汀溶液,再

培养 2 d 后 ,离心 ,菌体称干重 ,上清液用甲醇稀释一倍 ,微孔滤膜过滤后高压液相色谱分析 .结果发现 ,在第 3 天加入底物时转化率最高 ,此时的菌体量也最大 .这表明菌株 ST48 对洛伐他汀的转化率与菌体量呈正比 (见表 1) .

表 1 菌龄与菌体量对转化率的影响

Tab.1 The effect of culture age and biomass on bioconversion

菌龄/h	菌体量(干重)(g/mL)	转化率/%
24	0.0018	13.42
48	0.0051	20.78
72	0.0041	16.43

2.2.2 底物对 ST48 菌株转化洛伐他汀的影响
菌株 ST48 先在高氏合成 1 号液体培养基上培养 2 d ,在接入转化培养基之前在转化培养基中加入 0.05 mL 洛伐他汀溶液 ,之后接入菌体 .培养 2 d 后再加入 0.25 mL 洛伐他汀溶液 ,同时做对照实验 (在转化培养 2 d 后加入 0.3 mL 洛伐他汀溶液) .结果发现 ,底物诱导可提高转化率 ,但提高程度很小 (底物诱导的转化率为 24.06% ,非底物诱导的转化率为 21.63%) ,说明菌株 ST48 对洛伐他汀的转化作用不需底物诱导 .

2.2.3 底物对转化率的影响 菌株先在高氏合成 1 号液体培养基上培养 2 d 后 ,接入转化培养基中培养 .培养 24 h 后加入 0.1 mL 洛伐他汀溶液 ,之后每隔 12 h 加一次 ,共加入 0.3 mL 洛伐他汀溶液 .再

培养 2 d 后 ,离心去菌丝体 ,上清液用甲醇稀释一倍 ,微孔滤膜过滤 ,同时作平行实验 .高压液相色谱分析 .结果表明 ,底物分批加入对转化影响不是很大 ,对照的转化率为 20.02% ,分批加入的转化率为 20.08% .

3 结 论

1)微生物转化作用是在微生物产生的酶作用下完成的 .酶的产量与菌体量有一定的关系 ,一般情况下菌体量增加 ,酶的产量也增加^[5] ;本试验也证明了这一点 ,在第 3 天时菌体量最高 ,这时加入底物则转化率也最高 .

2)不同的菌株对美伐他汀的转化也不一样 ,如 *Streptomyces carbophilus* 需要底物诱导^[6,7] ,而 *Actinomadura sp.* 对美伐他汀的转化则不需要底物诱导^[8] .作者筛选的菌株 ST48 为链霉菌 ,它对洛伐他汀的转化则不需要底物诱导 .

3)在进行微生物转化试验时 ,一般情况下需要一定的溶剂将底物先溶解 ,之后加入发酵液中进行转化 ,而溶剂和底物对微生物来说也具有毒害作用^[6] ,所以一次性向发酵液中加入底物和溶剂的量对转化率有直接的影响 .菌株 ST48 在上述培养条件下 ,0.3 mL 的洛伐他汀溶液分批或一次性加入对转化率没有影响 ,说明菌株 ST48 在此条件下对 0.3 mL 的洛伐他汀具有耐受性或没有达到它的耐受性 ,这需要进一步研究 .

参考文献：

[1] Akira Endo. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitor[J]. *J Lipid Res* ,1992 , 33 : 1569 – 1582.
[2] N Serizawa , S Serizawa , K Nakagawa , *et al.* Microbial hydroxylation of ML-236B (compactin) and monacolin K (MB-530B) [J]. *J Antibiotics* ,1983 , 36 : 604 – 607.
[3] A Jekkel , A Konya , E Ilkoy , *et al.* Microbial conversion of mevinolin[J]. *J Antibiotics* , 1997 , 50(9) : 750 – 754.
[4] 翟永信 ,陆冰真 .薄层层析法在食品分析中的应用[M]. 北京 : 北京大学出版社 ,1991. 12 – 49.
[5] Arnold L Demain , Julian Davies , Ronald Atlas , *et al.* Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (Second Edition) [M]. Washington D C : ASM Press ,1999. 165 – 180.
[6] T Matsuoka , S Miyakoshi , K Tanzawa , *et al.* Purification and characterization of cytochrome P-450_{scs} from *Streptomyces carbophilus*[J]. *Eur J Biochem* ,1989 , 184 : 707 – 713.
[7] N Serizawa , T Matsuoka. A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin , a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase[J]. *Biochim Biophys Acta* , 1991 , 1084 : 35 – 40.
[8] Yulin Peng , Arnold L Demain. Bioconversion of compactin to pravastatin by *Actinomadura sp.* ATCC 55678[J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic* ,2000 , 10 : 151 – 156.

(责任编辑 李春丽)