

微生物转化辛伐他汀及产物结构的鉴定

彭丹妮^a, 黄 静^a, 厉 铭^b, 顾君琳^b, 刘 坚^a, 杨琍苹^b, 吴自荣^a

(华东师范大学 a. 生命科学学院; b. 化学系, 上海 200062)

【摘 要】 【目的】用微生物转化获得辛伐他汀羟基化衍生物, 为降胆固醇药物的开发奠定基础。【方法】用自养诺卡氏菌堪培拉亚种转化辛伐他汀, 并研究助溶剂、投料时间、底物、温度、pH 等对其转化率的影响。【结果】获得最佳发酵条件为: 自养诺卡氏菌堪培拉亚种培养 36 h 后加入由丙酮处理的辛伐他汀溶液, 转化 pH 为 7.5, 温度 28 ℃, 且在辛伐他汀诱导时, 转化率高。转化产物经纯化鉴定, 初步确定其为 6-羟甲基-辛伐他汀。【结论】成功获得了辛伐他汀羟基化衍生物——6-羟甲基-辛伐他汀。

【关键词】 自养诺卡氏菌堪培拉亚种; 辛伐他汀; 6-羟甲基-辛伐他汀; HMG-CoA 还原酶抑制剂; 微生物转化

【中图分类号】 Q933

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)02-0153-06

Microbial conversion of simvastatin and identification of its product

PENG Dan-ni^a, HUANG Jing^a, LI Ming^b, GU Jun-lin^b,
LIU Jian^a, YANG Li-ping^b, WU Zi-rong^a

(a. School of Life Science; b. Department of Chemistry, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: 【Objective】 The purpose of this study is to obtain hydroxy derivative of simvastatin by microbial conversion to get new potent drugs for lowering cholesterol. 【Method】 Simvastatin was transformed to hydroxy derivative by strain *Nocardia autotrophica subsp. canberrica* ATCC 35203. To obtain the optimal fermentation conditions, the conversion conditions, which affected hydroxylation such as different kinds of solubilizers, time adding simvastatin, substrate, temperature and pH were investigated. 【Result】 The results showed that the productivity was maximized when strain ATCC 35203 was incubated at 28 ℃, with induction of simvastatin at the beginning, and then after 36 hours of growth, simvastatin treated with acetone was added and the incubation was continued in the medium with pH 7.5. The bioconverted product was purified and its structure was further identified as 6-hydroxymethyl-simvastatin on the basis of spectral data (MS and ¹H NMR). 【Conclusion】 Simvastatin's hydroxy derivative was obtained successfully.

Key words: *Nocardia autotrophica subsp. canberrica*; simvastatin; 6-hydroxymethyl-simvastatin; HMG-CoA reductase inhibitors; microbial conversion

胆固醇过高是心血管疾病的主要诱因之一, 目前治疗高胆固醇疾病常用他汀类药物^[1-3], 主要包括: 洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀和阿托伐他汀。其原理是通过抑制胆固醇合成的限速酶——羟甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶活

性, 从而显著降低体内胆固醇水平。与其他降血脂药相比, 他汀类药物副作用少、安全性高, 是目前治疗家族原发性成年人高胆固醇血症的第一首选药物。他汀类药物属多聚酮类化合物, 其分子结构中含有 δ -内酯单元(图 1), 在不改变基本结构的前提

* 【收稿日期】 2007-02-24

【基金项目】 上海市科委 2004 年重大计划项目(04DZ19207-1)

【作者简介】 彭丹妮(1982—), 女, 湖南衡阳人, 在读硕士, 主要从事微生物转化研究。E-mail: noopy-512@163.com

【通讯作者】 吴自荣(1947—), 男, 江苏淮阴人, 教授, 主要从事基因工程与基因工程药物研究。E-mail: zrwu@bio.ecnu.edu.cn

下,许多研究人员都致力于用各种方法,如化学合成、微生物转化等方法对其结构进行改造,以期得到有更强降胆固醇效果及更好药代动力学的新衍生物。

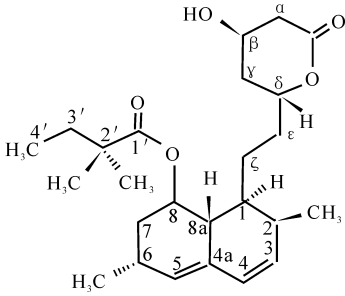


图 1 辛伐他汀的结构

Fig. 1 Structure of Simvastatin

微生物转化是利用微生物代谢过程中产生的某一个或一组酶对底物进行催化反应,能催化底物的羟基化、氧化还原、甲基化/去甲基化等多种反应。微生物转化具有以下优点:反应条件温和、产物单一、高度的化学选择性、区域选择性和对映体选择性、易于纯化、不污染环境且能完成一些化学合成难以进行的反应等。1982 年,日本学者利用 *Mucor hiemalis f. hiemalis* 催化美伐他汀 C₃ 位的羟基化反应,获得了 3-羟基-美伐他汀,其对 HMG-CoA 还原酶的抑制效果要优于美伐他汀^[4];3 年后,他们又利用自养诺卡氏菌堪培拉亚种 (*Nocardia autotrophica subsp. canberrica*) 转化美伐他汀,同样制备得到上述衍生物,并发现诺卡氏菌属的优势在于能转化更高浓度的美伐他汀底物^[5]。1991 年,Merck 公司的研究人员发现,Actinomycete MA 6474 (ATCC53828) 对辛伐他汀钠盐具有转化作用,转化产物有 6-羟基-辛伐他汀、 α -6-羟甲基-辛伐他汀或 β -6-羟甲基-辛伐他汀 3 种,其中 β -6-羟甲基-辛伐他汀对 HMG-CoA 还原酶的抑制效果强于辛伐他汀^[6]。目前,国内对辛伐他汀的微生物转化研究尚未见报道。本研究采用自养诺卡氏菌堪培拉亚种转化辛伐他汀,用薄层层析法检测转化产物,光密度扫描法分析转化效率,并对一系列发酵条件进行了研究,产物经分离纯化后,用 HPLC-MS、¹H-NMR 对其结构进行鉴定,以期降胆固醇药物的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基 自养诺卡氏菌堪培拉亚种 (*Nocardia autotrophica subsp. canberrica* ATCC

35203) 购自美国典型菌种保藏中心。培养基成分:葡萄糖 10 g,胰蛋白胨 2 g,牛肉膏 1 g,玉米浆 3 g,1 L 蒸馏水,pH 7.0。

1.1.2 试剂和仪器 辛伐他汀(批号 20060116, USP20),Merck 公司;硅胶板 HSGF254,烟台市黄务硅胶开发实验厂;制备型硅胶板 HGF254,安徽霍山硅源材料厂;凝胶成像系统,Vilber Lourmat 公司;Agilent 1100 型 LC/MSD VL 液质联用仪、Bruker DRX-500 型核磁共振仪和旋转蒸发仪 RE-52,上海青浦沪西仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 底物预处理 1 g 辛伐他汀溶于 15 mL 二甲基甲酰胺(助溶剂)中,加入 85 mL 0.1 mol/L NaOH,充分反应后,0.22 μ m 滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C 保存。以下如无特殊说明,底物均为经过二甲基甲酰胺预处理后的辛伐他汀溶液(10 mg/mL)。

1.2.2 菌体培养与底物的转化 挑取 1 环自养诺卡氏菌堪培拉亚种接种于斜面培养基,28 $^{\circ}$ C 培养 7 d,无菌水洗下孢子,过滤除去菌丝体,制备成孢子悬液。取一定量孢子悬液接种于 20 mL 培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、210 r/min 条件下振荡培养 1 d 后,获得液体种子,将液体种子按体积分数 5% 接种量接种于 20 mL 培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、210 r/min 条件下振荡培养 1 d,得到成熟菌丝体,加入 1.2.1 中预处理好的底物使其终浓度为 1 000 μ g/mL,于 28 $^{\circ}$ C、210 r/min 条件下振荡培养 1 d,获得发酵液。

1.2.3 发酵液的处理及转化产物的检测 取 0.5 mL 发酵液,加入 100 μ L 0.1 mol/L HCl 酸化,等体积乙酸乙酯萃取 10 min,取萃取液,点样于薄层层析板。展开剂为乙酸乙酯-石油醚-冰醋酸混合液(V(乙酸乙酯):V(石油醚):V(冰醋酸)=10:6:1),展层长度为 2.5 cm,体积分数 10% 磷钼酸染色。用凝胶成像系统扫描,Bio-1D 软件对斑点进行光密度扫描并计算转化率,转化率/%=(光密度_{原料}-光密度_{未转化原料})/光密度_{原料} $\times$ 100%。

1.2.4 影响辛伐他汀转化率的条件研究 (1)助溶剂对辛伐他汀转化率的影响。分别用 15 mL 丙酮、乙醇、二甲基亚砜和二甲基甲酰胺溶解 1 g 辛伐他汀,处理方法同 1.2.1,在预处理好的辛伐他汀底物中加入成熟菌丝体,于 28 $^{\circ}$ C、210 r/min 条件下振荡培养 1 d,测定辛伐他汀的含量,计算转化率。

(2)投料时间对辛伐他汀转化率的影响。液体种子接种后,分别培养 0,12,24,36,48,60 和 72 h 加入辛伐他汀溶液,于 28 $^{\circ}$ C、210 r/min 条件下振荡

培养1 d后,测定辛伐他汀的含量,计算转化率。

(3)底物对辛伐他汀转化率的影响。设2次加入底物(底物诱导)和1次加入底物(非底物诱导)2个处理,研究底物对辛伐他汀转化率的影响。2次加入底物处理:预先在培养基中加入0.04 mL辛伐他汀溶液,液体种子接种培养1 d后,再加入1.96 mL辛伐他汀溶液,使辛伐他汀终浓度为1 000 $\mu\text{g/mL}$,于28 $^{\circ}\text{C}$ 、210 r/min条件下振荡培养1 d后,测定辛伐他汀的含量,计算转化率。1次加入底物处理:在液体种子接种培养1 d(28 $^{\circ}\text{C}$)后,加入2 mL 10 mg/mL辛伐他汀溶液,使辛伐他汀终浓度为1 000 $\mu\text{g/mL}$,于28 $^{\circ}\text{C}$ 、210 r/min条件下振荡培养1 d后,测定辛伐他汀的含量,计算转化率。

(4)温度对辛伐他汀转化率的影响。液体种子接种培养1 d(28 $^{\circ}\text{C}$)后,加入辛伐他汀溶液,分别在20、28和37 $^{\circ}\text{C}$ 、210 r/min条件下振荡培养1 d后,测定辛伐他汀的含量,计算转化率。

(5)初始pH值对辛伐他汀转化率的影响。将液体种子接种到初始pH分别为6.0、6.5、7.0、7.5和8.0的培养基中,加入辛伐他汀溶液,于28 $^{\circ}\text{C}$ 、210 r/min条件下振荡培养1 d后,测定辛伐他汀的含量,计算转化率。

(6)转化pH值对辛伐他汀转化率的影响。将液体种子接种培养1 d(28 $^{\circ}\text{C}$)后,调节培养基的pH值分别为6.0、6.5、7.0、7.5和8.0,然后加入辛伐他汀溶液,于28 $^{\circ}\text{C}$ 、210 r/min条件下振荡培养1 d后,测定辛伐他汀的含量,计算转化率。

(7)菌丝体和上清液对辛伐他汀转化率的影响。种子接种培养1 d(28 $^{\circ}\text{C}$)后,于12 000 r/min离心2 min,分离菌丝体和上清液。上清液中直接加入辛伐他汀溶液;菌丝体用Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)洗涤后,重悬于20 mL Tris-HCl(pH 7.0)缓冲液中,再加入辛伐他汀溶液。两处理28 $^{\circ}\text{C}$ 、210 r/min条件下振荡培养1 d后,测定辛伐他汀的含量,计算转化率。

以上每试验均重复3次。

1.2.5 产物的分离纯化 发酵液用体积分数25%磷酸调pH至5.0,加入等体积乙酸乙酯萃取2次,合并有机相,有机相经无水硫酸钠脱水后过滤,滤液用旋转蒸发仪浓缩,将浓缩液在制备型硅胶板上点样并展层,刮下产物位置的硅胶,加入适量蒸馏水与乙酸乙酯混合液($V(\text{蒸馏水}):V(\text{乙酸乙酯})=1:1$),将产物萃取到有机相中。有机相脱水后浓缩干燥,得到纯化产物。

1.2.6 产物的结构鉴定 用HPLC-MS分析产物,

色谱条件如下:色谱柱 ZORBAX 80A Extend-C-18(2.1 mm $\times$ 150 mm,5 μm);流动相为体积分数30%乙腈-体积分数0.1%冰醋酸混合液($V(30\%\text{乙腈}):V(0.1\%\text{冰醋酸})=1:1$);流速0.3 mL/min;检测波长238 nm;柱温20 $^{\circ}\text{C}$;用 $^1\text{H-NMR}$ 鉴定产物结构。

2 结果与分析

2.1 辛伐他汀的微生物转化

分别取辛伐他汀及发酵萃取液点样,展层染色的结果如图2所示。由图2可知,与辛伐他汀底物比较,发酵萃取液展层后出现1个新的斑点,极性发生变化,比移值 R_f 为0.457,辛伐他汀原料的比移值 R_f 为0.657。由此可知,辛伐他汀经自养诺卡氏菌堪培拉亚种转化后生成了一个新的产物。

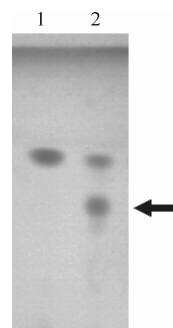


图2 辛伐他汀经自养诺卡氏菌堪培拉亚种转化的结果
1. 辛伐他汀;2. 发酵萃取液;箭头所示为转化产物

Fig.2 Microbial conversion of simvastatin by *Nocardia autotrophica* subspecies *canberrica*

1. Simvastatin;2. Ethyl acetate extract of fermentation broth;
Bioconverted product is signified by the arrow

2.2 影响辛伐他汀转化率的条件

2.2.1 助溶剂对辛伐他汀转化率的影响 以不同助溶剂处理底物进行微生物转化时,对助溶剂的要求是:(1)对微生物低毒;(2)转化率高;(3)对有机化合物溶解性好。由图3可知,丙酮作助溶剂时,辛伐他汀转化率最高,达99.8%;二甲基亚砷次之,为91.2%;乙醇最低,为37.3%。由此可知,丙酮与二甲基亚砷对菌体毒害作用均相对较小,转化率均较高。

2.2.2 投料时间对辛伐他汀转化率的影响 在培养0~36 h投料,辛伐他汀转化率基本呈上升趋势,且在培养36 h达到最大值(59.6%);在培养36~72 h投料,辛伐他汀转化率呈逐渐下降的趋势(图4)。辛伐他汀对菌体有一定的毒性,在菌体生长初期投料,会抑制菌体的生长,从而影响转化率;而投料过晚,菌体生长停滞,代谢减慢,其胞内酶表达量降低,

也会导致转化率降低。由此可知,培养 36 h 时菌体代谢旺盛,酶的表达量也达到最大,故此时投料能获得

得较高的转化率。

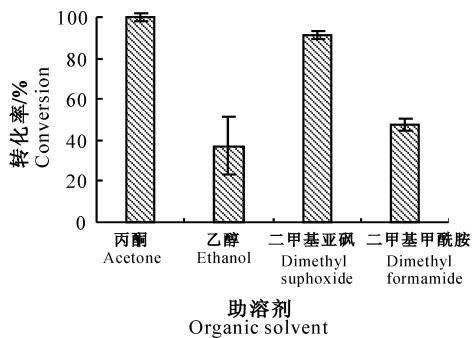


图 3 助溶剂对辛伐他汀转化率的影响

Fig. 3 Effect of organic solvent on conversion

2.2.3 底物对辛伐他汀转化率的影响 由图 5 可知,2 次加入底物(底物诱导)处理辛伐他汀的转化率为 79.6%,1 次加入底物(非底物诱导)处理辛伐他汀的转化率为 35.4%。可见,自养诺卡氏菌堪培拉亚种在有底物诱导时的转化率,大约是非底物诱导时的 2 倍。不同菌体转化时有不同的要求,在微生物转化美伐他汀时,*Actinomadura sp.* 对美伐他汀的转化不需要底物诱导^[7],而 *Streptomyces car-*

bophilus 则需要底物诱导^[8-9]。本研究结果表明,在有底物诱导时,自养诺卡氏菌堪培拉亚种转化活力较大,辛伐他汀转化率高。

2.2.4 温度对辛伐他汀转化率的影响 温度不仅对菌体的生长速率有影响,而且对不同生物酶也有影响。图 6 表明,28 ℃ 为转化作用的最适温度,辛伐他汀转化率达 98%;37 ℃ 时,与转化有关的酶基本上无催化活性,辛伐他汀转化率几乎为 0%。

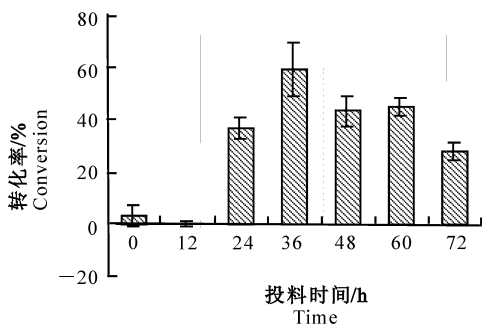


图 4 投料时间对辛伐他汀转化率的影响

Fig. 4 Effect of time adding simvastatin on conversion

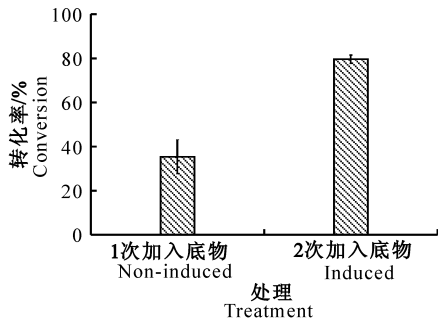


图 5 底物对辛伐他汀转化率的影响

Fig. 5 Effect of simvastain on conversion

2.2.5 初始 pH 值和转化 pH 值对辛伐他汀转化率的影响 初始 pH 值和转化 pH 值对辛伐他汀转

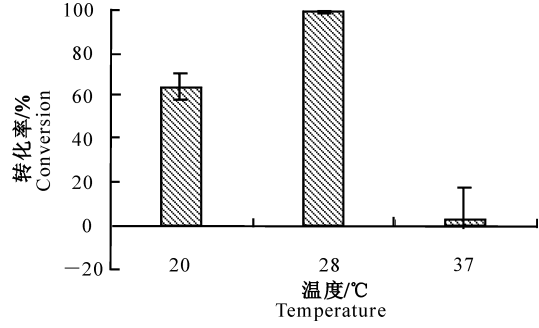


图 6 温度对辛伐他汀转化率的影响

Fig. 6 Effect of temperature on conversion

化率的影响见图 7 和图 8。

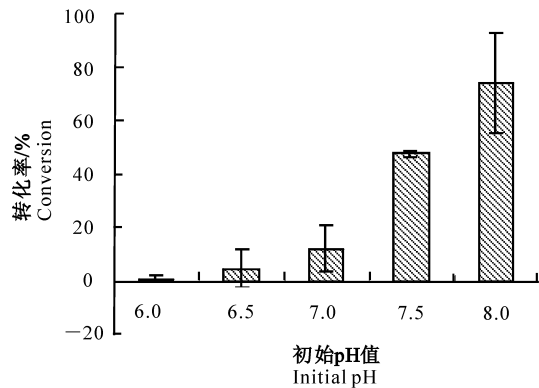


图 7 初始 pH 值对辛伐他汀转化率的影响

Fig. 7 Effect of initial pH on conversion

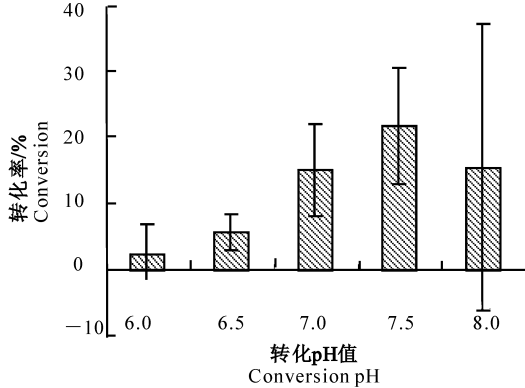


图 8 转化 pH 值对辛伐他汀转化率的影响

Fig. 8 Effect of conversion pH on conversion

初始 pH 主要影响菌体的生长,从而影响生物酶的积累。由图 7 可知,在初始 pH 值为 8.0 时,辛伐他汀的转化率最高,为 73.8%;在初始 pH 值为 6.0 时辛伐他汀的转化率最低,几乎为零。图 8 表明,在转化 pH 值为 7.5 时,辛伐他汀转化率最高;在转化 pH 值为 6.0 时,辛伐他汀转化率最低。

2.2.6 菌丝体和上清液对辛伐他汀转化率的影响

由图 9 可知,单一的菌丝体或上清液对辛伐他汀的转化率均低于其发酵液,推测自养诺卡氏菌堪培拉亚种对辛伐他汀的转化主要在胞内进行。

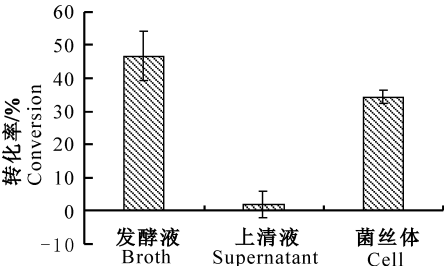


图 9 自养诺卡氏菌堪培拉亚种菌丝体和上清液对辛伐他汀转化率的影响

Fig. 9 Effect of cell and supernatant of *Nocardia autotrophica subsp. canberria* on conversion

2.3 转化产物的结构鉴定

据文献报道^[10],自养诺卡氏菌转化辛伐他汀常

得到两种产物:6-羟基-辛伐他汀和 6-羟甲基-辛伐他汀(图 10),其中 6-羟甲基-辛伐他汀对 HMG-CoA 还原酶的抑制活性是辛伐他汀的两倍。对本研究得到的纯化产物进行¹H-NMR 分析,结果为,¹H-NMR(CDCl₃,δppm):5.906~5.920(d,1H),5.488(m,2H),4.104~4.132(m,1H),3.962~3.972(1H,D₂O 交换消失),3.840~3.860(m,2H),3.560~3.670(m,1H),2.898~2.976(d,1H),2.534~2.552(m,3H),2.300~2.712(3H,D₂O 交换消失),2.170~2.206(m,2H),1.708~1.850(m,9H),1.246~1.274(m,8H),0.880~0.894(m,3H),0.736~0.750(m,3H)。分析可知,产物结构上有 4 个羟基基团,其中 2 个羟基是底物预处理时 NaOH 与辛伐他汀反应使其羟基内酯环打开形成的;1 个羟基是他汀类药物羟基内酯环的共有结构;还有 1 个羟基位于产物支链上,与辛伐他汀的结构比较可知,该羟基是由自养诺卡氏菌堪培拉亚种转化形成的。纯化产物经 HPLC-MS 分析,保留时间为 1.613 min,分子离子峰为 453.1。以上结果表明,本研究得到的产物结构与 6-羟甲基-辛伐他汀一致,即该产物为 6-羟甲基-辛伐他汀。

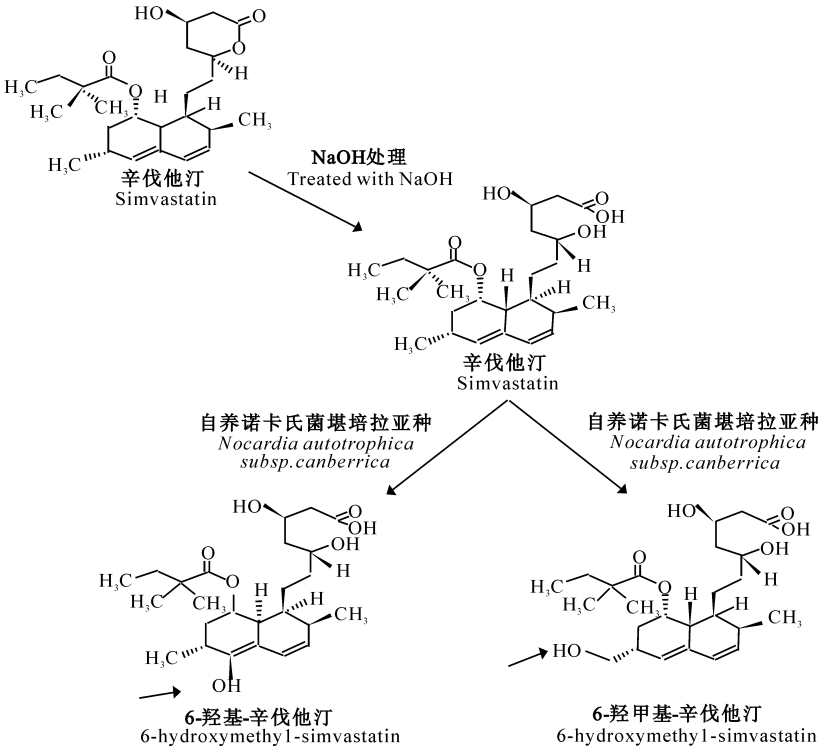


图 10 自养诺卡氏菌堪培拉亚种转化辛伐他汀的途径
(箭头所示为催化加羟基位点)

Fig. 10 Bioconversion of simvastatin by *Nocardia autotrophica subsp. canberria*
(Hydroxylated site is signified by the arrow)

3 结 语

本研究利用自养诺卡氏菌堪培拉亚种转化辛伐他汀,优化了转化工艺,为辛伐他汀的微生物转化提供了有益参考。本试验得到的最佳工艺条件为:自养诺卡氏菌堪培拉亚种培养 36 h 后,加入由丙酮处理的辛伐他汀溶液,转化 pH 值为 7.5,温度 28℃,且在有辛伐他汀诱导时,转化率最高。同时,本研究利用光密度扫描的方法检测了辛伐他汀,并分析了转化率,具有方便,省时的优点。初步鉴定出辛伐他汀微生物转化产物为 6-羟甲基-辛伐他汀。本研究为降胆固醇药物开发提供了一条新的思路。有关 6-羟甲基-辛伐他汀对 HMG-CoA 还原酶的抑制活性,正在进一步研究中。

[参考文献]

[1] 董亚琳,董卫华. 他汀药物的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2003,12(3):175-178.
Dong Y L,Dong W H. Advances in the research of statins [J]. Chinese Journal of New Drugs,2003,12(3):175-178. (in Chinese)

[2] Alberts A W,Chen J,Kuron G,et al. Mevinolin:A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1980,77(7):3957-3961.

[3] 张哲峰,刘铁钢,张 冬. 羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂的研究进展[J]. 中国现代应用药学,1999(6):1-4.

Zhang Z F,Liu T G,Zhang D. The advancement of HMG-CoA reductase inhibitor [J]. The Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy,1999(6):1-4. (in Chinese)

[4] Terahara,Akira,Minoru,et al. ML-236B Derivatives and their preparation;US,4346227[P]. 1981-06-05.

[5] Terahara,Akira,Minoru,et al. Process for preparing 3-hydroxy-ML-236B derivatives known as M-4 and M-4'; US,4537859 [P]. 1985-08-27.

[6] Marcin C,White R,Hirsch C,et al. Bioconversion of the sodium salt of Simvastatin(MK-733) to 6-desmethyl-6- α -hydroxy-methyl Simvastatin [J]. Journal of Industrial Microbiology, 1991,8:157-164.

[7] Peng Y I,Arnold L D. Bioconversion of compactin to pravastatin by *Actinomadure sp.* ATCC 55678[J]. Journal of Molecular Catalysis B;Enzymatic 2000,10:151-156.

[8] Matsuoka T,Miyakoshi S,Tanzawa K,et al. Purification and characterization of cytochrome P-450sca from *Streptomyces carbophilus*. ML-236B (compactin) induces a cytochrome P-450sca in *Streptomyces carbophilus* that hydroxylates ML-236B to pravastatin sodium (CS-514),a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase[J]. Eur J Biochem,1989,184(3):707-713.

[9] 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 [J]. Biochem Biophys Acta,1991,1084:35-40.

[10] Edward S,Inamine,Rahwa,et al. Novel HMG-CoA reductase inhibitors;US,4940727[P]. 1988-10-06.