

文章编号:1673-1689(2005)03-0048-04

α -糖苷酶抑制剂 SH-9766 产生菌的筛选和鉴别

孙敏, 王欣荣, 隆泉, 张颖, 何璧梅

(四川抗菌素工业研究所, 四川 成都 610051)

摘要: 为了定向筛选 α -糖苷酶抑制剂, 建立了抑制 α -淀粉酶、蔗糖酶和麦芽糖酶活试验为基础的筛选模型。采用此模型筛选从土壤和植物中分离的放线菌, 其中菌株 E-3519 的发酵液对 α -淀粉酶和蔗糖酶有强烈的抑制作用。菌株 E-3519 无气丝, 基丝生长好, 偶见孢囊, 孢囊孢子游动迟缓; 能水解淀粉, 硝酸盐还原实验阳性, 产生硫化氢, 能使牛奶冻化; 能利用大多数碳源; 对枯草杆菌、大肠杆菌、金色葡萄球菌等无拮抗作用; 可产生 α -糖苷酶抑制剂阿卡波糖。E-3519 主要生化特征及形态学特征与 ATCC14539 相似, 命名为 *Actinoplanes utahensis* var. .

关键词: α -糖苷酶抑制剂; E-3519; 菌种鉴别

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Screening of SH-9766, an Inhibitor of α -Glucosidase from Microorganisms and its Taxonomy

SUN Min, WANG Xin-rong, LONG Quan, ZHANG Ying, HE Bi-mei

(Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu 610051, China)

Abstract: To screen α -glucosidase inhibitor, three methods using the inhibitor activity of amylase, sucrase, maltase as models were established. During the screening program of α -glucosidase inhibitor, It was found that, the culture broth of strain E-3519 exhibited amylase and sucrase inhibitory activity. Strain E-3519 produced fine branching mycelium without aerial mycelium, sporangia were rare or absent, spores in sporangium moved slowly. Starch hydrolysis, nitrate reduction, milk peptonization and H_2S production were positive. Strain E-3519 could utilize most of carbon sources and the fermentation broth appeared no activities against G^+ , G^- . Acarbose could also be produced during the cultivation. Strain E-3519 was extremely similar to ATCC14539 and was named as *Actinoplanes utahensis* var. .

Key words: α -glucosidase inhibitor; E-3519; taxonomy

糖尿病是威胁人类健康的主要疾病之一, 治疗糖尿病药物大体分为 4 类: 1) 胰岛素: 主要用于 I 型糖尿病; 2) 促进胰岛素分泌剂: 如磺酰脲类; 3) 胰岛素增敏剂: 如屈吉他宗等噻唑烷衍生物类; 4) α -糖

苷酶抑制剂: 如阿卡波糖, 伏利波糖等。后 3 类主要用于 II 型糖尿病的治疗。 α -糖苷酶抑制剂能竞争性地阻断存在于小肠粘膜微绒毛膜表面的淀粉酶、麦芽糖酶和蔗糖酶等酶活性, 结果使摄入的多糖、寡

收稿日期: 2004-09-03; 修回日期: 2004-12-04.

作者简介: 孙敏(1969-), 女, 四川成都人, 副研究员, 理学硕士.

万方数据

糖、双糖消化成葡萄糖等单糖的过程受抑制,从而减少碳水化合物的消化和吸收,有效地降低餐后血糖^[1,2]。

为了定向筛选 α -糖苷酶抑制剂,作者建立了3个筛选模型,筛选从土壤和植物中分离的各种放线菌。对 α -淀粉酶和蔗糖酶有强烈抑制作用的菌株 E-3519 发酵液中分离到 SH-9766,其理化性质及波谱分析表明与阿卡波糖同质,菌株 E-3519 经鉴定为犹他游动放线菌变种。作者报道了筛选模型的建立、抑制剂的筛选及 E-3519 菌种的鉴别。

1 材料与方 法

1.1 酶

α -淀粉酶:无锡杰能科生物工程有限公司产品,蔗糖酶和麦芽糖酶从猪小肠中提取。

1.2 培养基

1.2.1 分离培养基和斜面培养基(高氏一号) 可溶性淀粉 2 g/dL, K_2HPO_4 0.05 g/dL, KNO_3 0.3 g/dL, $MgSO_4$ 0.05 g/dL, NaCl 0.05 g/dL, $FeSO_4$ 1 μ g/dL, 琼脂 2 g/dL, pH 7.2~7.4。

1.2.2 筛选用发酵培养基 淀粉 4 g/dL, 葡萄糖 2 g/dL, 黄豆粉 2 g/dL, $MgSO_4$ 0.05 g/dL, KH_2PO_4 0.05 g/dL, pH 7.2~7.4。

1.3 菌株

从四川甘孜州等地采集的土壤及植物样品中分离出各种放线菌,方法见文献^[3],26~28 °C 培养 4~10 d,待筛。

1.4 筛选样品的制备

将分离得到的各种放线菌接种于盛筛选培养基的摇瓶中,于 27 °C 培养 6 d,转速 220 r/min。过滤得菌丝和滤液。菌丝用甲醇浸提并浓缩至干,和滤液一起用于过筛。

1.5 筛选模型

影响人体糖类消化吸收的 α -糖苷酶主要是淀粉酶、蔗糖酶和麦芽糖酶,故采用抑制淀粉酶,蔗糖酶和麦芽糖酶活性作筛选模型。这3种酶能在适宜条件下分别催化淀粉、蔗糖和麦芽糖分解生成葡萄糖、果糖等产物,而其酶抑制剂则能抑制上述3种酶中的1种、2种或3种的对底物的催化反应。因此可以通过测定催化反应产物的多少来确定酶的活性,进而推测出是否有抑制剂的存在以及抑制剂的强弱。

1.5.1 α -淀粉酶抑制剂的筛选 约 0.2 mg 的菌丝提取物或 0.2 mL 的滤液加入 0.1 mol/L 的 pH 6.9 的磷酸缓冲液至 1 mL,加入 0.1 mL 的 α -淀粉酶

溶液(约 300 U/mL),35 °C 预热 15 min,再加入预热至 35 °C 的淀粉溶液 1 mL(1%),35 °C 保温 5 min,加入 2.0 mL 二硝基水杨酸贮备液,沸水浴 5 min,冷却,加水稀释。以不加淀粉酶的样品作对照,于 540 nm 处比色测定 OD 值,从淀粉酶活力标准曲线上读出残存的酶活力,计算出被抑制的百分比^[4]。同法测定市售阿卡波糖作为阳性对照。

1.5.2 蔗糖酶抑制剂的筛选 约 0.2 mg 的菌丝提取物或 0.2 mL 的滤液加入 0.2 mol/L 的 pH 6.0 的磷酸缓冲液至 1 mL,加入 0.1 mL 的蔗糖酶溶液(约 1.5 U/mL),35 °C 预热 15 min;再加入预热至 35 °C 的蔗糖溶液 0.2 mL(2%),35 °C 保温 20 min,加入 1.0 mL 碱性铜试剂中止反应,沸水浴 8 min,冷却,加入磷钼酸试剂 1.0 mL,摇匀,3 min 后加水稀释。以不加蔗糖酶的作对照,于 650 nm 处比色测定 OD 值。从蔗糖酶活力标准曲线上读出残存的酶活力,计算出被抑制的百分比。同法测定市售阿卡波糖作为阳性对照。

1.5.3 麦芽糖酶抑制剂的筛选 约 0.2 mg 的菌丝提取物或 0.2 mL 的发酵滤液加入 0.2 mol/L 的 pH 6.0 的磷酸缓冲液至 1 mL,加入 0.1 mL 的麦芽糖酶溶液(约 1 U/mL),35 °C 预热 15 min,再加入预热至 35 °C 的麦芽糖溶液 0.2 mL(2%),35 °C 保温 20 min,加入 1 mL 的葡萄糖氧化酶中止反应。35 °C 继续保温 30 min,加入 2 mL 硫酸溶液(50%),并在 545 nm 以不加麦芽糖酶的作对照测定 OD 值,从麦芽糖酶活力标准曲线上读出残存的酶活力,计算出被抑制的百分比。同法测定市售阿卡波糖作阳性对照。

2 实验结果

2.1 E-3519 菌株的获得

用上述3种筛选模型共过筛放线菌约4000株,呈阳性结果的菌株有57株。经多次复筛,选择 E-3519 菌株。菌株 E-3519 对 α -淀粉酶、蔗糖酶和麦芽糖酶抑制活性见表1。

表1 E-3519 发酵液对 α -淀粉酶、蔗糖酶和麦芽糖酶的抑制活性

Tab.1 Inhibitory activities of the culture broth of strain E-3519

酶	抑制活性/%
α -淀粉酶	91
蔗糖酶	36
麦芽糖酶	21

2.2 菌株鉴别

2.2.1 形态特征 菌株 E-3519 在下列培养基中于 28 °C 培养 5~30 d, 用肉眼观察和显微镜观察, 其培养特征见表 2. 该菌株无气丝, 基丝生长好, 无横隔, 多分枝, 直径 0.5 μm , 孢囊少有(在陈旧的葡

萄糖天冬素等培养基上偶见孢囊). 孢囊顶生, 浑圆或无规则, 壁波曲, 直径 5~12 μm , 孢囊柄无分枝, 端生孢囊. 孢囊孢子直径 1~2 μm , 亚浑圆, 游动迟缓. 在多种培养基上, 基丝生长良好, 表面光滑或有皱, 橙色或深橙色. 细胞壁 II 型, 糖 A 型.

表 2 E-3519 及参考株的培养特征

Tab. 2 Cultural characteristics of E-3519 and reference strains

培养基	E-3519	ATCC 14539	ATCC 43537	ATCC 14538
高氏一号	基丝好, 表面光, 橙色	基丝好, 表面光, 橙色	基丝好, 表面光, 岩棕色	基丝好, 表面皱, 橙色
察氏琼脂	基丝好, 表面皱, 橙色	基丝好, 表面光, 橙色	基丝好, 表面光, 赭石色, 有孢囊	基丝好, 表面皱, 赭红色, 偶见孢囊
克氏一号	基丝好, 表面光, 橙色	基丝好, 表面光, 橙色	基丝好, 表面皱, 赭褐色	基丝好, 表面皱, 粉橙色
葡萄糖酵母膏	基丝好, 表面光, 深橙色	基丝好, 表面光, 深橙色	基丝好, 表面光, 黑紫色, 有孢囊	基丝好, 表面光, 粉橙色
马铃薯葡萄糖	基丝好, 表面皱, 深橙色	基丝好, 表面光, 粉橙色	基丝好, 表面光, 深墨紫色	基丝好, 表面皱, 深橙色
葡萄糖天冬素	基丝好, 表面皱, 深褐色	基丝好, 表面光, 深褐色	基丝好, 表面光, 古铜紫色, 有孢囊	基丝好, 表面光, 深橙色

2.2.2 菌株 E-3519 的主要生理生化特征 菌株主要生理生化特征见表 3~5. 它能水解淀粉, 硝酸盐还原实验阳性, 产生硫化氢, 能使牛奶冻化; 除棉子糖、肌醇外, 几乎能利用各种碳源; 对枯草杆菌、大肠杆菌、金色葡萄球菌等无拮抗作用.

2.2.3 菌株鉴定 根据菌株 E-3519 主要生理生化特征及形态学特征, 初步认为其与参考株 ATCC14539 相似, 故命名为 *Actinoplanes ueatansis* var. (犹他游动放线菌变种).

表 3 E-3519 及参考株的主要生理生化特征

Tab. 3 Physiological properties of E-3519 and reference strains

试验特征	E-3519	ATCC 14539	ATCC 43537	ATCC 14538
明胶液化	±	±	-	-
牛奶凝固	±	+	-	+
牛奶冻化	+	+	-	+
纤维素利用	±	-	-	-
硫化氢产生	+	+	±	-
水解淀粉	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	-	+

作为筛选 α -糖苷酶抑制剂的筛选模型是一个简单可行的方法. 作者用此模型筛选到能同时抑制 α -淀粉酶和蔗糖酶活性的阿卡波糖产生菌 E-3519. 另外, 作者还用此筛选模型得到了野尻霉素(Norjirimycin)和脱氧野尻霉素(Deoxynorjirimycin)产生菌.

表 4 E-3519 及参考株的碳源利用实验结果

Tab. 4 Carbon sources utilization of E-3519 and reference strains

碳源	E-3519	ATCC 14539	ATCC 43537	ATCC 14538
D-葡萄糖	+	+	+	+
D-蔗糖	+	+	+	+
D-果糖	+	+	+	+
D-乳糖	+	+	+	+
D-木糖	+	+	+	+
L-阿拉伯糖	+	+	+	+
D-核糖	+	+	+	+
L-鼠李糖	+	+	+	+
D-甘露醇	+	+	+	+
棉子糖	-	-	-	-
肌醇	-	-	-	-
淀粉	+	+	+	+

3 讨论

万方数据
用于抑制 α -淀粉酶、蔗糖酶和麦芽糖酶活性

表5 E-3519及参考株的抗菌谱

Tab.5 Antigram of E-3519 and reference strains

抗菌谱	E-3519	ATCC 14539	ATCC 43537	ATCC 14538
枯草杆菌(501)	—	—	±	+
大肠杆菌(103)	—	—	—	±
金色葡萄球菌(209)	—	—	±	+
白色假丝酵母(477)	—	—	—	—
黑曲霉	—	—	—	—
产黄青霉	—	—	—	—
分枝杆菌(617)	—	—	—	—

2) 目前国外关于放线菌的分类是采用遗传学

手段,用指纹图谱来鉴别菌种的归属,而我国对放线菌的分类仍采用经典的形态学方法.作者对阿卡波糖生产菌 E-3519 的鉴别主要采用形态学方法.根据 E-3519 菌主要生化特征及形态学特征初步认为与 ATCC14539 相似,故命名为 *Actinoplanes utahensis* var. (犹他游动放线菌变种).

3) 阿卡波糖是治疗 II 型糖尿病的首选药物之一,由德国拜耳开发成功,于 20 世纪 90 年代先后在欧洲多国、美国、中国等几十个国家销售.菌株 E-3519 的获得及进一步的研究开发成功,有利于阿卡波糖生产实现国产化.

参考文献:

- [1] 蒋伯诚. 轻症糖尿病与胰岛素增敏剂和 α -糖苷酶抑制剂[J]. 国外医药, 1998, 19(2): 100-104.
- [2] Clissod S P, Clive Edwards. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential[J]. *Drugs*, 1998, 35: 214-243.
- [3] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 352-364.
- [4] Werner Frommer, Wuppertal, Horst Gericke, et al. Amino sugars and their use in improving the meat: fat ratio in animals[P]. 美国专利: USP 4065557. 1977-12-27.

(责任编辑: 李春丽)

(上接第 47 页)

- [4] Micoslav P, Gunther M, Wolfgang W. Function of *Corynebacterium glutamicum* promoters in *E. coli* *Streptomyces lividans* and *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Biotech*, 2003, 104: 325-334.
- [5] J 萨姆布鲁克, D 拉塞尔. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 黄培堂译, 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] Colinrh. Simon M C. Molecular Biological Method for Bacillus [M]. England: John Wiley & Sons Ltd, 1990.
- [7] Yasbin R E, Wilson G A, Young F E. Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: evidence for selective induction of prophage in competent cells[J]. *J Bacteriol*, 1975, 121: 296-304.
- [8] 施特尔马赫 B. 酶的测定方法[M], 钱嘉译. 北京: 中国轻工业出版社, 1990.
- [9] 厉朝龙. 生物化学与分子生物学实验技术[M], 杭州: 浙江大学出版社, 2000.
- [10] Hiruhisa Hirata, Tsuyoshi F, Shiji Negoro. Structure of a β galactosidase gene of *Bacillus stearothermophilus*[J]. *Journal of Bacteriology*. 1986, 166: 722-727.
- [11] 何笑松, 沈仁权, 盛祖嘉. 嗜热脂肪芽孢杆菌启动子克隆载体 pFDC4 和表达载体 pFDC11 的构建. 遗传学报[J]. 1990, 17(4): 313-320.
- [12] Masahiro Takagi, Tadayuki Imanaka, Shuichi Aiba. Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*[J]. *J Bacteriol*, 1985, 163(3): 824-831.
- [13] Norihiro T, Sumiko IR, Takuji S, et al. Efficient synthesis and secretion of a thermophilic α -amylase by protein-producing *Bacillus brevis* 47 Carrying the *B. stearothermophilus* amylase gene[J]. *J Bacteriol*, 1985, 164(3): 1182-1187.

(责任编辑: 杨萌, 李春丽)