

1 株产 α -糖苷酶抑制剂的稀有放线菌分离与鉴定*

程 新, 徐 波, 魏赛金, 邱秀文, 涂国全

(江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌, 330045)

摘 要 从土壤中得到 1 株稀有放线菌, 经过分析表明, 该菌株为游动放线菌, 并且具有产 α -糖苷酶抑制剂——阿卡波糖的能力。实验结果同时表明, 对样品进行风干并用 CaCO_3 处理, 同时在培养基中添加重铬酸钾等筛选方法, 可以大大提高稀有放线菌的筛出率。

关键词 稀有放线菌, α -糖苷酶抑制剂, 阿卡波糖, 筛选

糖苷酶抑制剂如阿卡波糖(acarbose)、伏利波糖(voglibose)等, 是一类作用机理新颖、治疗确切、副作用低的降血糖药物, 主要用于 II 型糖尿病治疗。第 1 种用于临床的糖苷酶抑制剂, 是德国拜耳公司从犹他游动放线菌发酵液中分离出的阿卡波糖。目前已经在世界范围内得到广泛的应用^[1~3]。

本实验室在进行稀有放线菌的分离过程中, 分离得到 1 株稀有放线菌 A-5.6, 通过对该菌株的鉴定以及产物分析发现, 该菌株属于稀有放线菌, 并且具有产生 α -糖苷酶抑制剂——阿卡波糖的能力。

1 材料与方法

1.1 样 品

采集自校园及周边地区的土壤。

1.2 培养基

1.2.1 分离培养基

改良高氏二号培养基: 葡萄糖 1 g, 蛋白胨 0.5 g, 胰酪 0.3 g, NaCl 0.5 g, 重铬酸钾 60 mg, 复合维生素, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 7.2^[4]。

海藻糖-脯氨酸培养基: 海藻糖 5g, 脯氨酸 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, NaCl 1g, CaCl_2 2 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 60 mg, 复合维生素, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 7.2^[4]。

高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20 g, KNO_3 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。

1.2.2 发酵培养基

可溶性淀粉 30 g, 葡萄糖 30 g, 黄豆饼粉 20 g,

K_2HPO_4 1 g, CaCO_3 1 g, NaCl 3 g, 水 1 000 mL, pH 7.0^[6]。

1.3 分离方法

将采集得到的土壤样品室温(约 28℃)下风干 10d, 取 5g 样品, 加入 1g CaCO_3 , 适当补充无菌水保持湿润, 室温下风干 10d, 然后加入 50 mL 磷酸缓冲液(pH 7.0)及玻璃珠, 振荡 2 h 后, 采用梯度稀释法稀释, 涂布于分离培养基平板上, 30℃ 培养 5d。挑取单菌落。

1.4 鉴定方法

参照《放线菌的分类与鉴定》进行^[8]。

1.5 α -葡萄糖苷酶活性测定

参考文献^[9]进行。

1.6 摇瓶发酵

用接种铲取约 1.0 cm² 大小的斜面培养物接种于装有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 30℃ 摇床 220r/min 振荡培养 96 h。

1.7 HPLC 分析

将发酵液 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清液 1.0 mL 与 0.5 mL 蒸馏水和 2.0 mL 乙腈混合后, 11 000 r/min 离心 10 min, 再取上清液以微孔滤膜过滤, 取滤液 20 μL 进样。精密称取阿卡波糖标准品以二次蒸馏水配制成 200mg/L 标准品溶液作为对照^[7]。

流动相: $V(\text{乙腈}) : V(\text{磷酸缓冲液}) = 7 : 3$; 波长 210 nm, 流速 2 mL/min; 柱温 35℃。

1.8 发酵培养基碳源优化

分别采用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖以及复合碳源作为发酵培养基的碳源, 发酵 96h 后测定发酵液中阿卡波糖的含量。

2 结果与分析

2.1 抑制剂对稀有放线菌筛选的影响

第一作者: 硕士, 讲师(涂国全教授为通讯作者)。

* 江西农业大学博士科研启动基金资助项目

收稿日期: 2008-03-04, 改回日期: 2008-04-23

根据文献报道,采用重铬酸钾作为抑制剂,进行稀有放线菌的筛选,可以很好地抑制真菌和常见细菌,使稀有放线菌的出菌率大大提高。在分离培养基中加入 60 mg/L 的重铬酸钾,效果较好(图 1,图 2)。

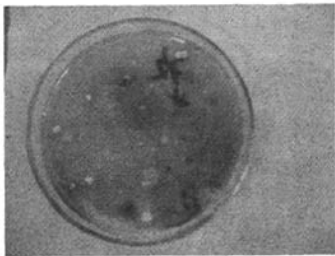


图 1 未加入重铬酸钾的分离平板

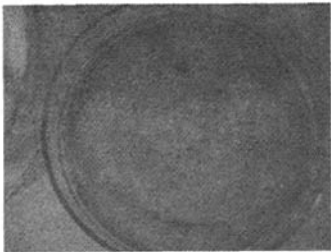


图 2 加入重铬酸钾的分离平板

从试验结果可以看出,在未加入重铬酸钾的分离平板上,细菌和真菌的数量很多,而且菌落直径很大,严重干扰了分离工作的进行。加入了重铬酸钾后,几乎没有真菌的出现,细菌的生长也基本被抑制,放线菌的筛出率大大增加。

2.2 不同培养基对稀有放线菌筛选的影响

实验的过程中,一共采用了 3 种分离培养基,其中高氏一号培养基为常用的放线菌生长培养基,其他 2 种为文献^[4]所推荐使用的培养基。

表 1 添加抑制剂后 3 种培养基分离微生物的效果比较

| 培养基 | 总菌落中放 线菌比例 | 放线菌中链 霉菌比例 |
|-------------|---------------|---------------|
| 高氏一号培养基 | 90%以上 | 80%以上 |
| 改良高氏二号改良培养基 | 90%以上 | 60%左右 |
| 海藻糖-脯氨酸培养基 | 90%以上 | 50%左右 |

试验结果证明,添加抑制剂以后,3 种培养基上生长出的微生物都以,且添加抑制剂后分离得到的放线菌以常见链霉菌为主,影响了分离的效果。而其他 2 种分离培养基基本上都具有较好的分离效果。

2.3 放线菌 A-5.6 的鉴定

从分离平板上,分离得到 1 株放线菌 A-5.6,该

菌株不产生菌丝,菌落紧密无皱褶,基内菌丝为橘红色。经过初步试验,该菌株具有产 α -葡萄糖苷酶抑制剂的能力。

表 2 放线菌 A-5.6 培养特征

| 培养基 | 基内菌丝颜色 | 生长情况 |
|--------------|--------|------|
| 蔗糖查氏培养基 | 橙 色 | ++ |
| 马铃薯琼脂 | 浅褐色 | + |
| 葡萄糖天冬门素琼脂培养基 | 金黄色 | +++ |
| 高氏一号培养基 | 浅黄色 | + |

表 3 放线菌 A-5.6 生理生化试验结果

| 检验项目 | 试验结果 |
|---------------------|------|
| 明胶水解 | + |
| 牛奶胨化 | - |
| H ₂ S 产生 | - |
| 淀粉分解 | - |
| 果糖、蔗糖、乳糖利用 | - |
| 麦芽糖、蔗糖利用 | + |
| 纤维素生长 | - |
| 可溶性色素 | - |
| 抗生素产生(抗细菌、真菌、酵母菌) | - |

参照《放线菌的分类与鉴定》手册,初步判定,该菌株为游动放线菌属。

2.4 游动放线菌 A-5.6 的产物分析

将发酵液离心后,进行 HPLC 分析,并且与阿卡波糖的标准品图谱进行比较(图 3、图 4)。

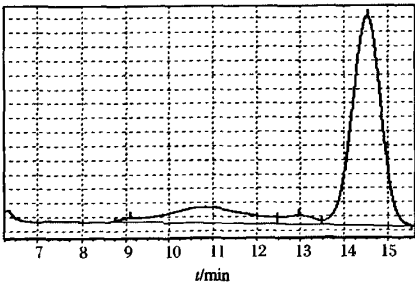


图 3 阿卡波糖标准品检测图谱

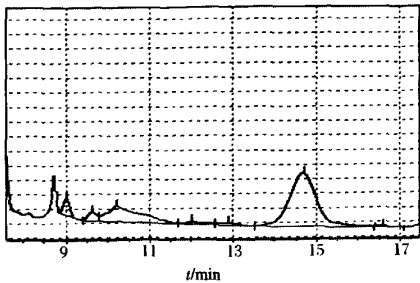


图 4 发酵液样品检测图谱

经过与标准品图谱的比较,初步认为,该菌株具

有产阿卡波糖的能力。

2.5 游动放线菌 A-5.6 发酵培养基碳源优化试验

分别采用蔗糖、麦芽糖、葡萄糖以及等比例混合的复合碳源,浓度均控制为 30g/L,其他成分保持不变,进行发酵,结果如图 5 所示。

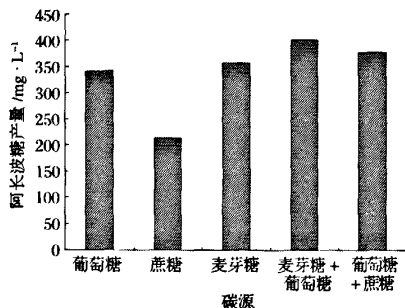


图 5 碳源对阿卡波糖产量的影响

从图 5 结果可以看出,采用复合碳源,发酵单位均比较高,尤其是麦芽糖与葡萄糖所组成的复合碳源,发酵单位比单独采用葡萄糖的出发培养基高出 18%。这一点与文献的报道是一致的^[8]。

3 讨论

(1)从土壤中得到 1 株稀有放线菌,经过初步鉴定,该菌株为游动放线菌属 (*Actinoplanes*),通过对该菌株发酵液的分析,表明该菌株具有产 α -糖苷酶抑制剂——阿卡波糖的能力。

(2)线菌在土壤含量较少,采用常规的分离方

法一般不易获得。对样品进行风干并用 CaCO_3 处理,同时在培养基中添加适量重铬酸钾作为抑制剂,对采集到的样品进行分离,结果表明,这种分离方法可以显著的抑制细菌和真菌的生长,得到较高的稀有放线菌筛出率。

参考文献

- Martin A E, Montgomery P A. Acarbose: an α -glucosidase inhibitor[J]. American Journal of Health-System Pharmacy, 1996, 53(19): 2 277~2 290
- Hollander P, Pi-Sunyer X, Coniff R F. Acarbose in the treatment of type I diabetes[J]. Diabetes Care, 1997; 20 (3): 248~253
- 孙 敏,王欣荣,隆 泉,等. α -糖苷酶抑制剂 SH-9766 的分离和鉴别[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 75~77
- 姜 怡,段淑蓉,唐蜀昆,等. 稀有放线菌分离方法[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 181~183
- 张学武,张建丽. 稀有放线菌的选择性分离[J]. 生命科学仪器, 2005, 3(6): 17~20
- 肖 炜,李铭刚,崔晓龙,等. 几种选择性分离稀有放线菌的方法[J]. 微生物学通报. 2006, 33 (1): 133~137
- 朱婉宜,陶美珍,邢红燕,等. 阿卡波糖产生菌的诱变育种[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(1): 17~18
- 高敬红,何建勇,田 威,等. 碳源物质对阿卡波糖生物合成的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(5): 385~388
- 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992
- 赵 元,张莲英,胡晓燕,等. 1 种新的天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化及其活性测定[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(1): 20~22

Isolation and Identification of a Rare Actinomycetes Strain Producing α -glucosidase Inhibitor

Cheng Xin, Xu Bo, Wei Saijin, Qiu Xiuwen, Tu Guoquan

(College of Biological Science and Engineering, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

ABSTRACT A rare actinomycetes was isolated from soil. The result showed that this strain was belong to *Actinoplane* and it has the ability of producing α -glucosidase inhibitor-acarbose, and the efficiency of isolation can be improved apparently when the soil was treated with airflow drying and CaCO_3 .

Key words rare actinomycetes, α -glucosidase inhibitor, acarbose, screening

信
息
窗

巴斯夫聚氨酯部门推出新生物基多元醇

巴斯夫聚氨酯部门宣布,其研发出一种新的 PluracolBalance50 生物基多元醇。这种多元醇是作为石油衍生的多元醇替代品,用于软泡生产领域,如家具、床垫等。虽然是生物基,但并不是用人们日常的食物作原料。另外,Balance50 多元醇的生产与现有设备和工艺都很兼容,因此无需对生产人员特别的培训,设备也无需改良,也就不会耽搁生产。

Balance50 多元醇含有 31% 的可再生成分,完全可以替代石油衍生的多元醇,而且成品泡沫中也含有 20% 的可再生成本与传统石油衍生的多元醇相比,Balance50 多元醇生产过程中可以减少 49% 的固体废弃物排放量和 20% 的废气排放量。