

# 大孔吸附树脂分离纯化发酵液中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的研究

张晓琦<sup>1</sup>, 杨明琰<sup>1,2</sup>, 马瑜<sup>1</sup>, 田稼<sup>1</sup>

(1.陕西省微生物研究所, 陕西 西安 710043; 2.西北大学化工学院, 陕西 西安 710069)

**摘要:** 本实验研究了大孔吸附树脂对发酵液中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的吸附分离特性。选择7种大孔吸附树脂, 通过比较其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的吸附率和解吸率, 筛选出最佳吸附剂, 并对其吸附动力学特征及解吸条件进行了研究。结果表明: 大孔吸附树脂 SZ<sub>4</sub> 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂有较好的吸附和解吸效果, 其吸附的最佳工艺条件为: pH6.0, 上样流速为 4.5BV/h 时, 其动态贯穿吸附量为  $6.3 \times 10^3$  U/g 树脂。30% 乙醇浓度可将  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂洗脱下来, 解吸率达 88%。用大孔吸附树脂 SZ<sub>4</sub> 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂进行吸附分离具有吸附量大、解吸容易、再生方便的特点, 十分适合于发酵液中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化。

**关键词:** 发酵液;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂; 大孔吸附树脂; 吸附; 分离

## Study on Adsorption and Separation of $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from Fermentation Broth of *Streptomyces* sp. DO406 with Macroporous Resin

ZHANG Xiao-qi<sup>1</sup>, YANG Ming-yan<sup>1,2</sup>, MA Yu<sup>1</sup>, TIAN Jia<sup>1</sup>

(1. Shaanxi Microbiology Institute, Xi'an 710043, China;

2. College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract:** Seven types of macroporous resin were compared on their adsorption and desorption performances to  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from fermentation broth of *Streptomyces* sp. DO406. The optimal resin was selected and its dynamic adsorption characteristics and desorption conditions were studied. Results showed that SZ<sub>4</sub> resin presents the highest adsorption and desorption capacities to the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, and its optimal adsorption conditions are: pH 6.0 and flow rate 4.5 BV/h. The maximum adsorption is  $6.3 \times 10^3$  U/g resin. When 30% ethanol is used as eluant, the desorption rate is 88%. SZ<sub>4</sub> shows better adsorption and desorption capacity to  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, so it is appropriate to separate  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from fermentation broth.

**Key words:** fermentation broth;  $\alpha$ -glucosidase inhibitor; macroporous resin; adsorption; separation

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)12-0058-04

$\alpha$ -葡萄糖苷酶是一类生物体中非常重要的酶, 它不仅是维持生物体正常代谢的关键性酶, 同时也和许多因代谢紊乱引起的疾病密切相关, 因而可以通过抑制此类酶的活性来达到预防和治疗某些疾病的目的。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂是近年来新型糖尿病治疗药物的研发热点<sup>[1]</sup>, 它通过抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性, 减少食物中碳水化合物的消化, 延缓葡萄糖的生成和吸收, 从而达到降低餐后高血糖, 减少其并发症发生的目的, 是 II 型糖尿病患者常用的控制血糖的药物。目前在临床上应用的阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇等糖尿病治疗药

物都属于  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂类药物<sup>[2]</sup>。

本研究从新疆、甘肃等地的土样中筛选分离得到一株白色链霉菌, 并从其发酵液中分离到一种新型  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂, 它对猪胰  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶都具有强烈的抑制作用, 其抑制活性高于阿卡波糖, 且其活性成分对酸、碱及热都具有较高的稳定性, 因而在降糖药物的开发上具有很强的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

收稿日期: 2007-10-24

基金项目: 中科院“西部之光”资助项目(2005DF01); 陕西省科技攻关项目(2005K10-G1-07);

陕西省科学院科技攻关项目(2005K-17)

作者简介: 张晓琦(1954-), 女, 副研究员, 研究方向为天然活性产物提取。E-mail: zhangxq282@163.com

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂发酵菌种: 链霉菌 D0406 由本实验室筛选得到。

大孔吸附树脂 SZ<sub>1</sub>、SZ<sub>2</sub> 河北沧州宝恩化工有限公司; SZ<sub>3</sub>、SZ<sub>4</sub>、SZ<sub>5</sub>、SZ<sub>6</sub> 漂莱特(中国)有限公司; SZ<sub>7</sub> 西安蓝晓科技有限公司;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶、猪胰  $\alpha$ -淀粉酶 Sigma 公司; PNPG E-Merck 公司; 其余试剂均为分析纯。

恒温振荡摇床、旋转蒸发仪、高速离心机、酸度计、自动收集仪。

## 1.2 培养基组成及培养方法

斜面培养基: 高氏一号。

种子培养基: 可溶性淀粉 1%、葡萄糖 1%、蛋白胨 0.8%、NaCl 0.3%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%、MgSO<sub>4</sub> 0.1%、pH7.0~7.2。

发酵培养基: 可溶性淀粉 1%、葡萄糖 1%、蛋白胨 0.8%、黄豆饼粉 0.2%、NaCl 0.3%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%、MgSO<sub>4</sub> 0.1%、pH7.0~7.2。

培养方法: 摇瓶培养, 500ml 三角瓶, 装量 100~125ml, 用接种铲接入培养 48h 的斜面菌种约 0.5cm<sup>2</sup> 于种子培养基, 往复式摇床 28~30℃ 摇瓶培养 72h, 10% 接种量接入发酵培养基, 往复式摇床 28~30℃ 摇瓶培养 144h 左右。

## 1.3 发酵液预处理

发酵液 → 酸化至 pH2.0 → 加热煮沸 → 离心 → 阳离子交换树脂脱色、除盐 → 阴离子交换树脂脱色、除盐、中和 pH 值至 6.0, 备用。

## 1.4 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的测定

参照参考文献[3]进行。

## 1.5 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的测定

参照参考文献[4]进行。

## 1.6 大孔吸附树脂的预处理<sup>[5]</sup>

将实验用大孔吸附树脂用 95% 乙醇充分浸泡过夜。采用湿法将树脂缓慢装入直径为 2.5cm 的层析柱, 用去离子水冲洗至流出液不出现白色浑浊, 无乙醇气味后, 用 3~5BV 5% 氢氧化钠, 以 4~6BV/h 的流速淋洗至碱性, 用去离子水冲洗至中性; 然后用 4~6BV/h 5% 盐酸淋洗至酸性, 最后用去离子水反复冲洗至中性备用。

## 1.7 静态吸附解吸实验<sup>[6]</sup>

分别称取 7 种经预处理好的大孔吸附树脂各 0.5g(按含水量换算的干重), 置于 100ml 具塞三角瓶中, 加入 30ml 发酵滤液, 放入摇床 25℃ 振荡吸附 120min, 待其充分吸附后, 测其平衡液中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂和  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂浓度。除去吸附液, 加入 30ml 30% 乙醇振荡解吸 120min, 旋转蒸发除去乙醇, 测其浓缩液中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂浓度和  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂浓度。

按下式计算静态吸附量、吸附率(%)、解吸率

(%)。选择吸附量和解吸率较高的大孔吸附树脂备用。

$$\text{静态吸附量 } Q(\text{U/g}) = (C_0 V_0 - C_e V_e) / M$$

$$\text{吸附率 } E_a(\%) = (C_0 V_0 - C_e V_e) / C_0 V_0 \times 100$$

$$\text{解吸率 } E_d(\%) = (Q_M - C_d V_d) / Q_M \times 100$$

式中,  $C_0$  为起始浓度 (U/ml);  $C_e$  为平衡浓度 (U/ml);  $C_d$  为洗脱液浓度 (mg/ml);  $V_0$  为起始体积 (ml);  $V_e$  为平衡体积(ml);  $V_d$  为洗脱液体积(ml);  $M$  为抽干树脂重量 (g)。

## 1.8 吸附动力学实验

准确称取 0.5g 树脂, 置于 100ml 具塞三角瓶中, 加入 30 ml  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂发酵滤液, 于室温下放入 120r/min 的摇床中振荡, 定时取样分析, 测其平衡液中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂和  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂残余浓度, 以  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂为指标计算吸附量, 绘制吸附动力学曲线。

## 1.9 动态吸附解吸实验

将大孔吸附树脂湿法分别装于三个 1.2cm × 40cm 的层析柱中, 将预处理过的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂发酵液样品以 1.5、3.0、4.5BV/h 的流速通过层析柱, 定时取样, 检测流出液的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂活性, 控制吸附终点, 绘制树脂的泄漏曲线。达到吸附平衡后, 用蒸馏水洗至流出液无色后, 再用 0~95% 的乙醇以 1.5BV/h 进行梯度洗脱, 分管收集, 10ml/管, 旋转蒸发除去洗脱液中的乙醇, 分别测定各管浓缩液中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂活性, 收集合并活性组分。冷冻干燥即可得到  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂样品。

## 2 结果与分析

### 2.1 树脂的筛选

采用静态吸附实验方法, 以各种大孔吸附树脂对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的吸附量、吸附率及解吸率为筛选指标进行筛选, 实验结果见表 1。

表 1 各种大孔吸附树脂对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的吸附及解吸效果  
Table 1 Adsorption and desorption effects of different macroporous resins to  $\alpha$ -glucosidase Inhibitor

树脂型号	极性	静态吸附量(U/g 干树脂)	吸附率(%)	解吸率(%)
SZ <sub>1</sub>	非极性	1.50 × 10 <sup>3</sup>	72.0	65
SZ <sub>2</sub>	非极性	1.47 × 10 <sup>3</sup>	70.0	68
SZ <sub>3</sub>	非极性	1.22 × 10 <sup>3</sup>	58.0	73
SZ <sub>4</sub>	非极性	2.10 × 10 <sup>3</sup>	98.0	88
SZ <sub>5</sub>	弱极性	1.89 × 10 <sup>3</sup>	90.0	85
SZ <sub>6</sub>	弱极性	1.42 × 10 <sup>3</sup>	67.5	82
SZ <sub>7</sub>	极性	1.37 × 10 <sup>3</sup>	40.0	78

树脂的极性是影响吸附功能的重要因素, 极性物质在非极性介质中易被极性吸附剂吸附, 非极性物质在极

性介质中易被非极性吸附剂吸附。实验所选用的树脂有非极性、弱极性和极性三种类型。由表 2 可知, 非极性的  $SZ_1$ 、 $SZ_2$ 、 $SZ_3$ 、 $SZ_4$  对  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的吸附量较大, 而极性树脂  $SZ_7$  的吸附量最小, 说明  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂是一种极性较弱的物质。而在几种非极性树脂中, 其中  $SZ_4$  对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的吸附量最高, 而其解吸率也最大, 因此通过吸附量和解吸率的比较, 选择  $SZ_4$  作为下一步实验的树脂材料。

## 2.2 吸附动力学实验

吸附过程中, 吸附速度的快慢也是一个十分重要的指标。由图 1 可知, 树脂  $SZ_4$  对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的吸附属于快速吸附平衡型, 在吸附 60min 内迅速达到吸附高峰, 在吸附 120min 就可以达到吸附平衡。

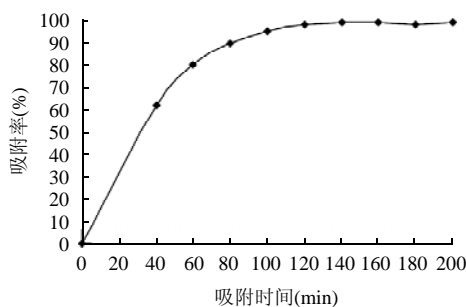


图 1  $SZ_4$  对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的吸附动力学曲线

Fig.1 Adsorption kinetic curve of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor on  $SZ_4$

## 2.3 动态吸附-解吸实验结果

### 2.3.1 $SZ_4$ 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的吸附泄漏曲线<sup>[6]</sup>

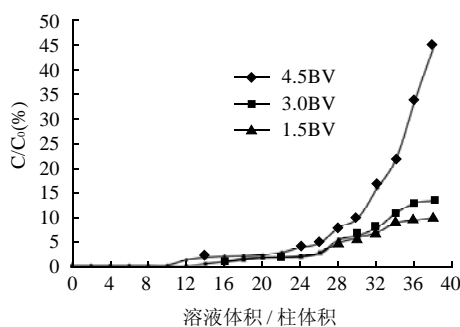


图 2  $SZ_4$  在不同流速下的穿透曲线

Fig.2 Breakthrough curves of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor at different flow rates

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂发酵滤液以 1.5、3.0、4.5BV/h 的流速通过层析柱, 定时取样, 测定流出液中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的活性, 绘制  $SZ_4$  对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制

剂的吸附泄漏曲线, 结果如 2 所示。从图 2 可知, 如果以流出液浓度  $C$  为上柱液浓度  $C_0$  的 10% 为贯穿点, 三种流速条件下达到贯穿点时吸附的溶液体积都很大, 这是因为  $SZ_4$  树脂对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的吸附量很大, 在较高的流速下已经可以吸附绝大部分活性组分了, 如果降低流速会使得操作时间延长, 效率降低, 而且发酵滤液在室温下放置时间过长容易污染, 因此综合考虑树脂的利用率和生产效率, 选择 4.5BV/h 的流速比较合适。

图 3 是在 pH6.0、流速为 4.5BV/h 条件下,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂样品液在  $SZ_4$  吸附树脂上的穿透曲线, 以流出液浓度  $C$  为上柱液浓度  $C_0$  的 10% 为贯穿点, 计算动态贯穿吸附量为  $6.3 \times 10^3$  U/g 树脂。

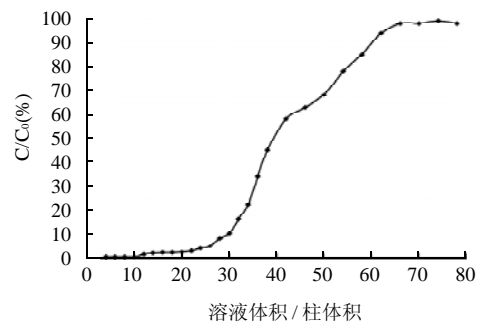


图 3  $SZ_4$  吸附树脂对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的穿透曲线

Fig.3 Breakthrough curve of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor at pH 6.0 and flow rate of 4.5 BV/h

### 2.3.2 $SZ_4$ 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的解吸实验

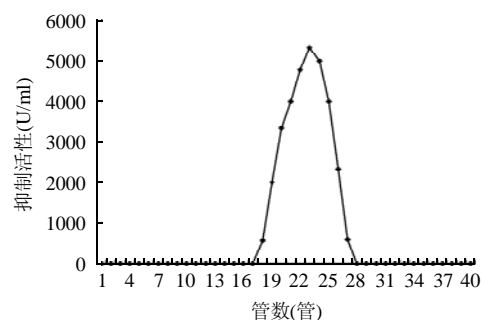


图 4  $SZ_4$  树脂动态解吸曲线

Fig.4 Desorption curve of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor

30BV 的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂发酵滤液以 4.5BV/h 的流速通过层析柱, 以 0~95% 的乙醇梯度洗脱, 洗脱流速 1.5BV/h, 10ml/管, 测定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的活性, 绘制解吸曲线, 见图 4。图 4 表明, 乙醇浓度为 20% 左右时, 大量的发酵液样品色素先洗脱下来, 乙醇浓度升高至 30% 左右时, 吸附在树脂上  $\alpha$ -葡萄糖苷

酶抑制剂被洗脱下来,洗脱峰主要集中在30%~35%的乙醇洗脱液里,峰窄且集中,无拖尾,收率高。之后树脂在高体积分数的乙醇洗脱下完成清洗再生,用水洗至无明显乙醇气味后即可重新使用。

### 3 结论与讨论

3.1 食物中的淀粉等碳水化合物首先在胰 $\alpha$ -淀粉酶的作用下降解成为寡糖,寡糖再通过小肠上皮绒毛膜刷状缘上的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶如蔗糖酶、麦芽糖酶等双糖酶的作用下分解成为葡萄糖最后进入血液成为血糖。本研究从白色链霉菌中筛选出的活性成分同时对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和 $\alpha$ -淀粉酶都具有强烈的抑制活性具有强烈的抑制活性,因此在降糖、降脂、减肥等领域具有很大的应用价值。

3.2 本实验筛选得到的大孔吸附树脂SZ<sub>4</sub>对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂具有吸附量大、洗脱剂浓度低、解吸容易、

再生方便的特点,同时还可除去发酵液中的部分色素,十分适合于发酵液中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化。

#### 参考文献:

- [1] 薛亚平,陈小龙,郑裕国.葡萄糖苷酶抑制剂类药物的研究与开发[J].中国现代应用药学杂志,2005,22(8):705-709.
- [2] 陈静,程永强,刘晓庆,等.食品中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的研究进展[J].食品科学,2007,28(4):360-363.
- [3] 赵元,张莲英,胡晓燕,等.一种新的 $\alpha$ -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.
- [4] 吕风霞,陆兆新. $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的研究进展[J].食品科学,2002,23(3):152-155.
- [5] 付玉杰,刘晓娜,侯春莲,等.大孔吸附树脂分离纯化异甘草素的研究[J].离子交换与吸附,2006,22(4):315-3