

# 应用柱前衍生化高效液相色谱法开辟了一种简单、快速的 DNJ 产生菌的筛选途径

曹小芳 王利强 白芳\* 白钢

(南开大学 药学院 天津市分子药物研究重点实验室 天津 300071)

**摘要:** 【目的】应用柱前衍生化高效液相色谱法筛选产 1-脱氧野尻霉素(DNJ)菌株, 并对其进行系统鉴定。【方法】利用茚甲氧酰氯(FMOC-Cl)柱前衍生化高效液相色谱法筛选 DNJ 产生菌; 通过形态特征、培养特征、生理生化特征以及 16S rRNA 序列相似性分析等多项分类方法对 DNJ 产生菌进行鉴定; 在 10 L 发酵罐水平进行发酵研究, 利用 FMOC-Cl 柱前衍生化高效液相色谱法测定 DNJ 含量。【结果】从 80 株具有  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂活性的土壤放线菌中筛选得到一株 DNJ 产生菌, 菌株编号为 PW409, 初步确定为戈壁三素链霉菌(*Streptomyces gobitrici*); 发酵研究表明, DNJ 为链霉菌 PW409 的次级代谢产物, 发酵液中 DNJ 浓度为 12.1 mg/L。【结论】首次将 FMOC-Cl 柱前衍生化高效液相色谱法应用于 DNJ 产生菌的筛选, 并首次报道从戈壁三素链霉菌发酵液中鉴定到 DNJ。

**关键词:** 1-脱氧野尻霉素, 戈壁三素链霉菌, 柱前衍生化, 多项分类

## Efficient screening of 1-deoxynojirimycin producing strain by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization

CAO Xiao-Fang WANG Li-Qiang BAI Fang\* BAI Gang

(College of Pharmacy and Tianjin Key Laboratory of Molecular Drug Research,  
Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract: [Objective]** To screen the 1-deoxynojirimycin producing strains by employing high

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21002052); 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(No. 10JCYBJC14300)

\*通讯作者: Tel: 86-22-23508371; 信箱: baifang1122@nankai.edu.cn

收稿日期: 2012-03-19; 接受日期: 2012-05-15

performance liquid chromatography with pre-column derivatization and then perform phylogenetic identification. [Methods] High performance liquid chromatography with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) pre-column derivatization was a way of screening the DNJ producing strains. The polyphasic taxonomic characteristics, including morphological, physiological and biochemical characteristics, as well as comparative sequence analysis of 16S rDNA were used to identify strain. Then, a fermentation study was carried out on the scale of 10 L fermentor and DNJ content was determined by high performance liquid chromatography with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) pre-column derivatization. [Results] A DNJ producing strain, namely PW409, which was subsequently identified as *Streptomyces gobitricini*, was obtained from 80 actinomycetes strains possessing  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. Fermentation study showed that DNJ belonged to a secondary metabolism of strain PW409, and the concentration of DNJ in fermentation broth was 12.1 mg/L. [Conclusion] This article first applies high performance liquid chromatography with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) pre-column derivatization to screen DNJ producing strains as well as first identifies DNJ from the fermentation broth of *Streptomyces gobitricini*.

**Keywords:** 1-Deoxynojirimycin, *Streptomyces gobitricini*, Pre-column derivatization, Polyphasic taxonomy

1-脱氧野尻霉素(1-Deoxynojirimycin, DNJ), 即多羟基哌啶生物碱, 是最具潜能的  $\alpha$ -糖苷酶的抑制剂之一, 也是降血糖、治疗糖尿病的有效成分<sup>[1-2]</sup>, 此外还具有抗病毒<sup>[3]</sup>、抗肿瘤转移<sup>[4]</sup>等药理作用, 在医药领域有广泛的应用。

DNJ 分子结构中缺少发色团, 很难直接采用高效液相色谱法测定其含量。茚甲氧酰氯(9-Fluorenylmethyl chloroformate, FMOC-Cl)柱前衍生化高效液相色谱法是一种灵敏准确的 DNJ 检测方法。FMOC-Cl 作为氨基酸衍生化试剂, 主要适用于伯胺和仲胺的衍生化, 反应后的衍生物具有稳定的荧光强度, 而 DNJ 分子中具有仲胺结构, 因此可以采用 FMOC-Cl 作为衍生化试剂对 DNJ 进行衍生化, 然后用高效液相色谱法进行分离测定, 该方法具有简便快速、衍生产物稳定等特点<sup>[5-6]</sup>。

土壤放线菌具有强大的生物合成能力, 一直以来都是人们筛选新型天然化合物的资源宝库。

本实验室应用  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂筛选模型对 2 000 株土壤放线菌进行筛选, 最终获得 80 株  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂生产菌<sup>[7]</sup>。本研究采用 FMOC-Cl 柱前衍生化高效液相色谱法对这 80 株放线菌的发酵液进行产 DNJ 检测, 旨在发现一株新的 DNJ 高产菌株, 并确定其分类学地位。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

乙腈为色谱纯, 购自德国默克公司; FMOC-Cl 和 DNJ 标准品(纯度大于 99%)均购自 Sigma 公司; 其余试剂为国产分析纯。 $\alpha$ -糖苷酶抑制剂产生菌为实验室保藏; 16S rRNA 序列测定工作由上海生工公司完成。发酵培养基(g/L): 可溶性淀粉 9, KNO<sub>3</sub> 11, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.32, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, pH 7.4。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 FMOC-Cl 柱前衍生化液相色谱法: 参照

文献[6]的方法。

(1) 样品衍生条件: 取 20  $\mu\text{L}$  菌株发酵液, 依次加入 20  $\mu\text{L}$  0.4 mol/L 的  $\text{K}_3\text{BO}_3$  缓冲液(pH 8.5), 100  $\mu\text{L}$  5 mmol/L 的 FMOCl (茚甲氧酰氯)乙腈溶液, 立即混匀。25  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min 后, 加入 50  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L 的甘氨酸水溶液混匀中止反应, 再加入 0.1%乙酸 10  $\mu\text{L}$ , 反应液经过 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清进行色谱分析。

(2) 色谱条件: SHIMADZU LC-20A 高效液相色谱仪; 检测器: DIONEX RF-2000 荧光检测器; 检测条件: 激发波长为 254 nm, 发射波长为 322 nm; 色谱柱: Phenomenex Luna C18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: A: 0.1%冰乙酸水溶液, B: 乙腈; 流动相梯度见表 1。流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

表 1 流动相梯度 Table 1 The gradient of flowing phase		
Time (min)	A (%)	B (%)
0	60	40
7	60	40
11	10	90
15	60	40
20	60	40

(3) 标准曲线与检出限: 取标准溶液系列进样测定。以标准溶液浓度 X 对色谱峰面积 Y 进行线性回归, 结果表明: 在浓度为 0.567–34 mg/L 范围内成良好的线性关系, 回归方程  $Y=3\,204.4+36\,892X$ , 相关系数  $r=0.999\,6$ 。按 3 倍基线噪音计算检出限为 0.03 mg/L。

**1.2.2 超高效液相色谱串联质谱法:** (1) 液相色谱条件: Waters Acquity™ 超高效液相色谱系统, 色谱柱采用 Waters Acquity BEH HILIC 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); PDA 检测:

190 nm–400 nm 扫描; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 2  $\mu\text{L}$ ; 流动相: A: 0.1%甲酸水溶液, B: 乙腈; 洗脱梯度: 95%–40% B (0–6 min)。

(2) 质谱条件: Waters Q-TOF Premier 质谱仪 (Waters MS Technologies, Manchester, UK); 电喷雾离子源; 正离子模式; 毛细孔电压 3.0 kV; 锥孔电压 30 V; 离子源温度 100  $^{\circ}\text{C}$ ; 脱溶剂气温度 350  $^{\circ}\text{C}$ ; 脱溶剂氮气流量 600 L/h; 锥孔气流量 50 L/h; 采样频率 0.1 s; 间隔 0.02 s; 扫描范围 100 D–1 000 D; Lockmass 采用 LEA ( $[\text{M}+\text{H}]^+=555.293\,1$ )。

**1.2.3 菌株 PW0852 的多项分类:** 参照文献[8]进行。

**1.2.4 发酵研究:** 350 mL 种子液 28  $^{\circ}\text{C}$  摇床培养 48 h 后, 转入 10 L 发酵罐 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 56 h (转速 200 r/min, 空气流速 3 L/min, 并监测溶氧和 pH), 每 8 h 取样 50 mL 测定菌丝干重和 DNJ 含量。DNJ 含量按 1.2.1 节的方法, 以峰面积外标法测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNJ 产生菌的筛选

利用柱前衍生液相色谱法, 以 DNJ 标准品为对照, 对 80 株  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂产生菌<sup>[7]</sup>的发酵液进行 DNJ 检测, 发现只有在菌株 PW409 的发酵液中能够检测到 DNJ 的存在, 如图 1 所示, DNJ 的保留时间为 3.7 min。

### 2.2 PW409 发酵液中 DNJ 的鉴定

采用超高效液相色谱串联质谱法对 PW409 的发酵液成分进行分析, 按照 1.2.2 所述条件, 得到发酵液中 DNJ 的质谱鉴定图(图 2), 其中质核比  $[\text{M}+\text{H}]^+$  为 164.094 7, 鉴定为 DNJ, 说明菌株 PW409 能够发酵产生 DNJ。

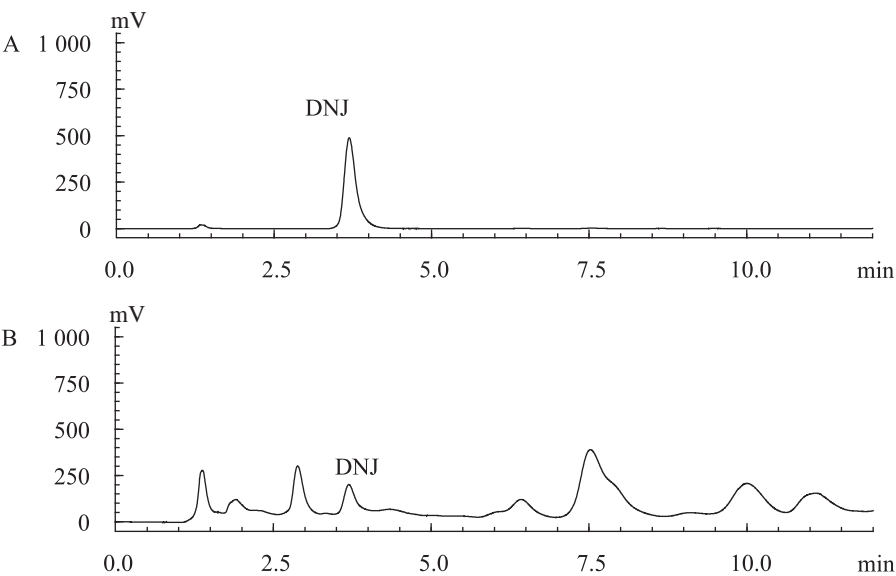


图 1 液相色谱图  
Fig. 1 Chromatogram

注: A: DNJ 标准品; B: PW409 发酵液.  
Note: A: DNJ; B: The fermentation broth of strain PW409.

2.3 DNJ 生产菌株 PW409 的分类地位

2.3.1 菌株 PW409 的形态和培养特征: 菌株 PW409 在高氏一号固体培养基上生长良好, 表现出典型的链霉菌菌落特征, 具有丰富的气生和基内菌丝。气生菌丝呈现米粉色, 基内菌丝是无色至淡黄色, 不产生扩散性色素。在不同组分的固体培养基上, 菌株 PW409 的培养特征如表 2 所示。10 000 倍电镜下观察, 气生菌丝有直孢子丝, 也有 2-3 个环的螺旋孢子丝, 个别孢子呈现表面光滑的卵形(图 3)。

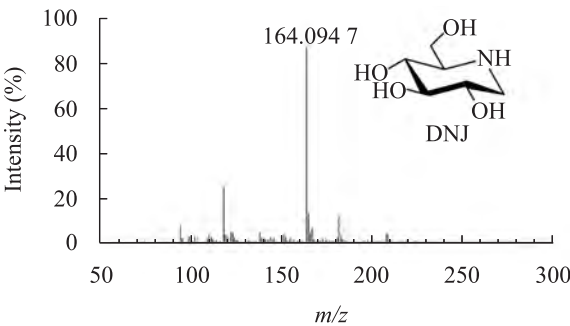


图 2 发酵液中 DNJ 的质谱鉴定图  
Fig. 2 The mass spectrogram of DNJ from fermentation broth

表 2 菌株 PW409 在不同培养基上的培养特征 Table 2 The culture characteristics of PW409 on various agar media			
培养基 Media	气生菌丝 Aerial mycelia	基内菌丝 Substrate mycelia	色素 Pigments
Gause' No.1 synthetic medium agar	Cream pink	Colorless to light yellow	None
Potato infusion agar	Cream pink	Brown yellow	None
Starch agar	Cream pink	Brown yellow	None
Glucose asparagines agar	Light yellow	Yellow	None
Czapek's medium agar	Light pink	Light pink	None

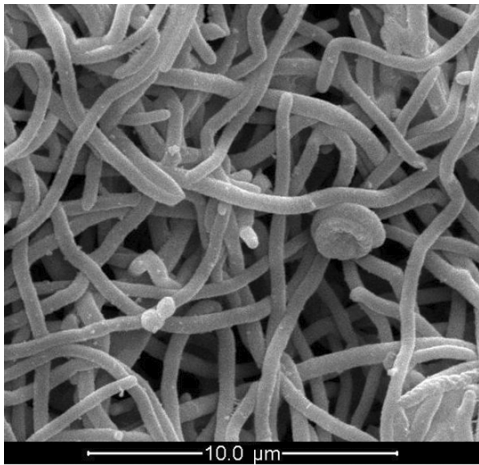


图 3 PW409 的扫描电子显微镜照片(10 000×)  
Fig. 3 Scanning electron micrograph of strain PW409 (10 000×)

**2.3.2 菌株 PW409 的生理生化特性:** 如表 3 所示, PW409 能够水解淀粉并使牛奶酪化和凝固,同时可以在果糖、木糖、蔗糖、纤维糖、葡萄糖和山梨醇的培养基上生长,这就说明菌株 PW409 能够利用广泛来源的碳源,其利用碳源的能力极强。

**2.3.3 16S rRNA 序列分析:** 菌株 PW409 的 16S rRNA 核酸序列全长为 1 482 bp, 该序列已提交

GenBank, 登录号为 FJ820337。将所得序列与 GenBank 核酸数据库中的相关种进行比较, 发现菌株 PW409 与链霉菌属(*Streptomyces*)的 16S rRNA 序列同源性都很高, 其中与戈壁三素链霉菌(*S. gobitrici*)具有 99.66%的相似性, 仅存在 5 个核苷酸的差异(图 4)。结合它的形态学特征、培养特征和生理生化特征, 最终将菌株 PW409 的分类地位初步确定为戈壁三素链霉菌。

2.4 DNJ 产生菌 PW409 的发酵

菌株 PW409 的整个发酵过程在 10 L 不锈钢机械搅拌全自动型发酵罐中完成, 发酵曲线如图 5 所示。发酵过程的前 16 小时, 菌株 PW409 处于延滞期, 菌体生长缓慢, 菌丝干重几乎保持不变, 同时 pH 快速降低; 16 h 后, 直至 40 h, 溶氧值迅速降低, 菌株 PW409 处于对数生长期, 在此期间, 菌体生长迅速, DNJ 开始少量合成和分泌; 40 h 以后, 菌株 PW409 进入稳定期, 菌体几乎不再生长, DNJ 在此时开始大量合成和分泌, 在本实验所采用的发酵条件下, 52 h 时发酵液中 DNJ 浓度最高, 达到 12.1 mg/L。从 DNJ 的产生过程来看, 它非常符合次级代谢产物的合成特征。

表 3 菌株 PW409 的生理生化特征 Table 3 The physiological and biochemical properties of PW409			
特征 Characteristics	结果 Results	特征 Characteristics	结果 Results
Starch hydrolysis	+	Growth in fructose	+
Gelatin liquefaction	—	Growth in galactose	—
Cellulose hydrolysis	—	Growth in rhamnose	—
Milk coagulation	+	Growth in xylose	+
Milk peptonization	+	Growth in mannitol	—
H <sub>2</sub> S production	—	Growth in sucrose	+
Melanin production	—	Growth in inositol	+
Growth in glucose	+	Growth in sorbitol	+

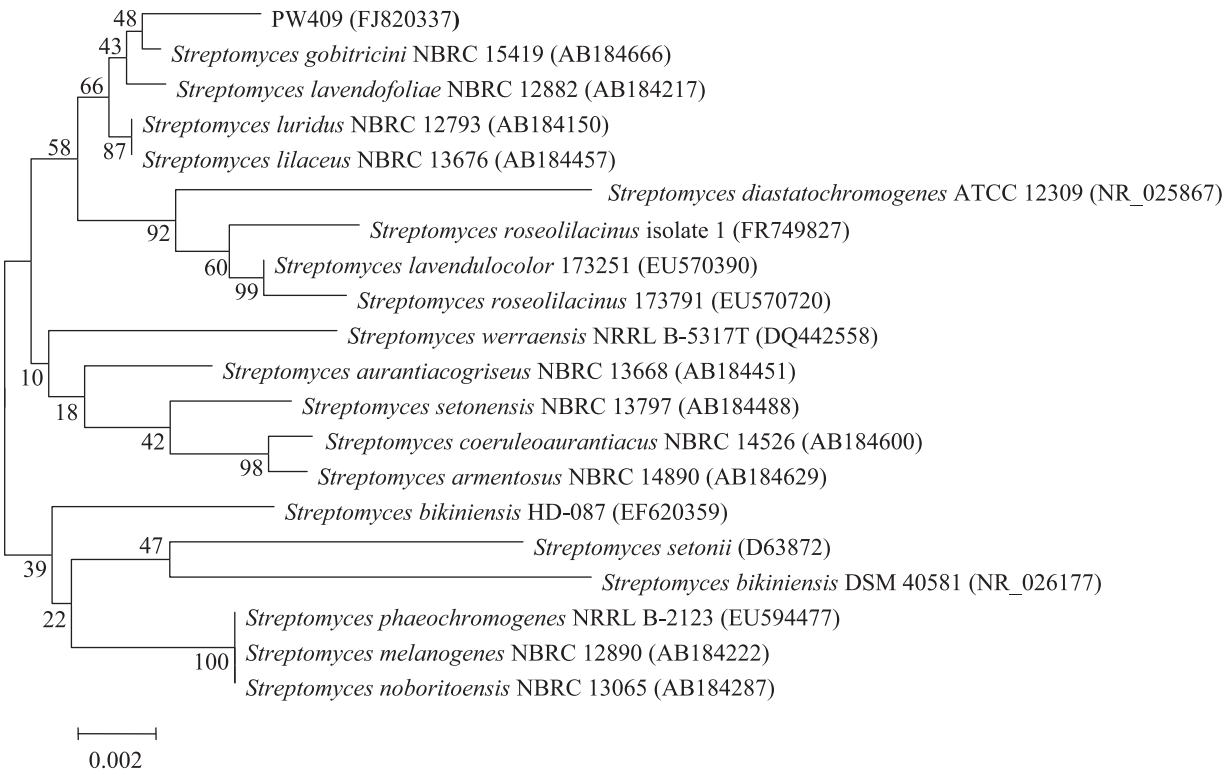


图 4 菌株 PW409 和相关菌株的 16S rRNA 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree showing the relationships between strain PW409 and reference strains base on the 16S rRNA gene sequences

注：括号内表示在 GenBank 的序号；分支点的数字表示由 Bootstrap 得到的置信度；短线表示 0.2% 的序列差异。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar: 0.2% sequence divergence.

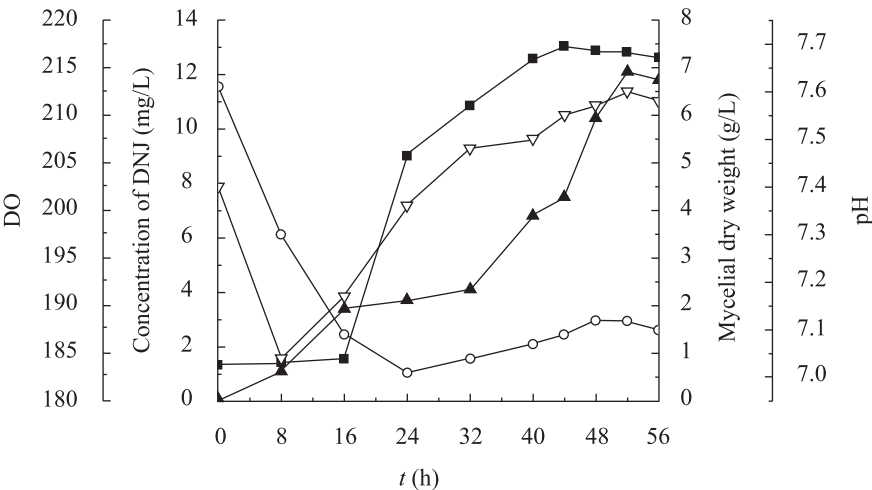


图 5 菌株 PW409 的发酵过程

Fig. 5 Time courses of DNJ production during fermentation of strain PW409

注：▽: pH; ○: 溶氧; ▲: DNJ 浓度; ■: 菌丝干重。

Note: ▽: pH; ○: Dissolved oxygen; ▲: Concentration of DNJ; ■: Mycelial dry weight.

### 3 讨论

DNJ 主要来源于植物和微生物。目前,用于药物生产的 DNJ 主要从桑科植物桑(*Morus alba* L.)中获得,其在桑树叶子里的含量可达约 0.1%–0.3%<sup>[9]</sup>;经报道的微生物资源则包括链霉菌属和芽孢杆菌<sup>[10–11]</sup>。1980 年 Murao 等<sup>[12]</sup>从链霉菌中筛选出一种可以产生二糖酶抑制剂的菌株 *Streptomyces lavendulae* subsp. *Trehalostaticus* No. 2882, 分离鉴定结果表明这是一种不同于其他蛋白类抑制剂的物质,最后证明其产生的抑制剂正是 DNJ。1984 年 Daniel 等<sup>[13]</sup>首次从芽孢杆菌 DSM704 的发酵液中分离获得 DNJ。

由于微生物发酵液成分复杂多样,且活性物质的含量往往较低,很难直接用高效液相色谱法进行筛选,因此,以往微生物来源的 DNJ 都是通过生物学筛选手段(如酶抑制剂模型)获得。本文应用柱前衍生化高效液相色谱法开辟了一种简单、快速的 DNJ 产生菌筛选途径,从 80 株土壤放线菌中筛选到一株 DNJ 产生菌 PW409,经多项分类鉴定为戈壁三素链霉菌(*Streptomyces gobitrici*)。对于链霉菌来说,迄今为止有报道的 DNJ 产生菌株均是淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*)<sup>[10,12,14]</sup>,本文首次报道了戈壁三素链霉菌也具有合成和分泌 DNJ 的能力。菌株 PW409 的发酵研究表明, DNJ 在菌体生长进入稳定期后大量合成并分泌,说明 DNJ 为链霉菌 PW409 的次级代谢产物,发酵液中 DNJ 浓度可达 12.1 mg/L。

### 参考文献

- [1] 胡竟一, 雷玲, 刘亚欧, 等. 桑叶的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用研究[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(6): 44–45.
- [2] Oku T, Yamada M, Nakamura M, et al. Inhibitory effects of extractives from leaves of *Morus alba* on human and rat small intestinal disaccharidase[J]. British Journal of Nutrition, 2006, 95(5): 933–938.

- [3] 彭忠田, 申瑾, 谭德明, 等. 脱氧野尻霉素衍生物抗乙型肝炎病毒的体外试验研究[J]. 中国药房, 2007, 18(1): 22–24.
- [4] Tsuruka T, Fukuyasu H, Ishii M, et al. Inhibition of mouse tumor metastasis with nojirimycin-related compounds[J]. The Journal of Antibiotics, 1996, 49(2): 155–161.
- [5] Kim JW, Kim SU, Lee HS, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1002(1/2): 93–99.
- [6] 欧阳臻, 陈钧, 李永辉. 柱前衍生化高效液相色谱荧光检测法测定桑叶中的 1-脱氧野尻霉素[J]. 分析化学, 2005, 33(6): 817–820.
- [7] 孟鹏, 齐西珍, 郑芳, 等.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂高通量筛选模型的建立及其应用[J]. 微生物学报, 2010, 50(8): 1080–1086.
- [8] 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[J]. 微生物学报, 2007, 47(1): 7–10.
- [9] Song W, Wang HJ, Bucheli P, et al. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(19): 9133–9140.
- [10] Ezure Y, Maruo S, Miyazaki K, et al. Moranoline (1-Deoxynojirimycin) fermentation and its improvement[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1985, 49(4): 1119–1125.
- [11] 朱运平, 李秀婷, 李里特. *Bacillus subtilis* B2 产 1-脱氧野尻霉素(DNJ)发酵条件优化[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 290–293.
- [12] Murao S, Miyata S. Isolation and characterization of a new trehalase inhibitor S-GI[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1980, 44(1): 219–221.
- [13] Daniel C, Stein T, Leslie K, et al. Characterization of *Bacillus subtilis* DSM704 and its production of 1-deoxynojirimycin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 48(2): 280–284.
- [14] 周乐春, 魏兆军, 张海祥, 等. 产 1-脱氧野尻霉素微生物菌株的筛选与鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 361–364.