

一株新的 α -淀粉酶抑制剂生产菌株 ZG0656 及其产物的发酵、分离、性质与应用

耿鹏^{1,3}, 石倩^{1,2}, 张奇², 白钢^{1,2}

1 南开大学生命科学学院, 天津 300071

2 南开大学药学院, 天津 300071

3 天津医科大学基础医学院, 天津 300070

摘要: 从土壤中分离并筛选得到了一株 α -淀粉酶抑制剂生产菌, 编号 ZG0656。根据形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞壁化学组成特征和 16S rDNA 全序列相似性比较分析等多相分类方法, 确认菌株 ZG0656 为天蓝黄链霉菌的新变种, 命名为天蓝黄链霉菌南开变种(*Streptomyces coelicoflavus* var. *nankaiensis*)。该菌经 10 L 发酵罐水平发酵, 发酵液中可积累一定量的 α -淀粉酶抑制剂。采用浓缩, 树脂吸附, 凝胶过滤, 减压干燥等方法得到 α -淀粉酶抑制剂混合物。该 α -淀粉酶抑制剂为含氮的拟低聚糖类物质, 能强烈抑制哺乳动物来源的 α -淀粉酶, 对餐后高血糖的形成有明显改善作用, 可用于制备治疗糖尿病、肥胖症的药物或功能性食品。

关键词: 天蓝黄链霉菌, 多相分类, 发酵, α -淀粉酶抑制剂, 糖尿病

A Novel Strain ZG0656 Producing α -Amylase Inhibitor and Fermentation, Separation, Properties, and Application of Its Products

Peng Geng^{1,3}, Qian Shi^{1,2}, Qi Zhang², and Gang Bai^{1,2}

1 College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

2 College of Pharmaceutical Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

3 College of Basic Medical Science, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: A strain ZG0656 producing α -amylase inhibitor was isolated from soil in this study. Polyphasic taxonomic studies were performed, including appearance characteristics, culture characteristics, phenotypic characteristics, cell walls chemical composition, nearly complete 16S rDNA sequence alignment with those of representative *Streptomyces* species. These results revealed that strain ZG0656 represents a novel variation of *Streptomyces coelicoflavus*, for which we propose the name *S. coelicoflavus* var. *nankaiensis*. After fermentation in a 10 L fermentor, α -amylase inhibitors were accumulated in the harvested broth of strain ZG0656. The α -amylase inhibitors we obtained were identified as aminooligosaccharides after concentration, resin-adsorption, gel-filtration, and desiccation. They could intensively inhibit α -amylase, depress postprandial blood glucose elevation obviously. Thus, the α -amylase inhibitors are expected to act as drugs or functional food against diabetes.

Received: March 12, 2008; **Accepted:** March 17, 2008

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA020502).

Corresponding author: Gang Bai. Tel/Fax: +86-22-23508371; E-mail: gangbai@nankai.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863)(No. 2006AA020502)资助。

Keywords: *Streptomyces coelicoflavus*, polyphasic taxonomy, fermentation, α -amylase inhibitor, diabetes

糖尿病是由胰岛素分泌不足和/或胰岛素作用受损引起的一组以高血糖为特征的代谢性疾病。流行病学的研究表明,餐后血糖水平是引起糖尿病人大血管并发症和微血管并发症的重要因素,这些并发症是引起糖尿病死亡率增大的一个主要原因。所以,严格控制餐后血糖对糖尿病的防治具有非常重要的意义,而能够显著降低餐后血糖水平的抗糖尿病药物具有很大的应用价值^[1]。

食物中的碳水化合物绝大部分是淀粉。与膳食一起进食后, α -淀粉酶抑制剂可与淀粉竞争而与唾液和胰液中的 α -淀粉酶结合,占据酶上淀粉结合位点,使淀粉的消化受阻。未被消化的碳水化合物被运送至小肠中下段及结肠,从而碳水化合物的消化吸收发生在整段小肠中,延缓和延长了餐后单糖(葡萄糖)的吸收,餐后血糖的增高被显著降低^[1]。

链霉菌是土壤中种类和数量庞大的一个微生物类群,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。本实验室利用稀释分离法从京、津、黑、辽、鲁、皖、闽、桂、滇等地区的 200 多份土壤样品中共分离到各种放线菌 2000 多株。发酵培养后,应用本实验室已建立的 α -淀粉酶/ α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型对菌株发酵液进行初筛和复筛。结果优选出两株菌株,ZG0416 和 ZG0656。

本研究对菌株 ZG0656 进行了较为详细的研究,包括用多相分类法确定其分类地位,在 10 L 发酵罐水平考察其发酵过程,对发酵产物进行初步分离提取与物理化学性质鉴定,以及对发酵产物的生物学活性进行初步分析等。

1 材料和方法

1.1 材料

所用的菌株为本实验室从土壤中分离得到的一株放线菌,编号 ZG0656。该菌株已于 2007 年 6 月 27 日保藏于“中国微生物种保藏管理委员会普通微生物中心”(北京市朝阳区大屯路甲 3 号中国科学院微生物研究所),其保藏号为 CGMCC No.2097^[1]。实验动物为昆明种小鼠,体重 18~22 g,雌雄各半,为二级实验动物,由军事医学科学院实验动物中心

提供。

T4 连接酶、*EcoR* I 和 *Hind* III 限制酶、pMD18-T 载体试剂盒、DNA 凝胶快速纯化回收试剂盒为大连宝生物公司产品;Taq DNA 聚合酶和氨苄青霉素为北京鼎国公司产品;16S rDNA 通用引物 A、B 的合成和 DNA 序列测定均由北京三博远志公司完成; α -淀粉酶(α -Amylase, EC 3.2.1.1)为美国 Sigma 公司产品;阿卡波糖片(Acarbose, Glucobay)为拜耳医药保健有限公司产品;葡萄糖体外诊断试剂盒(GOD-PAP 法)为北京中生生物工程公司产品;各型树脂均购自南开大学化工厂;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌株 ZG0656 的多相分类

所有相关方法均依文献进行^[2]。

1.2.2 菌株 ZG0656 的发酵

以 500 mL 三角瓶培养发酵种子,每瓶装高氏液体培养基 100 mL,接种菌株 ZG0656 斜面孢子,于空气浴摇床 140 r/min 28°C 培养 48 h 后作为发酵种子。在 10 L 不锈钢机械搅拌全自动型发酵罐中投入 7.5 L 相同组分的培养基,121°C 高压蒸汽灭菌 30 min 后冷却,以 5%接种量接入种子,开始发酵,搅拌转速 200 r/min,通气量 3 L/min,温度 28°C,共发酵 50 h。收集发酵液(约 5 L),用于 α -淀粉酶抑制剂的分离提取。

1.2.3 菌株 ZG0656 发酵液中 α -淀粉酶抑制剂的分离制备

将发酵液减压浓缩至约 200 mL,加入等体积无水乙醇后充分混匀,析出白色沉淀,10 000 r/min 离心 20 min 后取上清,减压蒸去乙醇。浓缩液过装填有 D301R 型弱碱性苯乙烯系大孔吸附树脂的 30×500 mm 玻璃色谱柱吸附色素。流出液直接过装填有 X-5 型非极性大孔吸附树脂的相同规格玻璃色谱柱吸附 α -淀粉酶抑制剂。蒸馏水冲洗后,用 40% 乙醇溶液洗脱,收集抑制 α -淀粉酶反应阳性部分,减压蒸去乙醇。浓缩液过装填有 001×7 型强阳离子交换吸附树脂的 18×200 mm 玻璃色谱柱吸附 α -淀粉酶抑制剂,去离子水冲洗后,用 1 mol/L 氨水溶液洗脱,收集抑制 α -淀粉酶反应阳性部分,减压蒸去氨后,浓缩干燥得到 α -淀粉酶抑制剂混合物粗品,

淡黄色粉末 2.1 g。以 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶为填料, 装填 40×800 mm 玻璃色谱柱。将上述 α -淀粉酶抑制剂混合物粗品 0.8 g 溶于 1 mL 蒸馏水中, 上样于色谱柱, 以蒸馏水 0.5 mL/min 洗脱。收集抑制 α -淀粉酶反应阳性部分, 即分子量约 500~2500 馏分。经 3 次操作, 合并洗脱液并减压浓缩干燥得到 α -淀粉酶抑制剂混合物精制品 AIB656, 白色粉末 1.3 g。

1.2.4 α -淀粉酶抑制剂对 α -淀粉酶的抑制效果^[3]

以 500 μ L 1% 可溶性淀粉为底物, 加入 100 μ L 系列稀释的 α -淀粉酶抑制剂溶液, 37 $^{\circ}$ C 预孵 10 min 后, 加入 50 μ L 5 u/mL 猪胰 α -淀粉酶启动反应。30 min 后取样 50 μ L, 加 50 μ L 3 mol/L NaOH 中止反应后, 加 75 μ L 1% 3, 5-二硝基水杨酸后沸水浴 5 min 显色。适当稀释后于 490 nm 测定光吸收值, 将含抑制剂体系和对照体系光吸收值相比, 得到 α -淀粉酶的相对活力。以抑制剂浓度为横坐标, α -淀粉酶的相对活力为纵坐标作图, 得到剂量依赖的抑制曲线。

1.2.5 α -淀粉酶抑制剂对餐后血糖升高的抑制作用^[4]

将正常小鼠按体重随机分为正对照组(阿卡波糖组)、空白对照组(生理盐水组)和给药组, 每组各 9 只。试验前 16 h 禁食不禁水, 分别取一定浓度的 AIB656 或阿卡波糖, 同一定剂量的淀粉(3 g/kg)对小鼠灌胃给药。分别在给药后 0、30、60、90 min 尾静脉采血后用葡萄糖体外诊断试剂盒(GOD-PAP 法)测定血浆葡萄糖水平。数据进行方差分析, 组间差异采用 Tukey's test 评价。

2 结果

2.1 α -淀粉酶抑制剂生产菌株 ZG0656 的分类地位

2.1.1 菌株 ZG0656 的形态特征

菌株 ZG0656 在高氏 1 号固体培养基上具有典型的链霉菌菌落特征, 即菌落干燥, 致密, 不透明, 具有颜色不同的气生菌丝和基内菌丝。基内菌丝发达, 培养初期(1 周)在以黄色为本底的基础上, 呈现红色和/或蓝色斑点, 后期(2 周)可产生明显蓝黑色, 若混合原来的红色, 即呈深紫色。不产生可溶性色素。气生菌丝发达, 呈灰白色至粉灰色。10 000 倍电镜下观察, 气生菌丝较直, 呈分枝状, 菌丝体表面光滑, 有直径明显小于菌丝的具分枝结构的树枝状突起, 菌丝体缠绕聚集膨大可形成质地致密、大

小不一的球形或不规则形状的菌核样特化结构, 内无孢子(这种结构在链霉菌属中比较罕见); 形成孢子丝, 呈螺旋形, 菌丝断裂形成孢子, 孢子圆柱形, 表面光滑(图 1)。

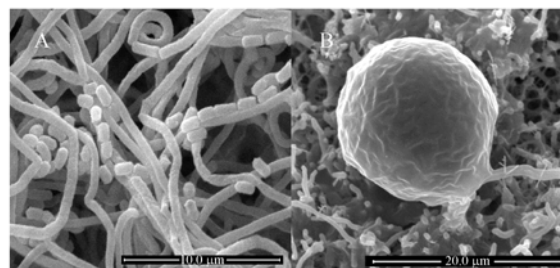


图 1 菌株 ZG0656 的扫描电子显微镜照片
Fig. 1 Scanning electron micrograph of strain ZG0656
(A) spore chain; (B) sclerotium-like structure

2.1.2 菌株 ZG0656 的培养特征

在不同组分固体培养基上, 菌株 ZG0656 均生长旺盛。气生菌丝发达, 颜色变化不明显, 初期为白色或灰白色, 后期均为粉灰色。基内菌丝发达, 颜色变化较大, 在以黄色为本底的基础上, 初期可呈现各种红色和/或蓝色斑点, 后期可产生明显蓝色, 若混合原来的红色, 即呈深紫色。在久置的(超过 8 周)高氏培养基上, 基内菌丝偶见墨绿色。在各种固体培养基中均无可溶性色素产生(表 1)。在以葡萄糖为碳源的液体培养基中可产生桔色水溶性色素。在以燕麦片为碳源的液体培养基中偶见西瓜红色色素, 该色素在 0.01 mol/L 的 HCl 中为粉色, 在 0.01 mol/L 的 NaOH 溶液中为黄色, 中性时为红色, 具有指示剂性质; 且该色素溶于乙酸乙酯和乙醇, 初始呈黄色, 久置呈红色。

2.1.3 菌株 ZG0656 的生理生化特性与碳源利用能力

菌株 ZG0656 的生理生化特性与碳源利用情况如表 2 所示。菌株 ZG0656 可以使淀粉水解, 明胶液化, 牛奶胨化和凝固; 但不产生黑色素, 硫化氢, 不能水解纤维素。菌株 ZG0656 可以利用测试的所有碳源, 说明其具有很强的代谢能力。

2.1.4 菌株 ZG0656 的细胞壁化学组成

菌株 ZG0656 的纯细胞壁含 LL-二氨基庚二酸, 不含二氨基庚二酸的其它异构体, 属胞壁 I 型。全细胞糖水解产物不含任何特征性糖。上述这些细胞壁化学成分组成符合链霉菌属的特征, 说明菌株 ZG0656 属于链霉菌属。

表 1 菌株 ZG0656 在不同培养基上的培养特征
Table 1 The culture characteristics of strain ZG0656 on various agar media

Media	Substrate mycelia		Aerial mycelia		Diffusible pigments
	One week	Two weeks	One week	Two weeks	
Gause's No.1 synthetic medium agar	Yellow with red and/or blue spot	Blue-black or deep purple	Gray-white	Pink-gray	None
Potato infusion agar	Rosy-red, yellow	Rosy-red, yellow with blue spot	White	Pink-gray	None
ISP4 medium agar	Brown-yellow	Brown-yellow with blue spot	Gray-white	Pink-gray	None
Czapek's medium agar	Yellow	Yellow	White	Pink-gray	None
Glucose asparagines agar	Yellow	Yellow	White	Pink-gray	None
Oatmeal agar	Yellow with red and/or blue spot	Blue-green or blue-purple	Gray-white	Pink-gray	None
Tyrosine agar	Orange-yellow	Orange-yellow	Gray-white	Pink-gray	None

表 2 菌株 ZG0656 的生理生化反应与碳源利用情况
Table 2 The phenotypic characteristics of ZG0656

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Starch hydrolysis	+	Fructose	+
Gelatin liquefaciton	+	Xylose	+
Tyrosinase production	-	Rhamnose	+
Milk peptonization	+	Sorbitol	+
Milk solidification	+	Sucrose	+
H ₂ S production	-	Galactose	+
Growth in cellulose	-	Inositol	+
Glucose	+	Mannitol	+

2.1.5 菌株 ZG0656 的 16S rDNA 序列分析

以菌株 ZG0656 的基因组为模板, 用 16S rDNA 的通用引物 A 和 B 进行 PCR 扩增反应, 得到一条大约 1500 bp 的 DNA 片段。将该片段与 pMD18-T 载体连接后转化大肠杆菌, 提取重组质粒, 对插入片段进行序列测定。菌株 ZG0656 的 16S rDNA 核酸序列全长为 1480 bp, 该序列已提交 GenBank, 登记号: EU201137。将所测序列与 GenBank 数据库中的相关种进行比较, 发现其与天蓝黄链霉菌标准株的 16S rDNA (*Streptomyces coelicoflavus*, 登记号: AB184650, 菌株 NBRC 15399) 具有 99.93% 的相似性, 即仅一个核苷酸不同。

2.1.6 菌株 ZG0656 分类地位的确定

根据以上形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞壁化学组成特征和 16S rDNA 全序列的相似性比较分析, 可将菌株 ZG0656 定种为天蓝黄链霉菌。但因其与天蓝黄链霉菌标准株在形态和生理生化特性上有一定差异, 如形成菌核样特化结构、较强的代谢能力以及缺乏抗菌能力等, 故将其定名为天蓝黄链霉菌南开变种 (*Streptomyces coelicoflavus* var. *nankaiensis*)。

2.2 α -淀粉酶抑制剂生产菌株 ZG0656 的发酵

菌株 ZG0656 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 2 所示。发酵过程的前 12 h, 菌株 ZG0656 处于延滞期, 菌体生长缓慢, 而 pH 和溶氧(DO)均快速降低。12 h 后, 菌株 ZG0656 的生长进入对数期, 直至 28 h; 在此期间, 菌体生长迅速, pH 保持恒定(约 5.9), 而 DO 继续快速降低, 当在 24 h 处达到最小值后(约 50%), 又开始快速升高。从 28 h 开始, 菌株 ZG0656 的生长进入稳定期, 直至 44 h; 在此期间, 菌体几乎不再生长, 而淀粉酶抑制剂开始合成和分泌, 同时 pH 开始小幅降低, DO 则先是稳定在约 60%, 之后快速升高。到达 44 h 处, pH 达到最小值(约 5.6), 而淀粉酶抑制剂的累积达到最大值。从淀粉酶抑制剂的产生过程来看, 它非常复合次级代谢产物的合成特征, 说明该淀粉酶抑制剂是菌株 ZG0656 的次级代谢产物。

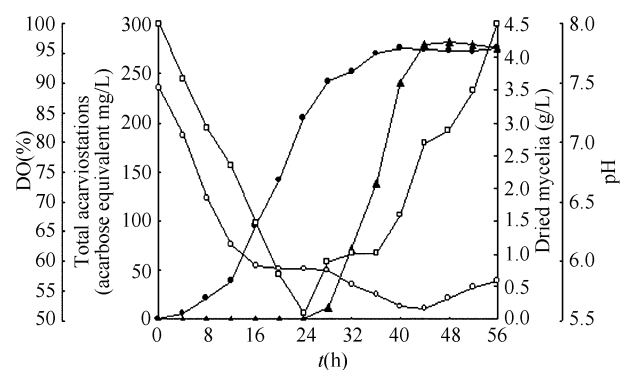


图 2 菌株 ZG0656 的发酵曲线

Fig. 2 Time courses of α -amylase inhibitors production in fermentation of strain ZG0656

Symbols: (○) pH; (□) DO; (▲) total α -amylase inhibitors (acarbose equivalent); (●) dried mycelia

2.3 菌株 ZG0656 发酵产生的 α -淀粉酶抑制剂 AIB656 的性质

菌株 ZG0656 的发酵液经 1.2.3 所述分离方法, 提取得到 α -淀粉酶抑制剂混合物 AIB656, 其物理、化学和生物学性质如下:

2.3.1 物理性质

α -淀粉酶抑制剂 AIB656 为白色无定形粉末, 易溶于水 and DMSO, 微溶于甲醇、乙醇和丙酮, 不溶于其它有机溶剂。

2.3.2 化学本质

α -淀粉酶抑制剂 AIB656 与苯酚-硫酸试剂显色, 不与茚三酮试剂显色; 红外光谱吸收集中在 3348.28 cm^{-1} 和 1039.85 cm^{-1} ; 元素分析: C 44.73%, H 7.33%, O 45.21%, N 2.66%。以上实验结果说明 AIB656 为含氮的拟低聚糖类物质。

2.3.3 生物学性质——对 α -淀粉酶的抑制作用

α -淀粉酶抑制剂 AIB656 在酶学水平对猪胰 α -淀粉酶具有明显抑制效果。图 3 为 AIB656 对猪胰 α -淀粉酶的剂量依赖抑制曲线。可见, AIB656 对 α -淀粉酶活力的抑制明显强于同剂量的市售 α -淀粉酶抑制剂阿卡波糖。

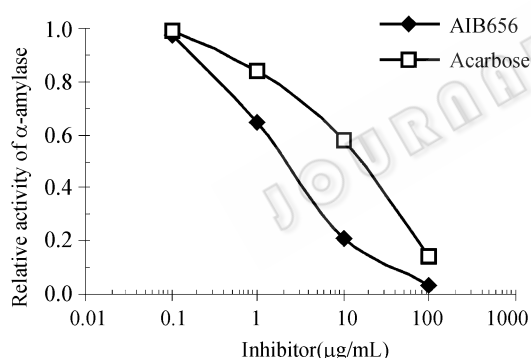


图 3 α -淀粉酶抑制剂 AIB656 和阿卡波糖对 α -淀粉酶的剂量依赖抑制曲线

Fig. 3 Dose-dependent inhibitory curves of α -amylase inhibitor AIB656 and acarbose

2.4 菌株 ZG0656 发酵产生的 α -淀粉酶抑制剂 AIB656 的应用

如表 3 所示, α -淀粉酶抑制剂 AIB656 可以明显

降低正常小鼠的餐后血糖水平, 给药 30 min 后, 给药组与空白对照组相比, 血糖值有显著差异 ($P < 0.05$); 与阿卡波糖组相比, 效果相当, 统计学分析无显著性差异。上述结果说明 α -淀粉酶抑制剂 AIB656 对餐后高血糖的形成有明显改善作用, 效果和阿卡波糖相当, 可用于制备治疗糖尿病、肥胖症的药物或功能性食品。

表 3 α -淀粉酶抑制剂 AIB656 对正常小鼠糖耐量的影响
Table 3 Suppressive effects of α -amylase inhibitor AIB656 on postprandial blood glucose elevation in normal mice

Group	Dose (mg/kg)	Blood glucose (mmol/L)			
		0 min	30 min	60 min	90 min
Control	-	6.40 \pm 0.81	13.33 \pm 0.41	9.56 \pm 0.57	7.50 \pm 0.55
Acarbose	1.5	5.63 \pm 0.63	11.11 \pm 1.18**	8.71 \pm 1.54	7.49 \pm 1.56
AIB656	1.5	5.92 \pm 0.61	12.02 \pm 1.14*	9.13 \pm 1.35	7.48 \pm 0.86

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ ($n=9$) (compared with the control group)

REFERENCES

- [1] Bai G, Geng P, Zhang L, *et al.* A strain producing α -amylase inhibitors, and preparation methods and application of the α -amylase inhibitors. China Patent, 200710058410.1, 2007. 白钢, 耿鹏, 张蕾, 等. 一株 α -淀粉酶抑制剂生产菌及 α -淀粉酶抑制剂的制备方法与应用. 中国专利, 申请号: 200710058410.1, 2007.
- [2] Zhang L, Liu CQ, Gao ZH, *et al.* Research on the classification of Streptomyces strain ZG0429 and purification of streptavidin. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(1): 7-10. 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. *微生物学报*, 2007, 47(1): 7-10.
- [3] Yoon SH, Robyt JF. Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4IV- α -maltohexaosyl and 4IV- α -maltododecaosyl analogues. *Carbohydr Res*, 2003, 338: 1969-1980.
- [4] Geng P, Yang Y, Gao ZH, *et al.* Combined effect of total alkaloids from Feculae Bombycis and natural flavonoids on diabetes. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59: 1145-1150.