

一株对 Monacolin K 有转化作用菌株的鉴定*

于海^{1**} 张永光² 方慧英² 诸葛健² 徐鑫¹ 汪志君¹

(扬州大学食品科学与工程学院 扬州 225001)

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室和工业微生物研究中心 无锡 214036)

摘要 :从 1000 多株放线菌中筛选出对 Monacolin K 有转化作用的菌株并对其进行初步鉴定。结果发现菌株 ST2710 的气丝交替或不规则分枝,不形成螺旋,可利用多种碳源,牛奶不凝固,不胨化,不利用纤维素,水解淀粉,通过对其细胞化学组分的分析,结果表明菌株 ST2710 细胞壁为Ⅳ型,糖型为 A 型,醌组分为 MK-(H₄, H₆),不含枝菌酸, G + C 含量为 67.3%(摩尔比);将该菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据中已有序列进行比对,发现其序列与 *Amycolatopsis* 属菌株的 16S rDNA 序列相似性最高,达到 99% 以上。初步将菌株 ST2710 归类为 *Amycolatopsis* sp.

关键词 :Monacolin K,微生物转化,鉴定, *Amycolatopsis* sp.

中图分类号 :Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)03-0512-04

Primarily Identification of the Strain Bioconverting Monacolin K*

YU Hai^{1**} ZHANG Yong-Guang² FANG Hui-Ying² ZHUGE Jian² XU Xin¹ WANG Zhi-Jun¹

(College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225001)

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and the Research Centre of Industrial Microbiology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract :In this paper approximately 1000 strains of actinomycete were screening for their ability for microbial transformation of Monacolin K. Strain ST2710 were capable of bioconverting Monacolin K into hydroxy-Monacolin K. Strain ST2710 was primarily identified using the medium employed by Waksman, Shirling and Gottlieb and the current ISP medium. On Gause's starch agar medium, aerial mycelium form branching filaments and do not show coiling. The utilization of carbohydrates by the ST2710 strain include glucose, sucrose, starch, glycerin etc and determination was made after cultivation at 28℃ for 14 days. It could not decompose milk and liquefy gelatin. It could hydrolyse starch and not grow on cellulose. Strain ST2710 contain major amounts of meso-diaminopimelic acid as the wall diamino acid, arabinose and galactose as major wall sugars, but does not contain mycolic acids. The G + C content of the DNA is 67.3 mol%. 16S rDNA analysis indicated membership of strain ST2710 to the genus *Amycolatopsis* (99%). Therefore, according to the references, the ST2710 strain was primarily identified as *Amycolatopsis* sp.

Key words :Monacolin K, Bioconversion, Identification, *Amycolatopsis* sp.

Monacolin K, 又称为洛伐他汀(lovastatin), 乐瓦停、美降之, 是 HMG-CoA 还原酶抑制剂的一种, 它为 *Monascus ruber* 及 *Aspergillus terreus* 的代谢产物, 它能明显降低血清中总胆固醇的含量及原发性高胆固醇血症病人的 LDL-胆固醇, 而且安全无毒, 于 1987 年获 FDA 批准进入市场。它能有效地降低血浆中胆固醇水平, 因此, 关于 HMG-CoA 还原酶抑制剂的研究与开发成为人们研究的热点^[1,2]。

目前报道对 Monacolin K 有转化作用的微生物

主要为:诺卡氏菌 *Nocardia* sp. (MA 6455) (ATCC 53695), *Nocardia autotrophica*, 放线菌 *Actinomycete* (MA 6474)^[3];链霉菌 *Streptomyces carbophilus*, *Streptomyces* sp. Y-110^[4], 马杜拉放线菌 *Actinomadura* sp. (ATCC 55678)^[5] 以及少数真菌中的 *Absidia coerulea* (IDR 705)^[6]。由此可知, 对 Monacolin K 有转化作用的主要为放线菌。放线菌为具有分枝状菌丝的革兰氏阳性、好氧的原核微生物^[7]。本研究小组从保藏的 1000 多株放线菌中筛出对 Monacolin K 有转化作用

* 江苏省教育厅计划项目(No. RK0510100)

** 通讯作者 Tel 0514-7978022 E-mail :yuhai@yzu.edu.cn

收稿日期:2006-08-28, 修回日期:2006-12-18

的菌株,通过液质联机测得转化产物为羟基化的 Monacolin K^[8],通过形态、培养基特征及生理、生化和生态特性的研究,同时对孢子丝有无分枝及单个菌落的形态、基丝有无颜色、有无可溶性色素和对各种碳源的利用情况等进行分析,对该菌株的 16S rDNA 序列进行测试和比对,最终确定对 Monacolin K 有转化菌株 ST2710 的生物学地位。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:筛选得到的对 Monacolin K 有转化作用的菌株 ST2710。

1.1.2 主要试剂 均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

扫描电镜(江南大学测试中心)。

1.3 实验方法

主要培养基:参考文献[9]。

1.4 菌株鉴定方法

1.4.1 形态观察:采用高氏合成 1 号琼脂培养基,28℃ 培养 7d 后观察,光学显微镜观察孢子丝的形态特征、有无气丝、基内菌丝和气生菌丝有无断裂、孢子丝的形状及长度;扫描电子显微镜观察孢子表面是否有疣及皱褶、刺,孢子的形态及其表面特征。

1.4.2 培养特征及生理生化特性:按《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》(第四卷)方法和文献[10]进行,用 ISCC Colour Charts 色谱记录颜色^[11]。

1.4.3 主要培养特征:基内菌丝和气生菌丝的生长情况及颜色,是否产可溶性色素及其颜色。

1.4.4 菌株 ST2710 的生长曲线、最适生长温度和最适 pH 值的测定方法 均以菌体的干重为基准。

1.4.5 细胞壁化学组分分析:细胞壁的糖型分析,参考 Hasegawa^[12]及王平^[13]的薄层层析法对全细胞的水解液糖型分析;甲基萘醌分析,参照 Collins 方法^[14]进行提取及分析。

1.4.6 DNA G + C 含量测定:先提取总 DNA,之后采用 T_m 值法测定菌株中 G + C 含量^[15]。

1.4.7 枝菌酸分析与方法:参考文献[16]。

1.4.8 16S rDNA 的 PCR 扩增及全序列测定和分析:菌株 ST2710 的 16S rDNA 扩增方法按参考文献[17]进行,扩增获得一条 1.4kb 的片段,胶分离后送上海华诺生物技术公司测序。

2 结果与分析

2.1 形态特征

菌株 ST2710 在高氏合成 1 号琼脂平板培养基上培养 7d 后,菌落表面呈粉状,白色,为坚韧的菌丝体毡,中心区比周边更厚,插片培养 7d 后,观察气生菌丝呈长丝状,稍有弯曲或不弯曲。

菌株 ST2710 在高氏合成 1 号琼脂培养基上培养 7d 后,气生菌丝交替或不规则分枝,不形成螺旋,孢子表面光滑,形状从椭圆至柱形(图 1)。

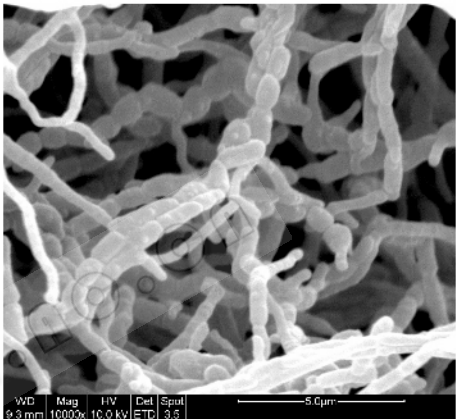


图 1 菌株 ST2710 气生菌丝扫描电镜图 (10000 倍, 10.0kV)

2.2 培养特性

菌株 ST2710 在 1.3 培养基上的培养特征见表 1。

表 1 菌株 S2710 的培养特性

琼脂培养基	生长情况	气生菌丝体	基内菌丝体	可溶性色素
ISP II 琼脂	良好	灰褐色	暗褐色	黑色素
ISP III 琼脂	良好	灰白色	黄褐色	黑色素
ISP IV 琼脂	一般	无	黄白色	无
ISP V 琼脂	良好	无	灰白色	无
高氏合成 1 号琼脂	良好	乳白	微黄色	无
察氏琼脂	良好	灰白色	黄褐色	无
硝酸盐琼脂	良好	雪白粉状	微黄色	无
苹果酸钙琼脂	良好	乳白	微褐色	无
营养琼脂	良好	无	灰白色	无
麦芽汁琼脂	一般	少量乳白	微黄色	无
马铃薯琼脂	良好	灰褐色	暗褐色	黑色素

2.3 生长特性与生理生化特性

菌株 ST2710 在静止液体培养时,呈表面生长,在高氏合成 1 号平板培养基上随培养时间的延长,菌落

呈放射状向周围生长,菌落呈白色,并且中央比周边厚,这种现象随培养时间的延长逐渐明显。

菌株 ST2710 在牛奶表面形成白色薄菌膜,反面微黄色,不凝固,不胨化,无色素产生;纤维素上不生长;不水解淀粉;不产生 H₂S 和黑色素;硝酸盐还原为阴性;可以利用 L-树胶醛糖、L-鼠李糖、甘露糖、乳糖、D-半乳糖、糊精、蔗糖、麦芽糖、木糖、山梨醇、蜜二糖、肌醇、甘油和葡萄糖等。详见表 2。

通过对菌株 ST2710 在不同温度和不同 pH 下菌体干重的测定结果见图 2 和图 3,从图 2 可知菌株 ST2710 的生长温度 20℃~32℃,最适生长温度为 26℃~28℃;从图 3 可知菌株 ST2710 在 pH 5 至 pH 9 均能生长,最适生长 pH 为中性(7.0 左右)。

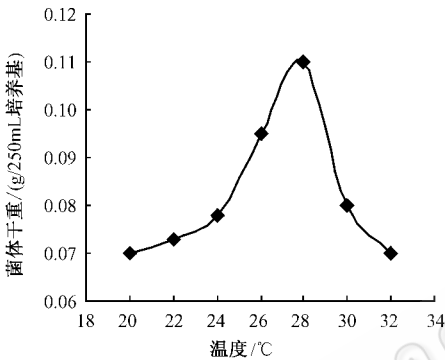


图 2 菌株 ST2710 不同温度下的生长情况

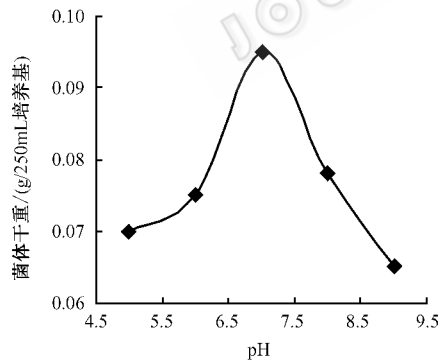


图 3 菌株 ST2710 不同 pH 下的生长情况

2.4 细胞化学组分分析

通过分析,菌株 ST2710 全细胞壁组分中含有 meso-DAP、阿拉伯糖和半乳糖,细胞壁为Ⅳ型,糖型为 A 型;甲基萘醌分析结果表明,菌株 ST2710 的醌组分为 MK-9(H₄, H₆)。通过对菌株 ST2710 细胞中枝菌酸分析,结果表明菌株 ST2710 不含有枝菌酸。

2.5 DNA G + C 摩尔百分含量测定

按方法 1.4.4 测得菌株 ST2710 的 DNA G + C 摩

尔百分含量为 67.3%。

表 2 菌株 ST2710 的生理生化特征试验及一些标准菌株 *Amycolatopsis orientalis* 的比较

生理生化指标	菌株	<i>A. orientalis</i>	<i>A. orientalis</i>	<i>A. orientalis</i>
	ST2710	ATCC43014 ^[18]	NRRL2430 ^[18]	ATCC19795 ^[18]
气生菌丝	白色	白色	白色	白色
黑色素产生	-	+	+	+
硝酸还原反应	-	-	+	+
明胶液化	-	+	+	+
淀粉水解	+	-	-	-
可溶性色素	+	ND	ND	ND
L-树胶醛糖	+	+	+	+
L-鼠李糖	+	+	-	+
甘露醇	+	+	+	+
乳糖	+	-	+	+
D-半乳糖	+	+	+	+
糊精	+	-	+	+
蔗糖	+	-	+	+
麦芽糖	+	-	+	+
果糖	+	+	+	+
木糖	+	+	+	+
山梨醇	+	-	-	-
蜜二糖	+	+	-	+
肌醇	+	-	+	+
甘油	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+
甘露醇	+	-	+	+
5% NaCl	-	+	+	+
10℃	+	+	+	+
45℃	-	+	-	-

+ 生长, - 不生长, ND not done

2.6 菌株 ST2710 16S rDNA 全测序测定与分析

测定菌株 ST2710 的 16S rDNA 核苷酸序列全长为 1443bp,与美国国家生物信息中心(NCBI)核酸序列数据库中已有序列进行比对(Blastn),发现 16S rDNA 序列与 ST2710 相似性最高的菌株均属于 *Amycolatopsis* 属,其中与 *Amycolatopsis orientalis* 相似性达到 99% 以上,将菌株 ST2710 与 *Amycolatopsis orientalis* 的标准菌株进行比较结果见表 2,从表 2 可以看出,菌株与 *Amycolatopsis orientalis* 在某些方面有所差别,因此可以初步将菌株 ST2710 定为

Amycolatopsis sp.。

综合以上这些形态特性、培养实验、生长特征和生理生化实验及细胞壁组分分析、甲基萘醌和 16S rDNA 核苷酸序列分析,初步将菌株 ST2710 定为 *Amycolatopsis* sp.。

3 结论

菌株 ST2710 在高氏合成 1 号琼脂平板培养基上气生菌丝呈乳白色,孢子丝交替或不规则分枝,不形成螺旋,表面光滑,形状从椭圆至柱形;菌株 ST2710 可以利用 L-树胶醛糖、L-鼠李糖、甘露糖、乳糖、D-半乳糖、糊精、蔗糖、麦芽糖、木糖、山梨醇、蜜二糖、肌醇、甘油和葡萄糖等;在牛奶表面形成白色薄菌膜,反面微黄色,不凝固,不胨化,无色素产生;菌株 ST2710 不利用纤维素,但能水解淀粉,不产生 H_2S 和黑色素,硝酸盐还原为阴性,最适生长 pH 为 7.0,最适生长温度为 26℃ ~ 28℃。

通过对细胞组分进行分析,菌株 ST2710 的细胞壁组分中含有 meso-DAP、阿拉伯糖和半乳糖,细胞壁为 IV 型,糖型为 A 型;甲基萘醌为 MK-9(H_4 , H_6),不含枝菌酸,DNA 中 G + C 摩尔百分含量为 67.3%。

通过测定,菌株 ST2710 的 16S rDNA 核苷酸序列全长为 1443bp,与美国国家生物信息中心(NCBI)核酸序列数据库中已有序列进行比对,发现它与 *Amycolatopsis* 属菌株的 16S rDNA 序列相似性达到 99% 以上。

综合以上这些形态特性、培养特征、生理生化实验及细胞壁组分分析和分子生物学等特性,初步将菌株 ST2710 定为 *Amycolatopsis* sp.。

参考文献

- [1] G N Elizabeth. The New England Journal of Medicine. 2003, **349**(1): 60 ~ 72.
- [2] K J Mukesh, P M Ridker. Nature Reviews Drug Discovery 2005, **4**(12): 977 ~ 987.
- [3] H Joshua, S S Michael, E W Kenneth. The Journal of Antibiotics, 1991, **44**(3): 366 ~ 370.
- [4] P Joo-Woong, L Joo-Kyung, K Tae-Jong, et al. Biotechnology Letters, 2003, **25**(21): 1827 ~ 1831.
- [5] P Yulin, L D Arnold. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, **10**(13): 151 ~ 156.
- [6] A Jekkel, A Konya, E Ilkoy, et al. The Journal of Antibiotics, 1997, **50**(9): 750 ~ 754.
- [7] 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, pp. 1 ~ 15.
- [8] 诸葛健, 方慧英, 于海. 中国专利, 2005, CN 1584016A.
- [9] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1975, pp. 1 ~ 17.
- [10] T. G. Pridham, D. Gottlieb. Journal of Bacteriology, 1948, **56**(1): 107 ~ 114.
- [11] 姜成林, 徐丽华, 许宗雄. 放线菌分类学. 昆明: 云南大学出版社, 1995, pp. 127 ~ 128.
- [12] T. Hasegawa, M. Takizawa, Tanida S. the Journal of General and Applied Microbiology, 1983, **29**(4): 319 ~ 322.
- [13] 王平. 微生物学通报, 1986, **13**(5): 228 ~ 230.
- [14] M D Collins, D I Jones. Journal of Applied Bacteriology 1979, **47**(2): 293 ~ 297.
- [15] 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, pp. 47 ~ 48.
- [16] 刘志恒, 阮继生. 微生物学报, 1988, **28**(3): 206-210.
- [17] M Orsini, Romano-Spica. Letter in Applied Microbiology 2001, **33**(1): 17-20.
- [18] M P Lechevalier, H Prauser, D P Labeda, et al. International Journal of Systematic Bacteriology, 1986, **36**(1): 29 ~ 37.