

链霉菌 Z314 的分类鉴定及其转化产物普伐他汀的纯化研究

张蕾, 张金涛, 杨文博, 白钢*

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 :从土壤中筛选得到 1 株可转化美伐他汀(compactin)生产普伐他汀(pravastatin)的放线菌 Z314, 根据形态观察、培养特征、生理生化鉴定以及 16S rRNA 序列分析, 初步判定该菌株为链霉菌属中的黄质产色链霉菌(*Streptomyces xanthochromogenes*)。经发酵条件优化, 该菌株转化美伐他汀生产普伐他汀的产量可达 1580mg/L, 转化率为 49.45%。发酵液经中空纤维素柱过滤、大孔树脂吸附和 HPLC 纯化, 普伐他汀的回收率为 45.06%, 纯度为 99.02%, 为进一步产业化开发奠定了基础。

关键词 :普伐他汀; 黄质产色链霉菌; 分类鉴定; 分离纯化

中图分类号: Q936; Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2008)01-0033-05

普伐他汀是胆固醇生物合成途径中的限速酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMG-CoA reductase)的抑制剂, 最初作为美伐他汀在尿液中的微量代谢活性组分而被发现^[1]。由于普伐他汀能显著降低人体血浆中胆固醇水平, 并且有很强的器官组织选择性和较高的安全性, 目前已成为治疗原发性高胆固醇血症的一线首选药物^[2, 3]。虽然普伐他汀可通过化学合成的手段得到^[4], 但化学合成的成本较高且产物中存在立体异构体, 不利于大规模生产。因此利用马杜拉菌属(*Actinomadura* sp.)^[5, 6]、链霉菌属(*Streptomyces* sp.)^[7-9]、以及小四孢菌属(*Microtetraspora* sp.)^[10]中的少数放线菌转化美伐他汀来生产普伐他汀一直为关注的重点。然而前体美伐他汀对菌体存在毒性, 浓度过高会抑制其生长导致菌体的死亡^[11], 因此筛选美伐他汀高耐受性和高转化率的菌株, 提高普伐他汀产量就显得十分重要。

利用本实验室建立的放线菌库^[12], 从中获得了一株可将美伐他汀转化为普伐他汀的放线菌 Z314, 经形态观察, 生理生化特征检测以及 16S rRNA 相似性比较, 初步判定为黄质产色链霉菌(*Streptomyces xanthochromogenes*)。本研究对该菌株生产普伐他汀的转化条件和纯化工艺进行了研究, 为进一步产业化奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 :黄质产色链霉菌(*Streptomyces xanthochromogenes* Z314), 本实验室从采自云南的表层土壤中分离并保存。

1.1.2 培养基 :①斜面培养基成分: 每升含葡萄糖 20g、聚蛋白胨 5g、酵母粉 2g、NaCl 2g、琼脂粉 15g、pH 7.5; ②种子培养基成分: 每升含葡萄糖 25g、蛋白胨 5g、酵母粉 2g、NaCl 2g、CaCO₃ 2g、甘油 2mL、pH 7.5; ③发酵培养基成分: 每升含葡萄糖 35g、蛋白胨 5g、酵母粉 2g、NaCl 2g、CaCO₃ 2g、甘油 1mL、pH 7.5, 100kPa, 灭菌 20min。所用试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要试剂和仪器 :Taq DNA 聚合酶和 dNTP 购自北京鼎国生物工程公司; PCR 引物由北京三博远志生物有限责任公司合成; 美伐他汀购自浙江瑞邦药业有限公司; 普伐他汀钠购自上海施贵宝制药有限公司。菌株形态观察使用美国 FEI 公司 ESEM Quanta 200 扫描电子显微镜; PCR 扩增使用德国 Biometra 公司的 T-gradient PCR thermocycler; 普伐他汀纯化使用天津膜天膜工程技术有限公司的 J60S-503 型外压型中空纤维素柱; 含量测定采用日

*通讯作者。Tel/Fax: +86-22-23508371; E-mail: gangbai@nankai.edu.cn

作者简介: 张蕾 (1983-), 女, 北京人, 硕士研究生, 从事放线菌分类鉴定及发酵研究。E-mail: leihengqin@mail.nankai.edu.cn

收稿日期: 2007-05-16; 修回日期: 2007-07-19

本 Shimadzu 公司的 LC-10AT 高效液相色谱(HPLC)系统;纯化后样品使用美国 Thermo Finnigan 公司 LCQ 型质谱仪进行验证。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 形态特征:采用高氏 1 号平板培养基进行埋片培养, 28℃ 培养 7d。取埋片用 2.5%戊二醛固定 12h 后, 用 pH 7.2 的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 转入 1%锇酸溶液中固定 1h, 再用上述缓冲液漂洗 3 次, 分别经 50%至 100%乙醇梯度脱水, 置醋酸异戊酯中 20min, 取出, 临界点干燥, 喷金后于扫描电子显微镜下观察菌体形态特征。

1.2.2 培养特征和生理生化特性:依据文献[13]和[14]中推荐的常用微生物鉴定方法观察并记录菌株的培养特征与生理生化特性。

1.2.3 细胞壁氨基酸分析:采用 Hasegawa 等^[15] 和王平^[16]改进的快速薄层层析法(Thin layer chromatography, TLC)进行细胞壁氨基酸型分析。

1.2.4 16S rRNA 序列分析:采用微波快速提取法提取放线菌 Z314 基因组 DNA^[17], 并以此为模版 PCR 扩增 16S rRNA 序列^[12]。将所测得的序列与 GenBank 数据库中的 16S rRNA 序列进行相似性比较分析, 并利用 DNAMAN 5.0 软件绘制系统发育进化树。

1.3 发酵与转化条件

挑取在斜面培养基上 28℃ 培养 7d 的放线菌 Z314 菌落, 接种于摇瓶种子培养基培养 1d, 以 7% 的接种量再转接于 50mL 发酵培养基中, 28℃ 培养 1d 后, 每天加入一定量美伐他汀前体(33mg/mL), 连续加入 3d。

1.4 普伐他汀的分离纯化

将发酵液于 9800×g 离心 10min, 取上清液经中空纤维素柱(45cm×39cm)过滤后, 流出液以大孔树脂 HP20(1.2cm×22cm)吸附, 以 50%乙醇洗脱, 采用高效液相色谱法(HPLC)检测流出液中普伐他汀的含量。合并洗脱峰, 浓缩后采用半制备高效液相色谱纯化, 色谱柱: Kromasil C₁₈ (10μm, 250mm×10 mm); 进样量: 200 μL; 流动相: 甲醇 - 碳酸铵(0.02mol/L)(53 : 47); 流速: 2 mL/min; 检测波长: 236nm; 收集普伐他汀的流出峰, 并进行进一步鉴定。

1.5 HPLC 检测^[18]

色谱柱: Kromasil C₁₈ (5μm, 250mm×4.6 mm); 进样量: 20 μL; 流动相: 甲醇 - 水 - 三乙胺 - 冰乙酸(70 : 30 : 0.1 : 0.1); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长:

236 nm; 柱温: 25℃。

1.6 质谱鉴定

质谱条件: 电喷雾离子化源(ESI), 负离子检测模式; 壳气流速: 21arb; 毛细管温度: 236℃, 毛细管电压: 4.17V; 扫描范围: m/z 200 ~ 800。

2 结果

2.1 菌种鉴定

2.1.1 形态特征:Z314 菌株在高氏 1 号培养基上气生菌丝发达。显微镜下观察可见, 孢子丝短而直; 扫描电镜下观察气生菌丝体凝聚形成孢子链, 孢子卵圆形, 成串生长, 表面光滑无刺(图 1)。

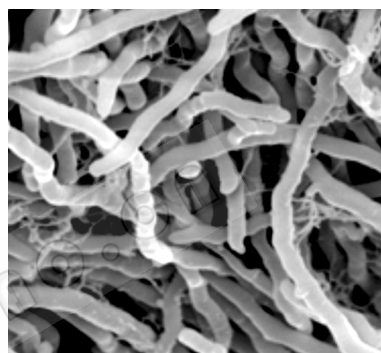


图 1 Z314 的扫描电镜照片(20000×)

Fig.1 Z314 in scanning electron microscope (20000×).

2.1.2 培养特征: Z314 菌株在高氏合成 1 号琼脂中气生菌丝蚌肉白色, 基内菌丝豆汁黄色, 产生黄色色素; 马铃薯浸汁琼脂中气生菌丝黑色, 基内菌丝黑色, 产生黄昏灰色色素; 淀粉琼脂中气生菌丝白色, 基内菌丝象牙黄色, 产生杏仁黄色色素; 察氏琼脂中气生菌丝玳瑁黄色, 基内菌丝瓜瓢黄色, 产生浅芒果棕色色素; 葡萄糖天门冬素琼脂中气生菌丝白色, 基内菌丝黄色, 产生淡萤黄色色素。

2.1.3 生理生化特性:Z314 菌株能使淀粉水解、明胶液化, 产生硫化氢, 不胨化和凝固牛奶, 不水解纤维素; 可利用木糖、葡萄糖、半乳糖、蔗糖、果糖、甘露醇作为碳源生长, 不利用鼠李糖、山梨醇、肌醇。

2.1.4 细胞壁氨基酸分析:Z314 菌株细胞壁中含有 L-DAP(L 型二氨基庚二酸)和甘氨酸, 属于 I 型细胞壁, 符合链霉菌属(*Streptomyces*)的化学分类特性。

2.1.5 16S rRNA 全序列的相似性比较和系统发育分析:Z314 菌株的 16S rRNA 核酸序列全长为 1465bp, 提交 GenBank(登记号: EF397939)并与数据库中的相关种进行比较, 构建以 16S rRNA 全序列为基础的系统发育树。如图 2 所示, Z314 菌株与链霉菌属(*Streptomyces*)同源性都很高, 其中与黄质产

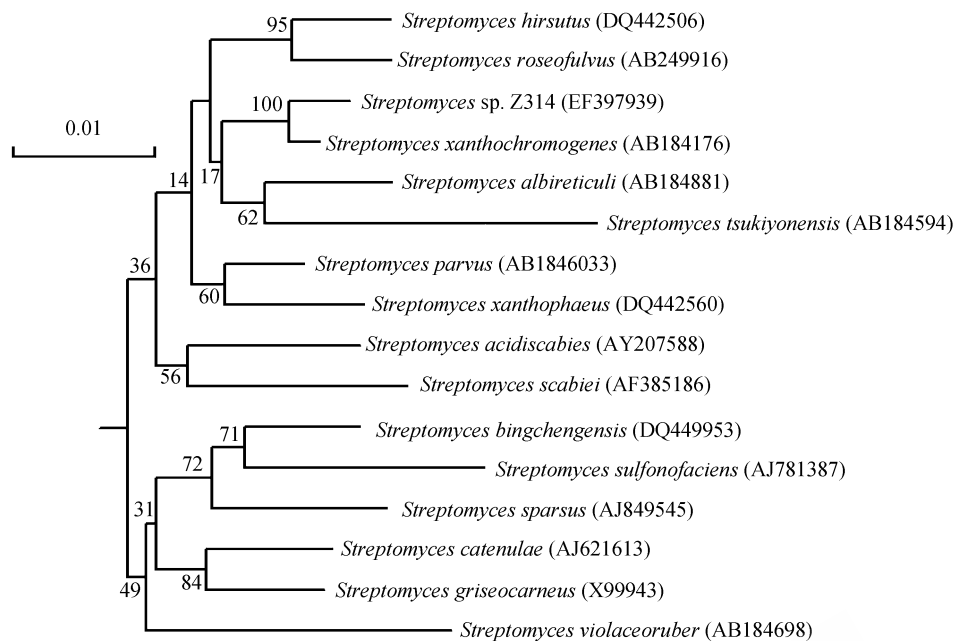


图 2 依据 16S rRNA 序列构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree showing the relationships among reference strains and experimental strain base on the 16S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar: 1 % sequence divergence.

色链霉菌 (*Streptomyces xanthochromogenes*) 具有 99.05% 的相似性, 而非脱磷链霉菌 (*Streptomyces adepospholyticus*) 和密执安链霉菌 (*Streptomyces michiganensis*) 的相似性分别为 98.23% 和 98.58%。结合形态学特征、培养特征和生理生化特征分析, 将该菌株的分类地位初步确定为链霉菌属黄质产色链霉菌。

2.2 放线菌 Z314 的发酵及转化条件研究

美伐他汀前体是菌体生长的抑制剂, 其加入量及加入方式对转化率和产量有较大影响。采用上述 1.3 方法培养 Z314 菌株 1d 后, 按表 1 所列方式加入前体, 发酵结束后检测发酵液中普伐他汀含量。如表 1 所示, 1d 加入 1 次前体, 每次加入 1mL 时, 美伐他汀转化为普伐他汀的转化率和普伐他汀的生成浓度较高, 为最佳前体加入方式和加入量。以该条件连续进行 5 次转化试验, 其平均转化率为 49.45% (cv 2.2%), 平均浓度为 1.58mg/mL (cv 2.3%)。

表 1 美伐他汀加入量及加入方式对转化率及产量的影响
Table 1 Effect of adding manner and amount of compactin toward conversion rate and yield of pravastatin

Adding manner	Amount of compactin /mL	Translation rate /%	Yield of pravastatin / (mg/mL)
twice/d	1	27.49	1.84
once/d	1	48.31	1.56
once/d	0.5	43.62	0.73
once/2d	0.5	48.40	0.54

2.3 普伐他汀的分离纯化

取发酵液 200mL, 离心取上清液经中空纤维素柱过滤后, 流出液使用大孔树脂 HP20 吸附, 并以乙醇洗脱。合并活性洗脱峰浓缩后进一步采用半制备高效液相色谱进行纯化, 并检测各步中普伐他汀的含量 (图 3)。如表 2 所示, 经三步分离, 普伐他汀的纯化倍数为 12.29 倍, 收率为 45.06%, 纯度达到 99.02%。纯化产物的质谱图 (图 4), 分别给出了质荷比 (m/z) 为 423.54 ($[M-1]^-$) 的分子离子峰和 459.34 ($[M+Cl]^-$) 的分子离子峰, 表明其分子量为 424.54, 与普伐他汀标准品相同。

3 讨论

普伐他汀自发现以来, 国内外学者对其生产工艺及转化菌种进行了大量研究, 先后证明链霉菌属、小四孢菌属、马杜拉菌属中的少数放线菌具有转化美伐他汀生成普伐他汀的能力, 但这些转化菌对美伐他汀的耐受性及转化能力均不能令人满意, 因此寻找新的更有效的转化菌种一直是工作的重点。近年来, 关于链霉菌属放线菌转化美伐他汀生成普伐他汀的机制已有报道, 该过程是由美伐他汀诱导菌体产生的细胞色素 P450 单加氧酶催化完成, 此酶在转化过程中接受氧化还原电子传递体系传递的 H 原子并与底物美伐他汀结合活化氧分子, 在 6 位羟化美伐他汀生成普伐他汀。Tatsuji Matsuoka^[9]

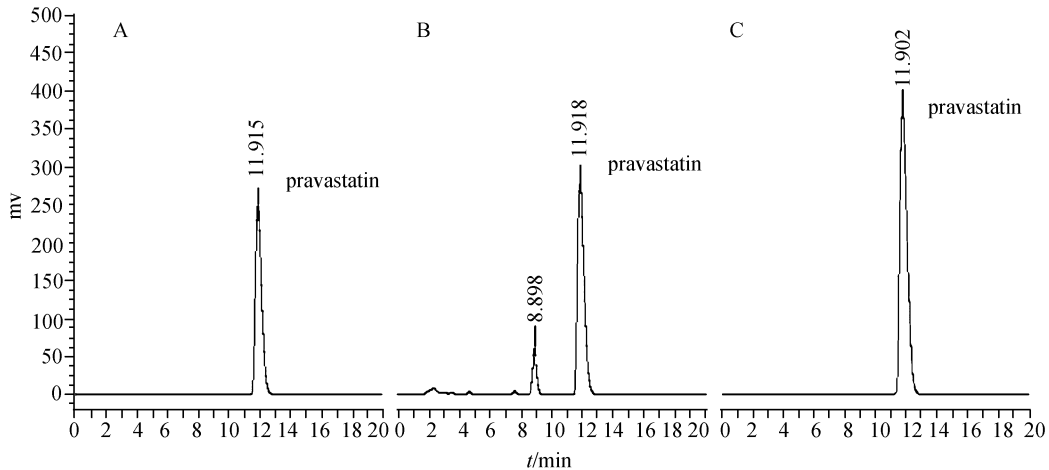


图3 普伐他汀的HPLC分析

Fig.3 HPLC analysis of pravastatin. A: pravastatin standard; B: HP20 purified product; C: HPLC purified product.

表2 发酵液中普伐他汀的纯化

Table 2 Purification of pravastatin from culture supernatant

Purification step	Total substance/(mg/mL)	Pravastatin/(mg/mL)	Recovery / %	Purity / %	Purification factor
Supernatant	20.18	1.62	/	8.03	/
Fibrin column	13.48	1.60	98.76	11.87	1.48
HP20	2.42	1.36	83.95	56.36	7.02
HPLC	0.74	0.73	45.06	99.02	12.29

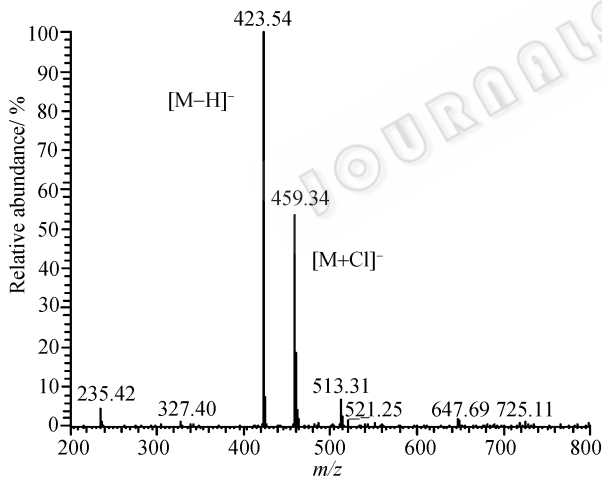


图4 普伐他汀的质谱分析

Fig.4 Mass spectrometry analysis of pravastatin.

和Joo-Woong Park等^[8]分别从*Streptomyces carbo-*
*philus*和*Streptomyces* sp.Y-110 两株美伐他汀转化菌
中成功地分离纯化出了细胞色素P450 单加氧酶, 并
通过对其蛋白及基因序列的研究确定它们为细胞色
素P450 家族的新成员。

本实验以从土壤中分离得到的放线菌Z314 作
为出发菌株, 首先确认了其具有转化美伐他汀生成
普伐他汀的能力, 并根据形态观察、培养特征、生

理生化鉴定以及16S rRNA序列分析, 初步确定该菌
株为链霉菌属黄质产色链霉菌, 为国内外首次报
道。由于美伐他汀是菌体生长的抑制剂, 单次加入
过量会引起菌体裂解, 导致转化率降低^[11], 因此本
文使用分批加入前体的方法以提高其转化率, 经转
化条件优化菌株Z314 美伐他汀的转化率为49.45%,
普伐他汀产量为1580mg/L, 高于文献报道水平
375~1095mg/L^[7-10]。研究发现, 未转化的前体在发酵
过程中基本被菌体所利用, 这也为后续普伐他汀的
纯化工作提供了便利。

目前, 国内外他汀类药物纯化工艺相对成熟,
主要采用疏水树脂吸附和色谱分离^[18]的方法。Rok
Grahek等^[19]人使用反相置换色谱对纯度在
85%~88%的普伐他汀粗品进行纯化, 最终得到了纯
度在99.5%以上的纯物质。此外, 专利03141475.3
中也提到大孔树脂HP20 可被用于普伐他汀的分离
纯化^[20]。结合上述方法, 本实验采用大孔树脂HP20
吸附和半制备高效液相色谱分离的串联方法用于普
伐他汀的纯化, 并于分离之前, 使用截流分子量为
6000的中空纤维素柱除去发酵液中的杂蛋白和多糖
等生物大分子, 减少对树脂的影响, 提高其吸附能
力。经三步分离处理, 普伐他汀的回收率为45.06%,
纯度为99.02%, 为进一步大规模生产提供了保障。

参 考 文 献

- [1] Serizawa N, Nakagawa K, Hamano K, *et al.* Microbial hydroxylation of ML-236B and Monacolin K. *Antibiot*, 1983, 36: 604–607.
- [2] Serizawa N, Matsuoka T. 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. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1084: 35–40.
- [3] Chen CH, Hu HY, Cho YC, *et al.* Screening of compactin-resistant microorganisms of converting compactin to pravastatin. *Current Microbiology*, 2006, 53: 108–112.
- [4] Park JW, Lee JK, Kwon TJ, *et al.* Bioconversion of compactin into pravastatin by *Streptomyces* sp.. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 1827–1831.
- [5] Yashphe J, Davis J, Peng Y, *et al.* New microorganisms which convert compactin to pravastatin. *Actinomycetologica*, 1997, 11: 20–25.
- [6] Peng Y, Demain AL. A new hydroxylase system in *Actinomyces* sp. cell converting compactin to pravastatin. *J Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1998, 20: 373–375.
- [7] 罗荣荣, 孙万里, 印培民. 微生物转化美伐他汀为普伐他汀的研究. *江西科学(Jiangxi Science)*, 2004, 22(2): 87–90.
- [8] Park JW, Lee JK, Kwon TJ, *et al.* Purification and characterization of a cytochrome P-450 from pravastatin-producing *Streptomyces* sp. Y-110. *Microbiol. Biotechnol*, 2001, 11(6): 1011–1017.
- [9] Matsuoka T, Miyakoshi S, Tanzawa K, *et al.* Purification and characterization of cytochrome P-450_{sca} from *Streptomyces carbophilus*. *Biochem*, 1989, 184: 707–713.
- [10] 周鹏, 范贵增. *Microtetraspora* sp. 转化美伐他汀至普伐他汀发酵条件的研究. *江西科学(Jiangxi Science)*, 2003, 38(6): 406–408.
- [11] Hosobuchi M, Kurosawa K, Yoshikawa H. Application of computer to monitoring and control of fermentation process: Microbial conversion of ML-236B Na to pravastatin. *Bio-technol Bioeng*, 1993, 42: 815–820.
- [12] 张蕾, 刘春琴, 高智慧, 等. 链霉菌 ZG0429 的分类鉴定与链霉亲和素的分离纯化研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(1): 4–7.
- [13] 刘志恒, 姜成林. *放线菌现代生物学与生物技术*. 北京: 科学出版社, 2004.
- [14] Dastager SG, Li WJ, Agasar D, *et al.* *Streptomyces gulbargensis* sp. nov., isolated from soil in Karnataka, India. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, 91: 99–104.
- [15] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic Actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, 29: 319–322.
- [16] 王平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法—薄层层析法. *微生物学通报(Microbiology)*, 1986, 13(5): 228–231.
- [17] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报(Microbiology)*, 2003, 30(4): 82–84.
- [18] 姜健, 陈瑞英, 龚炳永. RP-HPLC 法测定发酵液中美伐他汀及其转化产物普伐他汀的含量. *中国抗生素杂志(Chinese Journal of Antibiotics)*, 1998, 23(4): 284–286.
- [19] Grahek R, Miliwojevic D, Bastarda. Chromatographic purification of some 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Journal of Chromatography A*, 2001, 918: 319–324.
- [20] 梅民权, 季晓铭, 高霄梁. 生产普伐他汀的微生物和方法. 中国: 03141475.3.2003.

Classification of *Streptomyces* strain Z314 and purification of its product pravastatin

Lei Zhang, Jintao Zhang, Wenbo Yang, Gang Bai*

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Actinomycete strain Z314 with the capability of converting compactin to pravastatin was isolated from soil samples. Based on the results of morphological, physiological, chemotaxonomic characteristics and 16S rRNA analysis, strain Z314 was placed within the genus *Streptomyces* and identified as the species *Streptomyces xanthochromogenes*. The production of pravastatin reached 1580mg/L under optimized feeding of compactin, and the conversion rate was 49.45%. With the efficient purification system by fibrin column, macroporous adsorption resin and high performance liquid chromatography, pravastatin was purified from the culture supernatant with an overall recovery of 45.06% and purity of 99.02%. It is the first report in the world to produce pravastatin by converting compactin using *Streptomyces xanthochromogenes* under optimized conditions, the conversion of compactin to pravastatin was higher than other methods reported. The recovery and purity were improved by the three-step purification of pravastatin from the culture supernatant.

Keywords: pravastatin; *Streptomyces xanthochromogenes*; classification and characterization; isolation and purification

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-23508371; E-mail: gangbai@nankai.edu.cn

Received: 16 May 2007/ Revised: 19 July 2007