

# 阿卡波糖及其结构类似杂质生物合成与调控的研究进展

王远山, 戴科磊, 谢卡茜, 翁春跃

浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014

王远山, 戴科磊, 谢卡茜, 翁春跃. 阿卡波糖及其结构类似杂质生物合成与调控的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(2): 605-619.

WANG YS, DAI KL, XIE KX, WENG CY. Biosynthesis and regulatory mechanism of acarbose and its structural analogs: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 605-619.

**摘要:** 阿卡波糖是一种用于II型糖尿病治疗的糖苷酶抑制剂, 工业上采用游动放线菌 *Actinoplanes* sp. 生产。作为一种次级代谢产物, 阿卡波糖生物合成复杂, 游动放线菌发酵液中除阿卡波糖外还会积累大量结构类似杂质组分。由于缺乏对阿卡波糖及其杂质合成和调控机制的系统了解, 难以通过调控来阻断或降低杂质合成, 从而导致纯化难度大。近年来, 随着组学和分子生物学技术的发展, 游动放线菌中阿卡波糖及其结构类似杂质的合成及调控机制的研究备受关注。研究人员通过生物信息学分析、基因工程技术以及酶学表征等手段探究了相关基因及其调控机制, 文中对这方面的进展进行了综述。

**关键词:** 游动放线菌; 阿卡波糖; 结构类似物; 生物合成; 调控

## Biosynthesis and regulatory mechanism of acarbose and its structural analogs: a review

WANG Yuanshan, DAI Kelei, XIE Kaxi, WENG Chunyue

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

**Abstract:** Acarbose is widely used as  $\alpha$ -glucosidase inhibitor in the treatment of type II diabetes. *Actinoplanes* sp. is used for industrial production of acarbose. As a secondary metabolite, the biosynthesis of acarbose is quite complex. In addition to acarbose, a few acarbose structural analogs are also accumulated in the culture broth of *Actinoplanes* sp., which are hard to remove. Due to lack of

**Received:** March 24, 2021; **Accepted:** May 13, 2021; **Published online:** December 11, 2021

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2020YFA0907904); Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY17C010005)

**Corresponding author:** WANG Yuanshan. Tel: +86-571-88320391; E-mail: yuanshan@zjut.edu.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2020YFA0907904); 浙江省自然科学基金 (LY17C010005)

systemic understanding of the biosynthesis and regulation mechanisms of acarbose and its structural analogs, it is difficult to eliminate or reduce the biosynthesis of the structural analogs. Recently, the advances in omics technologies and molecular biology have facilitated the investigations of biosynthesis and regulatory mechanisms of acarbose and its structural analogs in *Actinoplanes* sp.. The genes involved in the biosynthesis of acarbose and its structural analogs and their regulatory mechanism have been extensively explored by using bioinformatics analysis, genetic manipulation and enzymatic characterization, which is summarized in this review.

**Keywords:** *Actinoplanes* sp.; acarbose; analogs; biosynthesis; regulation

糖尿病 (diabetes mellitus) 是世界重大多发性内分泌疾病, 2019 年我国成年人患病率达到 11.2% 以上 (20–79 岁年龄段患者超过 1.16 亿人), 其中 90% 以上是 II 型糖尿病患者, 糖耐量异常 (impaired glucose tolerance, 又称糖尿病前期, 不加干预或治疗 5 年内约 25%–50% 发展为 II 型糖尿病) 3.5 亿人以上, 用于糖尿病相关的医疗开支高达 1 090 亿美元<sup>[1–2]</sup>。因此, 糖尿病的防治具有重要的经济和社会意义。阿卡波糖 (acarbose) 是一种由放线菌等产生的假四糖类化合物, 其核心结构假二糖阿卡维糖 (acarvioside) 通过  $\alpha$ -1,4-糖苷键与麦芽糖残基连接<sup>[3–4]</sup>。阿卡波糖不仅能够竞争性抑制人小肠  $\alpha$ -糖苷酶活性延缓餐后血糖升高, 还能够显著降低糖耐量异常转为糖尿病的风险<sup>[5]</sup>。由于疗效好、毒副作用小, 并能有效预防糖尿病导致的心血管并发症, 阿卡波糖广泛用于 II 型糖尿病的治疗和预防, 已成为我国口服降糖药中销量最大的品种<sup>[5]</sup>。能合成阿卡波糖的微生物包括游动放线菌和链霉菌, 由于游动放线菌具有较高的阿卡波糖生产能力, 阿卡波糖工业化生产使用犹他游动放线菌 (*Actinoplanes utahensis*) ZJB-08196、游动放线菌 *Actinoplanes* sp. SE50/110 及其突变株<sup>[3–4,6–7]</sup>, 为多级分批补料发酵, 发酵吨位 30–120 m<sup>3</sup><sup>[3–4,8]</sup>。在游动放线菌发酵生产阿卡波糖过程中, 会积累大量阿卡波糖结构类似杂质组分, 导致纯化

难度大<sup>[9–12]</sup>。由于缺乏对阿卡波糖及其杂质合成和调控机制的系统了解, 难以通过调控来阻断或降低杂质合成, 导致需要复杂的多步层析以去除杂质。鉴于阿卡波糖在 II 型糖尿病预防与治疗方面的重要价值, 对阿卡波糖及其结构类似杂质合成与调控机制的研究备受学术界和产业界的重视。

笔者及所在团队在阿卡波糖等糖苷酶抑制剂类药物研究方面有着丰富的积累<sup>[13–19]</sup>, 结合相关报道笔者对阿卡波糖及其结构类似物合成及其调控方面的进展进行总结, 以期为阿卡波糖菌种改良、发酵过程控制与优化和代谢调控等提供借鉴。

## 1 阿卡波糖的合成

目前国内外学者已对阿卡波糖合成途径进行了大量研究, 通过基因组学<sup>[20–21]</sup>、转录组学<sup>[19,21–22]</sup>、蛋白质组学<sup>[23–25]</sup>、代谢组学分析<sup>[26–27]</sup>, *Actinoplanes* sp. SE50/110 中阿卡波糖的生物合成基因簇 (*acb* 基因簇) 及合成机制已经基本阐明<sup>[3–4,23]</sup> (图 1A)。*acb* 基因簇编码一系列与阿卡波糖合成、转运、代谢相关的酶, 由阿卡波糖的生物合成相关基因 *acbAB* 和 *acbVUSRPIJKLMNOC*、转运相关基因 *acbWXY* 和 *acbFGH*、细胞外与  $\alpha$ -葡萄糖苷和阿卡波糖代谢相关的基因 *acbDEZ* 等基因组成 (表 1)。

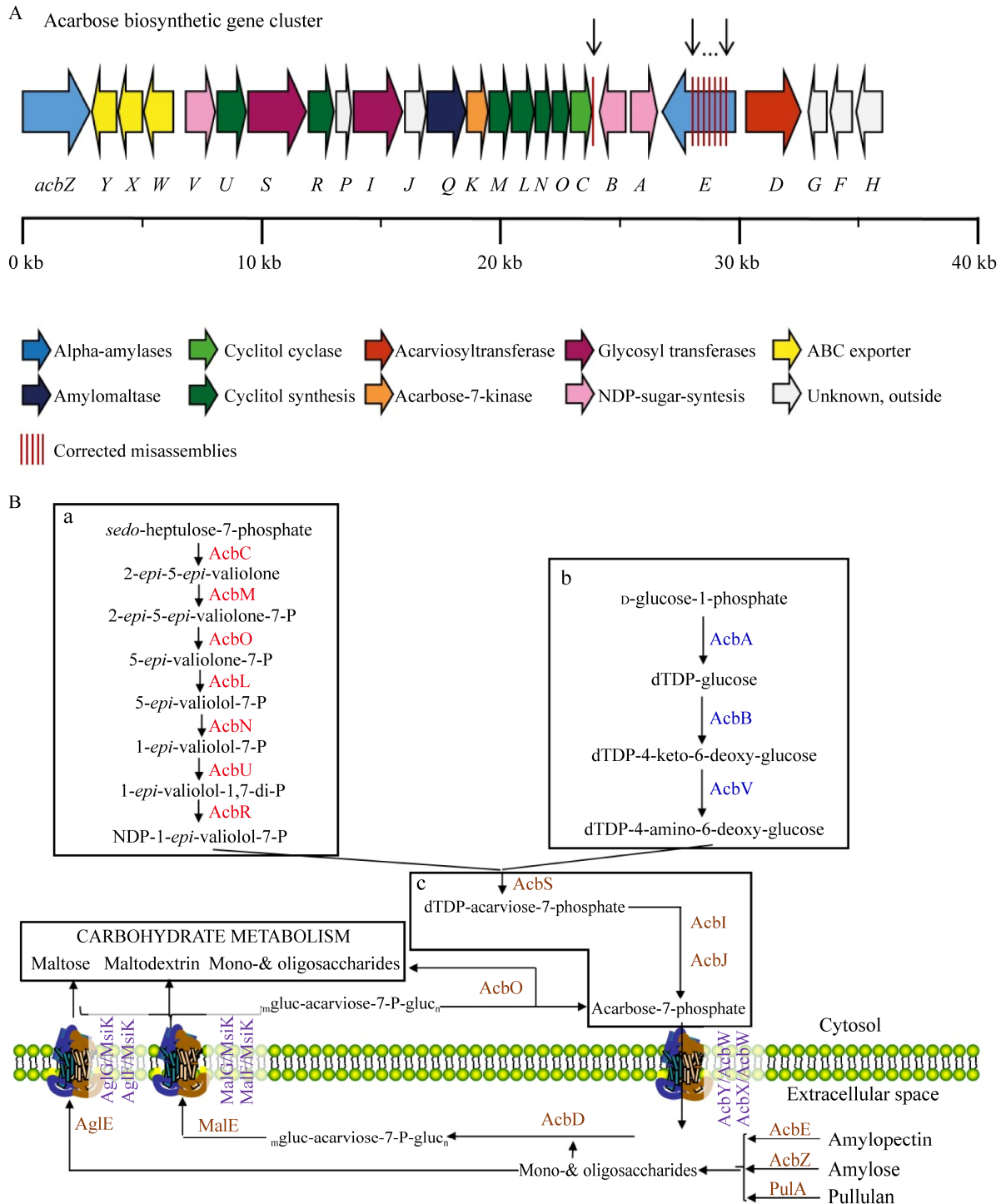


图1 *Actinoplanes* sp. SE50/110 阿卡波糖生物合成基因簇 (*acb*) 及合成路径<sup>[3-4,20,23,28-29]</sup> A: 不饱和环醇的合成; B: 4-氨基-4,6-双脱氧葡萄糖的合成; C: 阿卡波糖的合成

Figure 1 The acarbose biosynthetic gene cluster (*acb*) and acarbose biosynthetic pathway of *Actinoplanes* sp. SE50/110<sup>[3-4,20,23,28-29]</sup>. (A) The synthesis of unsaturated cyclitol. (B) The synthesis of 4-amino-4,6-dideoxyglucose. (C) The synthesis of acarbose.

表 1 阿卡波糖生物合成基因及功能<sup>[3-4,28]</sup>Table 1 The acarbose biosynthetic genes and functions<sup>[3-4,28]</sup>

Genes	Enzymes	Functions
<i>acbC</i>	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone synthase	Convert <i>sedo</i> -heptulose-7-phosphate to 2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone
<i>acbM</i>	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone-7-kinase	Convert 2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone to 2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone-7-phosphate
<i>acbO</i>	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone-7-phosphate 2-epimerase	Convert 2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone-7-phosphate to 5- <i>epi</i> -valiolone-7-phosphate
<i>acbL</i>	2- <i>epi</i> -valiolone-7-phosphate 1-reductase	Convert 5- <i>epi</i> -valiolone-7-phosphate to 5- <i>epi</i> -valiolol-7-phosphate
<i>acbN</i>	Cyclitol oxidoreductase	Convert 5- <i>epi</i> -valiolol-7-phosphate to 1- <i>epi</i> -valienol-7-phosphate
<i>acbU</i>	1- <i>epi</i> -valienol-7-phosphate kinase	Convert 1- <i>epi</i> -valienol-7-phosphate to 1,7-diphospho-1- <i>epi</i> -valienol
<i>acbR</i>	Valienol-1-phosphate guanylyltransferase	Convert 1,7-diphospho-1- <i>epi</i> -valienol to NDP-1- <i>epi</i> -valienol 7-phosphate
<i>acbA</i>	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	Convert D-glucose-1-phosphate to dTDP-glucose
<i>acbB</i>	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	Convert dTDP-glucose to dTDP-4-keto-6-deoxy-glucose
<i>acbV</i>	dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-glucose transaminase	Convert dTDP-4-keto-6-deoxy-glucose to dTDP-4-amino-6-deoxy-glucose
<i>acbS</i>	Glycosyltransferase	Synthesize TDP-acarviosine-7-phosphate with NDP-1- <i>epi</i> -valienol-7-phosphate and dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-glucose
<i>acbI</i>	Glycosyltransferase	Convert dTDP-acarviosine-7-phosphate to acarbose-7-phosphate
<i>acbJ</i>	Hydrolase	
<i>acbW</i>	ABC transporter permease	ABC exporter, transport acarbose 7-phosphate out of the cell
<i>acbX</i>	ABC transporter permease protein	
<i>acbY</i>	ABC transporter ATP-binding protein	
<i>acbZ</i>	Alpha-amylase	Hydrolyze extracellular starch or dextrin to glucose and maltose
<i>acbE</i>	Acarbose resistant alpha-amylase	
<i>acbQ</i>	Acarbose 4-alpha-glucanotransferase	Participates in the reaction of the "carbophor"
<i>acbK</i>	Acarbose-7-kinase/acarbose 7IV-phosphotransferase	Convert acarbose-7P-(Glc) <sub>n</sub> to acarbose-7-phosphate and mono-& oligosaccharides
<i>acbD</i>	Acarviosine transferase	Synthesize acarbose-(Glc) <sub>n</sub> to acarbose-7-phosphate-(Glc) <sub>n</sub> Transfer acarviosine residues to maltose or higher maltooligosaccharides
<i>acbP</i>	Putative NUDIX hydrolase	Unknown
<i>acbH</i>	ABC transporter binding protein	ABC importer, transport maltose, maltodextrin, mono-& oligosaccharides and mgluc-avarviosine-7-P-Gluc <sub>n</sub> into the cell
<i>acbF</i>	ABC transporter membrane protein	
<i>acbG</i>	ABC transporter membrane protein	

阿卡波糖的生物合成分为不饱和环醇的合成 (a)、4-氨基-4,6-双脱氧葡萄糖的合成 (b) 和阿卡波糖的合成 (c) 3 个步骤<sup>[3-4,23,28-30]</sup> (图 1B)。如张丹等在大肠杆菌中异源可溶性表达了 *Actinoplanes* sp. SE50/110 D-葡萄糖-1-磷酸-胸

腺嘧啶转移酶 (AcbA)、dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶 (AcbB) 和氨基转移酶 (AcbV), 并以 D-葡萄糖-1-磷酸为起始底物, 通过体外催化研究脱氧氨基糖单元的生物合成过程和重组酶的酶学性质<sup>[29]</sup>。同时通过构建 *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 的

同框缺失和回补突变株,考察了突变株阿卡波糖合成能力。结果表明,分别缺失 *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 基因后,相应突变株均丧失了阿卡波糖合成能力,而将 *acbA*、*acbB* 和 *acbV* 基因分别回补后,各菌株又恢复了阿卡波糖合成能力。研究结果阐明了阿卡波糖脱氧氨基糖单元的生物合成过程。Zhao 等也采用同框缺失和回补策略验证了 *AcbJ* 的功能<sup>[30]</sup>。因此,组学等生物信息学和基因工程技术等方面的进展为全面解析阿卡波糖生物合成途径和菌种改良提供了高效的工具<sup>[28,30-33]</sup>。

## 2 阿卡波糖结构类似杂质合成机制

由图 1 可知,阿卡波糖代谢途径涉及一系列的合成、转运、代谢、修饰等过程,因而极为复杂。游动放线菌在产生阿卡波糖的同时,还伴随有大量结构类似杂质积累(表 2),其中,组分 A 和组分 C 与阿卡波糖结构极为接近,难以去除<sup>[3-4]</sup>。欧洲药典对杂质含量有着严格的规定<sup>[10]</sup>,为达到标准,生产中需采用多步层析工艺去除杂质,致使阿卡波糖纯化工艺复杂、步骤长、废水排放多、品质控制难<sup>[3-4,8]</sup>。由于对这些杂质合成的分子机制缺乏深入了解,目前只能通过菌种改良和发酵工艺控制来减少组分 C 的形成<sup>[3-4,9,16]</sup>。这些策略不仅具有一定的盲目性,而且增加了操作复杂性。因此,结构类似杂质形成机制研究是阿卡波糖杂质组分控制的关键。根据相关文献,阿卡波糖部分结构类似杂质形成机制如下。

### 2.1 组分 A 的形成

组分 A 分子中阿卡维糖以 1,4-糖苷键与麦芽酮糖(1- $\alpha$ -葡萄糖-4-果糖)相连。组分 A 由阿卡波糖在一定温度下异构化形成,该反应不涉及菌体(酶)<sup>[34-35]</sup>。黄剑川等发现在 60 °C、

表 2 游动放线菌产生的阿卡波糖及其结构类似杂质组成<sup>[4,9-10]</sup>

Table 2 Acarbose and its structural analogs produced by *Actinoplanes* sp.<sup>[4,9-10]</sup>

Names	Structure	Limits* (%)
Acarbose	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc	
Component A	Ac-1,4-Glc-1,4-Fru	0.6
Component B	Ac-1,4-Glc-1,4-(1- <i>epi</i> -vlienol)	0.5
Component C	Ac-1,4-Glc-1,1-Glc	1.5
Component D	Ac-1,4-Glc-1,4-Man	1.0
Component 4a	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc-1,4-Fru	0.2
Component 4b	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc-1,4-Glc	0.3
Component 4c	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc-1,1-Glc	0.3
Pseudoacarbose	Acarviosyl-1-4-(6-desoxy)Glc-1-4-Glc	0.2

Note: Ac: acarviosyl; Glc: glucose; Fru: fructose; Man: mannose; \*: European Pharmacopoeia, 6th Ed.

pH 11.0 条件下反应 3 h, 33.6% 的阿卡波糖可被转化为组分 A<sup>[35]</sup>。

### 2.2 组分 B、4a、4b、4c 和假阿卡波糖的合成

Hemker 等将胞外糖苷转移酶 *AcbD* 在变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) TK23 中进行了异源表达和酶学表征,发现该酶是目前唯一以阿卡波糖为底物的糖苷转移酶,能够催化阿卡波糖核心基因 acarviosyl 转移到麦芽寡糖等糖上的反应,形成阿卡波糖结构类似物,与组分 4a、4b、4c、组分 B 和假阿卡波糖的合成有关,但不能催化组分 A、C 和 D 的形成<sup>[34]</sup>。

### 2.3 组分 C 的合成

从结构可以看出,组分 C 分子中 acarviosyl 以 1,4-糖苷键与海藻糖(1- $\alpha$ -葡萄糖-1-葡萄糖)相连,是发酵后期的代谢产物,含量随着阿卡波糖浓度升高而增加。因此,其合成可能与细胞裂解后释放到发酵液中的糖苷转移酶 (glucosyltransferase, GTase) 或海藻糖合成酶有关<sup>[3-4,36-37]</sup>(图 2A)。海藻糖是一种在自然界中广泛分布的非还原型二糖,对生物体组织和蛋白

质等生物大分子具有非特异性保护作用,既可以作为结构成分,又是一种能源物质<sup>[38-39]</sup>。海藻糖的合成和积累是 *Actinoplanes* sp. 对高渗透压环境的一种适应<sup>[9,17]</sup>。 *Actinoplanes* sp. SE50/110 中存在的与海藻糖合成有关的 6-磷酸-海藻糖合成酶/6-磷酸-海藻糖磷酸酶 (TPP/TPS 途径)、海藻糖合成酶 (TS 途径)、麦芽寡糖基海藻糖合成酶/麦芽寡糖基海藻糖水解酶 (TreY/TreZ 途径) 中,只有 TreY 能够催化阿卡波糖转化为组分 C<sup>[36]</sup>。余贞等利用同源重组技术敲除 *Actinoplanes* 8-22 中的 *treY* 基因,显著降低了组分 C 的含量,但不能完全阻断其合成<sup>[40]</sup>, Zhao 等也通过敲除 *treY* 基因抑制了组

分 C 的形成,进一步证明了 TreY 在组分 C 合成中的作用<sup>[41]</sup>。除 TreY 外, Choi 等也发现 *Actinoplanes* sp. SE50/110 突变株 CKD48 中的一种胞内糖苷转移酶 (GTase) 能够可逆催化阿卡波糖生成组分 C, 作用机制类似于组分 C 形成机制中的 TreY (BIII) 途径 (图 2B)<sup>[37]</sup>。该酶在氨基酸序列上与 TreY 差异极大,而与放线菌中的 TPP (WP\_023516388 等, 88%以上)、TPS (WP\_043783590 等, 70%以上)、TS (WP\_023516388 等, 88%以上) 具有较高相似性。因此,如能在阿卡波糖产生菌中发现类似酶并进行考察将有助于进一步解析组分 C 合成机制并有助于组分 C 的控制。

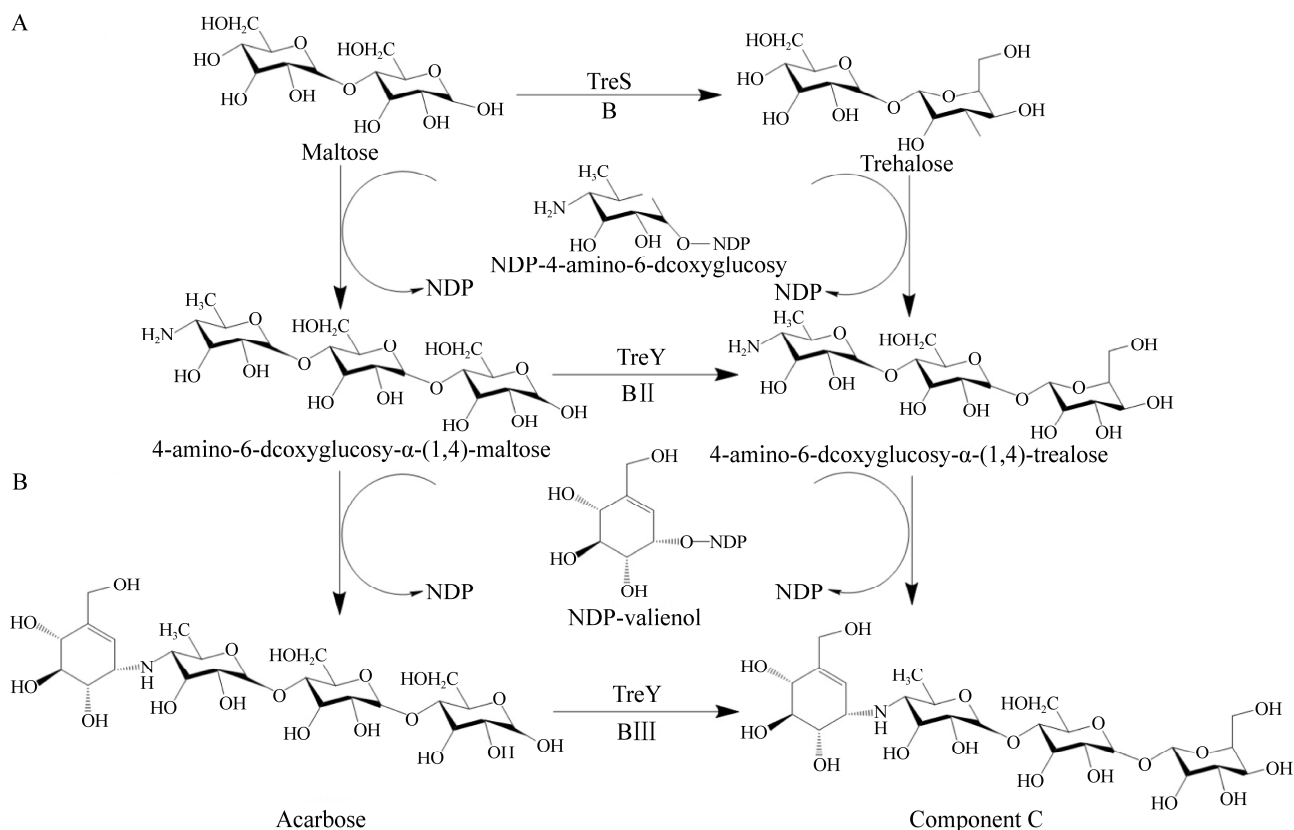


图 2 *Actinoplanes* sp. SN223/29 中 TreS 与 TreY 催化的组分 C 合成途径 (A)<sup>[36]</sup>与 *Actinoplanes* sp. CKD485-16 中 GTase 催化的组分 C 合成途径 (B)<sup>[37]</sup>

Figure 2 Proposed component C biosynthetic pathway of *Actinoplanes* sp. SN223/29 (A)<sup>[36]</sup> and *Actinoplanes* sp. CKD485-16 (B)<sup>[37]</sup>.

## 2.4 组分 D 的合成

组分 D 分子中阿卡维糖是以 1,4-糖苷键与甘露糖基葡萄糖 (4-O- $\beta$ -D-mannosyl-D-glucose, Man-Glc) 连接,其形成机制未见报道。而 Nakae 等发现脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) NCTC 9343 中的 UDP-N-乙酰葡萄糖胺 2-差向异构酶 (N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase, AGE, YP\_099168.1) 能够转化甘露二糖得到 Man-Glc<sup>[42]</sup>。通过 BLAST 比对发现 *Actinoplanes* sp. SE50/110 基因组中 WP\_014695088 序列 (AGE, 由 *wecB* 基因编码) 与 AGE 具有较高序列同源性,可能具有类似功能,通过转化甘露二糖为组分 D 合成提供前体 Man-Glc。

## 3 阿卡波糖及结构类似杂质合成的调控

### 3.1 杂质组分的控制

鉴于有限的杂质合成分子机制信息,目前仅有对组分 A 和组分 C 进行控制的报道。

#### 3.1.1 组分 A 的控制

由于阿卡波糖异构化形成组分 A 反应的温度依赖性,降低后处理过程温度将有助于组分 A 的控制<sup>[35]</sup>。周鲁谨等通过将放罐后阿卡波糖料液预处理阶段中的温度控制为 0–25 °C,显著降低了料液中杂质组分 A 的含量<sup>[43]</sup>。

#### 3.1.2 组分 C 的控制

目前主要通过菌种改良、添加糖苷酶抑制物质等措施降低组分 C 的含量。如张琴等利用紫外、亚硝基胍、硫酸二乙酯、亚硝酸等方法对 *Actinoplanes* sp. LA-H6 进行诱变,得到一株发酵液中组分 C 含量显著降低的突变株 SIPI-AK<sup>[44]</sup>。牛鑫淼利用紫外诱变和微波诱变处理 *A. utahensis* ZJB-08196,获得的两个突变株 UN-52 和 WN-44 经基因组重排得到突变株 F61,其发酵液中组分 C 含量降低了 18.9%<sup>[45]</sup>。

Choi 等发现加入 10  $\mu$ mol/L 井冈霉素胺 (valienamine) 可以将 *Actinoplanes* sp. CKD485-16 发酵液中组分 C 含量减少 90%以上<sup>[9]</sup>。Cheng 等通过渗透压分段控制技术将 *Actinoplanes* sp. A56 发酵液中组分 C 含量从 498.2 mg/L 降低到 307.2 mg/L<sup>[46]</sup>。Xue 等在发酵过程中加入 20 mg/L 井冈霉素胺 (validamine) 后,不仅提高了 *A. utahensis* ZJB-08196 阿卡波糖发酵水平,还降低了组分 C 含量,在分批发酵条件下,与未添加井冈霉素胺的对照相比,其阿卡波糖产量从 3 560 mg/L 增加到 4 950 mg/L,而组分 C 的含量则从 289 mg/L 降到 107 mg/L,分批补料发酵时,阿卡波糖产量达到 6 606 mg/L,而组分 C 含量只有 212 mg/L<sup>[16]</sup>。

尽管上述措施确实显著降低了组分 C 的含量,但诱变育种具有一定的盲目性,其他措施除了增加操作复杂性和相对成本以外,还不能直接将发酵液中的组分 C 相对含量降到药典标准以下,仍需后续多步色谱进行纯化。

#### 3.1.3 前体和小分子信号物

小分子信号物和前体等对微生物代谢具有重要的影响。Xue 等发现加入 20 mg/L 井冈霉素胺后, *A. utahensis* ZJB-08196 阿卡波糖产量从 3 560 mg/L 增加到 4 950 mg/L<sup>[16]</sup>。通过进一步分批补料发酵,阿卡波糖产量达到 6 606 mg/L。作为氨基环多醇,井冈霉素胺是一种高效的  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂,同时也是阿卡维糖的组成部分,阿卡维糖通过 1,4-糖苷键与麦芽糖结合形成阿卡波糖,因而可以作为阿卡波糖合成的前体<sup>[47]</sup>。因此,加入井冈霉素胺后阿卡波糖发酵水平升高的两个可能原因为: 1) 作为抑制剂抑制了与阿卡波糖结构类似物合成有关的  $\alpha$ -糖苷酶; 2) 作为合成前体,促进了阿卡波糖的合成。

Sun 等发现加入适量 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) (20–100  $\mu$ mol/L) 可以将 *A. utahensis* ZJB-08196 阿卡波糖产量提

高 10%–30%，表明在阿卡波糖合成中，SAM 是一种重要的信号物<sup>[15]</sup>。众所周知，SAM 是一种极为重要的生理活性物质，是生物体内主要的甲基供体，还参与转硫基、转氨基和转核糖基等重要的生化反应<sup>[48]</sup>。同时，作为重要的信号分子，SAM 也能调控微生物尤其是链霉菌属的代谢<sup>[49-50]</sup>。代谢组学研究表明，SAM 等小分子物质还可通过调节其他组学（基因组、表观基因组、转录组和蛋白组）的水平来影响细胞的生理功能<sup>[51]</sup>。因此，SAM 促进 *A. utahensis* ZJB-08196 阿卡波糖合成的机制可能包括两个方面：1) SAM 可以作为甲基供体促进 4-氨基-4,6-二脱氧葡萄糖的合成；2) SAM 作为信号分子可能促进与 ABC 转运子相关的寡肽结合组分的表达，而 ABC 转运蛋白对麦芽寡糖前体合成阿卡波糖起着重要的作用。

李明刚发现在培养 12 h 后向发酵液中加入 60–200  $\mu\text{mol/L}$   $\gamma$ -丁内酯类物质（ $\gamma$ -丁内酯和 2-乙酰丁内酯）可以显著提高 *A. utahensis* ZJB-08196 的阿卡波糖发酵水平<sup>[52]</sup>。作为可扩散的低分子量化学物质， $\gamma$ -丁内酯类是一种激素类的信号分子，可以在纳摩尔浓度下诱发微生物尤其是链霉菌的次级代谢，如在链霉菌中已阐明， $\gamma$ -丁内酯类化合物通过特定受体蛋白（通常是 TetR 家族的转录调节因子）发挥调节作用<sup>[53-54]</sup>。对于  $\gamma$ -丁内酯类在阿卡波糖生物合成中的作用，推测其作为信号分子可以与受体蛋白 ArpA 结合，促进阿卡波糖合成途径中关键调节因子的转录，从而显著提高阿卡波糖发酵水平。

对于上述前体和信号分子调控游动放线菌次级代谢机制方面的深入研究将有助于阿卡波糖生物合成的调控和产量的进一步提升。

### 3.2 碳源

研究表明游动放线菌产阿卡波糖最适碳源

为麦芽糖和葡萄糖。Lee 等发现阿卡波糖的麦芽糖基团来自麦芽糖、麦芽三糖或较高分子的麦芽寡糖，添加麦芽糖比添加葡萄糖更有利于 *Actinoplanes* sp. SN223/29 生产阿卡波糖<sup>[55]</sup>。姜玮等发现将麦芽糖浓度保持在 6%–7% 可以促进 *Actinoplanes* sp. 合成阿卡波糖<sup>[56]</sup>。Wang 等发现麦芽糖在 *A. utahensis* ZJB-08196 阿卡波糖发酵过程中可以作为碳源和阿卡波糖分子中的麦芽糖基团供体，也可以作为渗透压调节剂保护细胞正常生理活动<sup>[14,17]</sup>。

Wendler 等通过比较蛋白组学分析发现阿卡波糖或阿卡维基-葡萄糖的形成取决于提供的碳源，在糖转运蛋白和代谢蛋白表现有显著差异，而 *acb*-基因簇的表达则没有显著差异。在麦芽糖培养基中，麦芽糖诱导的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶/麦芽糖酶 MalL 和 ABC 型糖转运蛋白 AglEFG、MalEFG 和 MstEAF 表达水平显著提高。葡萄糖培养基中只有 MstEAF 大量表达，表明 MstEAF 是葡萄糖的主要转运蛋白。研究表明，阿卡波糖或阿卡维基-葡萄糖的形成差异与糖的转运较 *acb*-基因簇表达水平更密切相关<sup>[25]</sup>。

Weng 等以阿卡波糖工业生产菌 *A. utahensis* ZJB-08196 突变株 ZJB-03852 为研究对象，基于游动放线菌基因组信息，利用转录组分析对不同碳源培养条件下 *A. utahensis* ZJB-03852 的表达谱进行差异分析<sup>[19]</sup>。对差异表达基因进行途径分析、互作分析及关联分析的结果显示，糖转运及细胞色素氧化酶模块在葡萄糖与麦芽糖混合培养基中显著富集，而铁蛋白代谢相关基因在葡萄糖培养基中表达显著增加。

解慧欣等考察了麦芽糖及转运蛋白对游动放线菌生产阿卡波糖的影响，也发现麦芽糖浓度提高能够显著促进转运蛋白基因 *acbW* 的转录<sup>[57]</sup>。表明 *acbWXY* 编码的转运蛋白在阿卡波



糖的生产过程中至关重要,且强化该外运途径可有效提高阿卡波糖产量。

### 3.3 分子水平调控

近年来基因组<sup>[20]</sup>、比较基因组<sup>[21]</sup>、转录组<sup>[22]</sup>、蛋白组<sup>[25,58]</sup>和代谢组<sup>[26-27]</sup>分析等生物信息学和分子生物技术方面的进展<sup>[41,59]</sup>为游动放线菌阿卡波糖及其结构类似物生物合成和调控机制以及生产性能提高提供了高效的工具。在代谢调控方面,根据组学分析和预测,*Actinoplanes* sp. SE50/110 基因组中有 900 个以上与转录调控有关的基因,其中 697 个注释为转录调控子 (GenBank: LT827010.1)<sup>[20-22,24-25]</sup>,有很多参与糖代谢调控。而分子结构分析表明,阿卡波糖及其结构类似杂质的合成应该与糖类尤其是麦芽糖的代谢密切相关<sup>[3-4]</sup>。

#### 3.3.1 阿卡波糖调控蛋白 C 的影响

Wolf 等将链霉菌 *Streptomyces* spp. 中阿卡波糖生物合成基因簇的 Lac I 家族调控蛋白与 *Actinoplanes* sp. SE50/110 基因组进行比对,确定了一种阿卡波糖调控蛋白 C (AcrC),利用 PCR-targeting 技术敲除了 *Actinoplanes* sp. SE50/110 *acrC* 基因,经发酵试验、全基因组 DNA 微阵列杂交和 RT-qPCR 等研究了  $\Delta$ *acrC* 突变株以解析其结合域<sup>[11]</sup>。结果表明,AcrC 可以结合到 *Actinoplanes* sp. SE50/110 *acbE* 和 *acbD* 基因间隔区并作为这些基因的转录抑制子而负调控其表达。但 *AcbD* 和 *AcbE* 仅与细胞外  $\alpha$ -葡萄糖苷和阿卡波糖代谢相关,并不直接参与阿卡波糖的合成。同时也发现 AcrC 的表达可以影响生长初期阿卡波糖的形成,在麦芽糖基础培养基摇瓶培养 47.5 h 后, $\Delta$ *acrC* 突变株和野生菌的阿卡波糖最大生产速率分别达到  $(5.9 \times 10^{-3} \pm 0.7 \times 10^{-3}) \text{ h}^{-1}$  和  $(5.5 \times 10^{-3} \pm 0.4 \times 10^{-3}) \text{ h}^{-1}$ ,但最终阿卡波糖产量分别为 0.93 g/L 和 0.98 g/L,并没有显著差异。有趣的是,AcrC 并不调节

*malEFG* 操纵子。

#### 3.3.2 转录调控子 MalT 的影响

Droste 等发现 *Actinoplanes* sp. SE50/110 存在一大段基因组区域 (ACSP50\_3900 到 ACSP50\_3950),其中 39 个基因的转录方式一致,具有麦芽糖依赖性。转录调控子 MalT 被鉴定为该麦芽糖调控大片段基因组区域的激活子<sup>[60]</sup>。利用 CRISPR/Cas9 技术和来自缓慢爱格士菌 (*Eggerthella lenta*) 的强启动子 *PgapDH*<sup>[32]</sup> 分别构建了 *malT* 敲除和过表达突变株,通过转录组差异分析揭示了 MalT 对该区域 51 个基因中的 40 个基因有激活作用,但对麦芽糖代谢基因没有影响。与许多其他细菌相比, MalT 是该区域的一种麦芽糖依赖型激活子但并不是 *mal* 基因的激活子,并不调控麦芽糖代谢相关基因<sup>[60]</sup>。

#### 3.3.3 途径特异性转录调控蛋白 AmlR 的功能

Schaffert 等研究了 *Actinoplanes* sp. SE50/110 中麦芽糖/麦芽糊精的代谢<sup>[12]</sup>。通过生物信息学分析定位了一个假定的麦芽糖酶基因 *amlE* (ACSP50\_2474),位于一个上游有编码 Pur/Lac I 转录调控蛋白基因 (*amlR* (ACSP50\_2475)) 型操纵子,下游有一个编码含有假定涉及 c-di-GMP 信号的 GGDEF-EAL-domain 蛋白的基因。利用 CRISPR/Cas9 技术构建了敲除 *amlE* 和 *amlR* 基因的突变株,通过培养试验和功能分析,确定了 AmlE 对 *Actinoplanes* sp. SE50/110 麦芽糖利用极为重要。野生型中没有检测到麦芽糖磷酸化酶活力或其编码基因。在葡萄糖培养基中生长时,野生菌 *aml* 操纵子的转录被抑制,但  $\Delta$ *amlR* 突变株中则没有这种抑制。尽管 AmlR 很明显是 *aml* 操纵子的一个途径特异性转录调控蛋白, $\Delta$ *amlR* 突变株在葡萄糖培养基中的生长被严重抑制,同时伴随着不同功能族的一些基因的差异表达。这是由位于 *amlE*

下游假设参与第二信使 c-di-GMP 代谢的 ACSP50\_2473 所导致。因此, 麦芽糖不仅是 *Actinoplanes* sp. SE50/110 最重要的碳源, 其代谢也和核苷信使系统 c-di-GMP 耦联。

### 3.3.4 基因组规模代谢网络模型构建

为全面了解 *Actinoplanes* sp. SE50/110 细胞代谢, Wang 等基于基因组注释、生化反应数据库和文献挖掘重建了一个包含 1 028 个基因、1 128 种代谢物和 1 219 个反应的基因组规模代谢网络模型 (genome-scale metabolic model) iYLW1028<sup>[28]</sup>, 分别确定了 122 个和 81 个对菌体在阿卡波糖合成培养基 (麦芽糖) 和蔗糖培养基中生长的关键基因, 并阐明了 SE50/110 中

阿卡波糖生物合成途径 (图 3)。基于模型预测, 向培养基中加入精氨酸和组氨酸分别使阿卡波糖产量增加了 78%和 59%。此外, 根据模型预测和 7.5 L 发酵罐溶氧控制发酵, 证明溶氧对阿卡波糖产量也有显著影响, 有限的溶氧水平更有利于阿卡波糖合成。并且, 也鉴定了高产阿卡波糖所需过表达的基因 (如 ACPL\_1861、ACPL\_6461、ACPL\_1328 和 ACPL\_6750 等)。模型预测组分 C 由 TreY 催化 7-磷酸阿卡波糖合成, 而 *treY* 基因不是菌株生长和阿卡波糖合成必需基因。由于还有其他两个海藻糖合成途径可以合成菌体生长必需的海藻糖, 敲除 *treY* 基因将有助于阿卡波糖合成和下游处理。

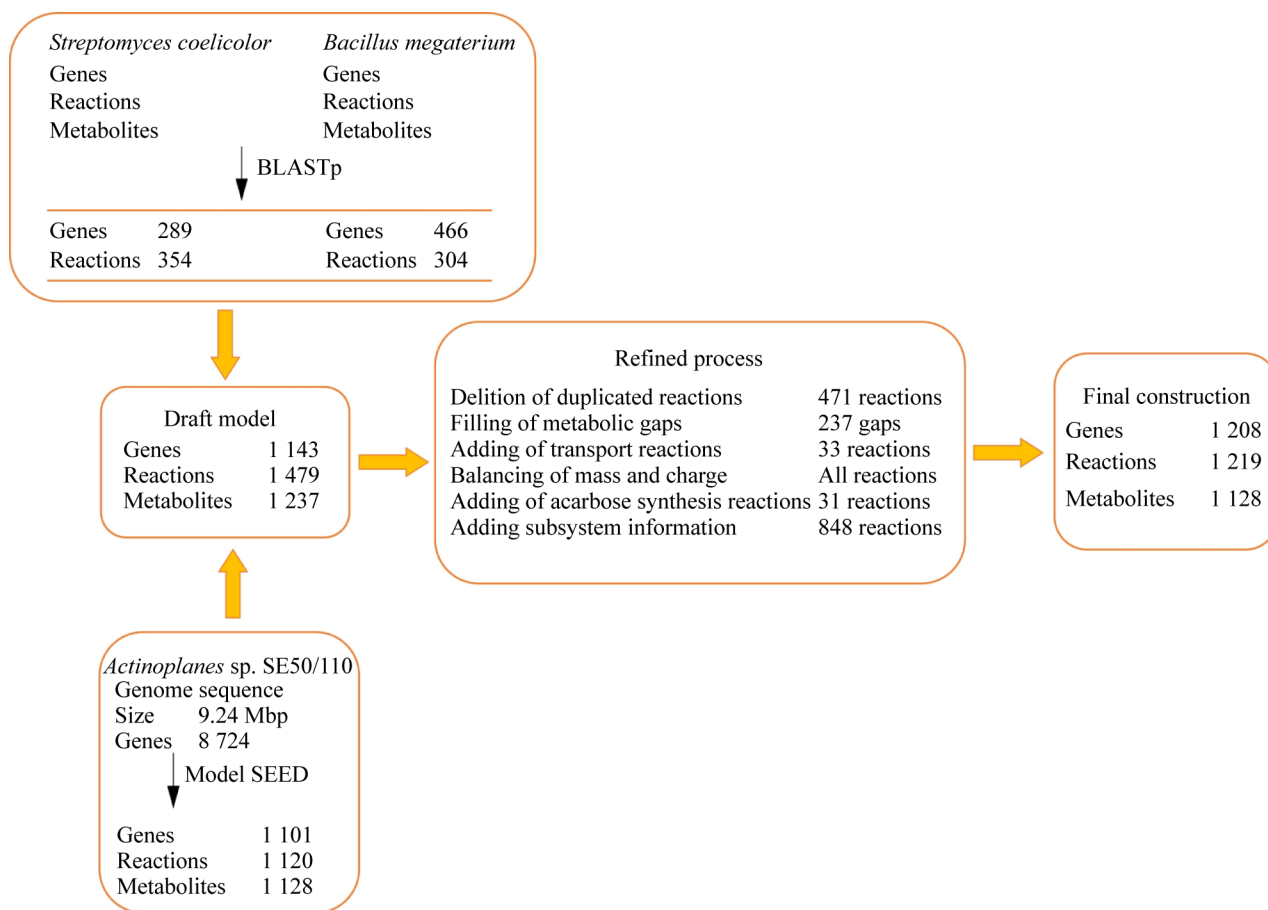


图 3 代谢模型重构过程<sup>[28]</sup>

Figure 3 Reconstruction of the metabolic model<sup>[28]</sup>.

敲除 *treY* 基因显著降低甚至阻断组分 C 形成的报道确证了该预测的准确性<sup>[40-41]</sup>。该模型有助于优化游动放线菌的阿卡波糖生产和系统代谢工程。

### 3.3.5 生物合成途径关键酶强化

Schaffert 等将强启动子引入 pSET152 系统, 在 *Actinoplanes* sp. SE50/110 中过表达了 *acbC* 基因, 其编码的环化酶 AcbC 催化阿卡波糖生物合成的第一步反应, 使 7-P-景天庚糖 (sedo-heptulose 7-P) 发生分子内环化得到 2-*epi*-5-*epi*-valiolone, 并将该菌的初级代谢 (磷酸戊糖途径) 和次级代谢 (阿卡波糖合成) 耦联<sup>[32]</sup>。但过表达 *acbC* 基因并没有增加阿卡波糖产量, 过表达最强的突变株阿卡波糖产量反而轻微下降。LC-MS 分析表明这种现象是由过表达突变株积累的中间体 1-*epi*-valienol-7P 所导致的负反馈抑制造成的。这也是后续阿卡波糖生物合成步骤的瓶颈之一。该过表达系统为研究单个基因的功能提供了有效的工具。

### 3.3.6 转录和转录后调控

Droste 等通过 RNA-seq 和由生物反应器获得的最新的蛋白组学数据, 分析了 *Actinoplanes* sp. SE50/110 生长过程中基因表达动态。系统聚类分析揭示了在生长过程中具有相同转录动力学的共表达基因。除了一个预期的在初级代谢到次级代谢转换阶段的代谢开关, 还观察到从生长初期到稳定期所有阿卡波糖合成基因转录丰度都在持续下降, 下降幅度最大的是单顺反子转录的 *acbA*、*acbB*、*acbD* 和 *acbE* 基因。结果证实了 *acb* 基因转录和阿卡波糖合成速率具有相同趋势。但蛋白组动态与相应的基因转录动态并不一致, 说明各 Acb 蛋白具有不同的稳定性或转录后调控, 反之也表明阿卡波糖生物合成中的瓶颈。同时也发现包括 11 个转录调控子 (如 ACSP50\_0424)、2 个  $\sigma$  因子在内的一些

基因在培养期间与 *acb* 基因簇共表达, 这些基因在之前的研究中没有受到重视。因此, 高时间分辨率的基因组范围的转录组和蛋白组分析将有助于阿卡波糖的生物合成途径及其转录和后转录调控研究<sup>[58]</sup>。

### 3.3.7 代谢支路的影响

缺乏对阿卡波糖及其结构类似物杂质合成机制的深入了解制约了阿卡波糖产量的提升。Zhao 等发现在发酵液中 1-*epi*-valienol 和 valienol 与阿卡波糖摩尔比极高, 是与阿卡波糖生物合成不直接相关的支路产物<sup>[30]</sup>。而这些支路产物的合成与氨基脱氧己糖生物合成效率不足有关。通过减小流向支路产物的代谢通量和强化氨基脱氧己糖供给对阿卡波糖的生物合成进行了有效调控, 显著提高了阿卡波糖产量。充分说明了阿卡波糖生物合成途径的可调控性, 也彰显了在提升微生物药物生产水平过程中评估副产物积累的重要性。

### 3.3.8 小分泌蛋白 Cgt 的影响

蛋白组学<sup>[23]</sup>和转录组学<sup>[22]</sup>分析发现 *Actinoplanes* sp. SE50/110 会高分泌表达一种具有一个碳水化合物结合域 (carbohydrate-binding module) 的小分泌蛋白 Cgt (约占总分泌蛋白的 8%), 其表达具有碳源依赖性<sup>[22-23]</sup>, 但碳源对其表达的调控机制还有待于解析。Schaffert 等利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 *Actinoplanes* sp. SE50/110  $\Delta$ *cgt* 突变株以考察 Cgt 的功能, 发现突变株的生长、渗透压和 pH 耐受性与原始菌株相比没有显著差异, 但在含麦芽糖培养基中阿卡波糖产量较原始菌株提高了 8%–16%。鉴于敲除 *cgt* 对 *acb*-基因簇表达没有显著影响, 阿卡波糖产量的提升可能与敲除 *cgt* 基因减轻了菌株合成 Cgt 的代谢负担有关, 这些节约的资源流向了阿卡波糖合成途径<sup>[61]</sup>。

上述研究从各个层面探究了阿卡波糖及其

结构类似杂质的合成及调控机制,但从结果来看,还处于初级阶段,需要结合组学分析、基因工程改造等手段进行系统全面的研究。

## 4 总结与展望

鉴于阿卡波糖在II型糖尿病的治疗中的重要性及其工业化生产中面临的问题,对生产阿卡波糖的游动放线菌进行研究很有必要。综上所述,阿卡波糖产生菌中阿卡波糖及其结构类似物,尤其是结构类似杂质的合成及调控机制还没有完全解析。可能参与杂质形成和调控的基因的发掘,杂质形成途径和机制及其调控、与阿卡波糖代谢的关联等还有待深入研究。阿卡波糖是典型的微生物次级代谢产物,而微生物次级代谢涉及复杂的代谢合成网络和多个基因,往往是由一系列基因控制,不仅有合成基因,还有调控、修饰、转运等相关的基因,这些基因以基因簇的形式存在,途径复杂,结构类似物众多,因此其高效调控一直极具挑战。近年来,迅速发展的基因工程、基因组工程和合成生物学等技术已在微生物次级代谢途径研究和菌株改造方面得到应用,并显示出良好的应用前景<sup>[62-66]</sup>,这为研究阿卡波糖及其结构类似杂质形成和调控机制提供了借鉴。阐明这些机制将有助于阿卡波糖生产菌的改良,并为其他微生物次级代谢产物合成优化提供借鉴。同时,作为一种化学原料药,遗传改造的阿卡波糖菌种用于生产之前时应严格遵循国家食品与药品监督管理局发布的《已上市化学药品变更研究的技术指导原则》等文件的要求申请相关批文<sup>[67-68]</sup>。

## REFERENCES

- [1] Williams R, Colagiuri S, Chan J, et al. IDF Atlas 9th Edition 2019. 9th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2019.
- [2] Li YZ, Teng D, Shi XG, et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: national cross sectional study. *BMJ*, 2020: m997.
- [3] Wehmeier UF. The biosynthesis and metabolism of acarbose in *Actinoplanes* sp. SE 50/110: a progress report. *Biocatal Biotransformation*, 2003, 21(4/5): 279-284.
- [4] Wehmeier UF, Piepersberg W. Biotechnology and molecular biology of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63(6): 613-625.
- [5] Holman RR, Coleman RL, Chan JCN, et al. Effects of acarbose on cardiovascular and diabetes outcomes in patients with coronary heart disease and impaired glucose tolerance (ACE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(11): 877-886.
- [6] Rockser Y, Wehmeier UF. The gac-gene cluster for the production of acarbose from *Streptomyces glaucescens* GLA.O—identification, isolation and characterization. *J Biotechnol*, 2009, 140(1/2): 114-123.
- [7] Ortseifen V, Kalinowski J, Pühler A, et al. The complete genome sequence of the actinobacterium *Streptomyces glaucescens* GLA.O (DSM 40922) carrying gene clusters for the biosynthesis of tetracenomycin C, 5'-hydroxy streptomycin, and acarbose. *J Biotechnol*, 2017, 262: 84-88.
- [8] 夏焕章. 发酵工艺学. 4版. 北京: 中国医药科技出版社, 2019.
- [9] Xia HZ. *Fermentation Technology*. 4th Ed. Beijing: Chinese Medicine Science and Technology Press, 2019 (in Chinese).
- [10] Choi BT, Shin CS. Reduced formation of byproduct component C in acarbose fermentation by *Actinoplanes* sp. CKD485-16. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(6): 1677-1682.
- [11] Wang YJ, Zheng YG, Xue YP, et al. Analysis and determination of anti-diabetes drug acarbose and its structural analogs. *Curr Pharm Anal*, 2011, 7(1): 12-20.
- [12] Wolf T, Droste J, Gren T, et al. The MalR type regulator AcrC is a transcriptional repressor of acarbose biosynthetic genes in *Actinoplanes* sp. SE50/110. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 562.
- [13] Schaffert L, Schneiker-Bekel S, Dymek S, et al. Essentiality of the maltase AmIE in maltose utilization and its transcriptional regulation by the repressor

- AmlR in the acarbose-producing bacterium *Actinoplanes* sp. SE50/110. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2448.
- [13] Feng ZH, Wang YS, Zheng YG. A new microtiter plate-based screening method for microorganisms producing alpha-amylase inhibitors. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2011, 16(5): 894-900.
- [14] Wang YJ, Liu LL, Feng ZH, et al. Optimization of media composition and culture conditions for acarbose production by *Actinoplanes utahensis* ZJB-08196. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(12): 2759-2766.
- [15] Sun LH, Li MG, Wang YS, et al. Significantly enhanced production of acarbose in fed-batch fermentation with the addition of S-adenosylmethionine. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22(6): 826-831.
- [16] Xue YP, Qin JW, Wang YJ, et al. Enhanced production of acarbose and concurrently reduced formation of impurity c by addition of validamine in fermentation of *Actinoplanes utahensis* ZJB-08196. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 705418.
- [17] Wang YJ, Liu LL, Wang YS, et al. *Actinoplanes utahensis* ZJB-08196 fed-batch fermentation at elevated osmolality for enhancing acarbose production. *Bioresour Technol*, 2012, 103(1): 337-342.
- [18] 王远山, 牛鑫森, 郑裕国. 游动放线菌原生质体诱变选育阿卡波糖高产菌株. *食品与发酵工业*, 2013, 39(5): 37-43.  
Wang YS, Niu XM, Zheng YG. Protoplast mutagenesis for improving acarbose production of *Actinoplanes*. *Food Ferment Ind*, 2013, 39(5): 37-43 (in Chinese).
- [19] Weng CY, Shi LZ, Wang YJ, et al. Transcriptome analysis of *Actinoplanes utahensis* reveals molecular signature of saccharide impact on acarbose biosynthesis. *3 Biotech*, 2020, 10(11): 473.
- [20] Schwientek P, Szczepanowski R, Rückert C, et al. The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110. *BMC Genomics*, 2012, 13: 112.
- [21] Xie H, Zhao Q, Zhang X, et al. Comparative functional genomics of the acarbose producers reveals potential targets for metabolic engineering. *Synth Syst Biotechnol*, 2019, 4(1): 49-56.
- [22] Schwientek P, Wendler S, Neshat A, et al. Comparative RNA-sequencing of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110 cultivated in different growth media. *J Biotechnol*, 2013, 167(2): 166-177.
- [23] Wendler S, Hürtgen D, Kalinowski J, et al. The cytosolic and extracellular proteomes of *Actinoplanes* sp. SE50/110 led to the identification of gene products involved in acarbose metabolism. *J Biotechnol*, 2013, 167(2): 178-189.
- [24] Wendler S, Otto A, Ortseifen V, et al. Comprehensive proteome analysis of *Actinoplanes* sp. SE50/110 highlighting the location of proteins encoded by the acarbose and the pyochelin biosynthesis gene cluster. *J Proteom*, 2015, 125: 1-16.
- [25] Wendler S, Otto A, Ortseifen V, et al. Comparative proteome analysis of *Actinoplanes* sp. SE50/110 grown with maltose or glucose shows minor differences for acarbose biosynthesis proteins but major differences for saccharide transporters. *J Proteomics*, 2016, 131: 140-148.
- [26] Wendler S, Ortseifen V, Persicke M, et al. Carbon source dependent biosynthesis of acarbose metabolites in *Actinoplanes* sp. SE50/110. *J Biotechnol*, 2014, 191: 113-120.
- [27] Li KT, Peng WF, Xia W, et al. Metabolic differences of industrial acarbose-producing *Actinoplanes* sp. A56 under various osmolality levels. *World J Microbiol Biotechnol*, 2016, 32(1): 3.
- [28] Wang YL, Xu N, Ye C, et al. Reconstruction and in silico analysis of an *Actinoplanes* sp. SE50/110 genome-scale metabolic model for acarbose production. *Front Microbiol*, 2015, 6: 632.
- [29] 张丹, 赵芹芹, 蒋明, 等. 游动放线菌 *Actinoplanes* sp. SE50/110 中阿卡波糖脱氧氨基糖单元的生物合成. *微生物学报*, 2020, 60(1): 118-134.  
Zhang D, Zhao QQ, Jiang M, et al. Biosynthetic pathway of deoxyaminosugar moiety in acarbose from *Actinoplanes* sp. SE50/110. *Acta Microbiol Sin*, 2020, 60(1): 118-134 (in Chinese).
- [30] Zhao Q, Luo Y, Zhang X, et al. A severe leakage of intermediates to shunt products in acarbose biosynthesis. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1468.
- [31] Gren T, Ortseifen V, Wibberg D, et al. Genetic engineering in *Actinoplanes* sp. SE50/110 — development of an intergeneric conjugation system for the introduction of actinophage-based integrative vectors. *J Biotechnol*, 2016, 232: 79-88.
- [32] Schaffert L, März C, Burkhardt L, et al. Evaluation of vector systems and promoters for overexpression of the acarbose biosynthesis gene *acbC* in *Actinoplanes* sp. SE50/110. *Microb Cell Factories*, 2019, 18(1): 114.
- [33] Wolf T, Schneiker-Bekel S, Neshat A, et al. Genome improvement of the acarbose producer *Actinoplanes* sp.

- SE50/110 and annotation refinement based on RNA-seq analysis. *J Biotechnol*, 2017, 25(1): 112-123.
- [34] Hemker M, Stratmann A, Goeke K, et al. Identification, cloning, expression, and characterization of the extracellular acarbose-modifying glycosyltransferase, AcbD, from *Actinoplanes* sp. strain SE50. *J Bacteriol*, 2001, 183(15): 4484-4492.
- [35] 黄剑川, 王超儿, 王亚军. 阿卡波糖结构类似物组分 A 形成机制研究及其制备. *发酵科技通讯*, 2014, 43(4): 1-6.  
Huang JC, Wang CE, Wang YJ. Formation mechanism and purification of acarbose structural analogues component A. *Bull Ferment Sci Technol*, 2014, 43(4): 1-6 (in Chinese).
- [36] Lee JS, Hai T, Pape H, et al. Three trehalose synthetic pathways in the acarbose-producing *Actinoplanes* sp. SN223/29 and evidence for the TreY role in biosynthesis of component C. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80(5): 767.
- [37] Choi BT, Shin CS. Isolation and characterization of a novel intracellular glucosyltransferase from the acarbose producer *Actinoplanes* sp. CKD485-16. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65(3): 273-280.
- [38] 高超, 张山, 何永志, 等. 改造大肠杆菌合成海藻糖途径以高效合成海藻糖. *生物工程学报*, 2015, 31(12): 1784-1788.  
Gao C, Zhang S, He YZ, et al. Construction of a recombinant *Escherichia coli* for high trehalose production. *Chin J Biotechnol*, 2015, 31(12): 1784-1788 (in Chinese).
- [39] Ruhul R, Kataria R, Choudhury B. Trends in bacterial trehalose metabolism and significant nodes of metabolic pathway in the direction of trehalose accumulation. *Microb Biotechnol*, 2013, 6(5): 493-502.
- [40] 余贞, 李美红, 李娜, 等. 游动放线菌 8-22 中 treY 基因敲除对于降低阿卡波糖 C 组分的作用. *微生物学通报*, 2015, 42(7): 1301-1306.  
Yu Z, Li MH, Li N, et al. Effect of treY gene inactivation on reducing of acarbose component C in *Actinoplanes* 8-22. *Microbiol China*, 2015, 42(7): 1301-1306 (in Chinese).
- [41] Zhao Q, Xie H, Peng Y, et al. Improving acarbose production and eliminating the by-product component C with an efficient genetic manipulation system of *Actinoplanes* sp. SE50/110. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2(4): 302-309.
- [42] Nakae S, Ito S, Higa M, et al. Structure of novel enzyme in mannan biodegradation process 4-O- $\beta$ -d-mannosyl-d-glucose phosphorylase MGP. *J Mol Biol*, 2013, 425(22): 4468-4478.
- [43] 周鲁谨, 何志勇, 陈喆明, 等. 高纯度阿卡波糖的制备方法: 中国发明专利, ZL2007100198741, 2007.  
Zhou LJ, He ZY, Chen ZM, et al. Preparation of high purity acarbose: China, ZL2007100198741, 2007 (in Chinese).
- [44] 张琴, 胡海峰, 朱宝泉. 阿卡波糖产生菌的选育和发酵工艺优化. *中国医药工业杂志*, 2008, 39(11): 820-822.  
Zhang Q, Hu HF, Zhu BQ. Breeding of acarbose-producing strain and improvement of fermentation technology. *Chin J Pharm*, 2008, 39(11): 820-822 (in Chinese).
- [45] 牛鑫淼. 阿卡波糖产生菌基因组重排育种[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013.  
Niu XM. Improvement of acarbose-producing strain by genome shuffling[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2013 (in Chinese).
- [46] Cheng X, Peng WF, Huang L, et al. A novel osmolality-shift fermentation strategy for improving acarbose production and concurrently reducing byproduct component C formation by *Actinoplanes* sp. A56. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(12): 1817-1821.
- [47] Chen XL, Lu YL, Fan YX, et al. Chemical synthesis of validamycin and related natural compounds. *Validamycin and its Derivatives*. Amsterdam: Elsevier, 2017: 165-235.
- [48] De Berardis D, Orsolini L, Serroni N, et al. A comprehensive review on the efficacy of S-Adenosyl-L-methionine in Major Depressive Disorder. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2016, 15(1): 35-44.
- [49] 孙丽慧, 张国海, 李明刚, 等. S-腺苷蛋氨酸对微生物次生代谢产物的调控作用与机制研究进展. *食品与发酵工业*, 2013, 39(2): 128-134.  
Sun LH, Zhang GH, Li MG, et al. Metabolic regulation and mechanism of S-adenosylmethionine on the microbial secondary metabolites—a review. *Food Ferment Ind*, 2013, 39(2): 128-134 (in Chinese).
- [50] Walvekar AS, Laxman S. Methionine at the heart of anabolism and signaling: perspectives from budding yeast. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2624.
- [51] Rinschen MM, Ivanisevic J, Giera M, et al. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(6): 353-367.

- [52] 李明刚. 添加腺苷蛋氨酸和  $\gamma$ -丁内酯提高阿卡波糖产量的工艺研究[D]. 浙江: 浙江工业大学, 2012.  
Li MG. Research on the technology of enhancing the acarbose production by adding s-adenosylmethionine and  $\gamma$ -butyrolactone[D]. Zhejiang: Zhejiang University of Technology, 2012.
- [53] Kong D, Wang X, Nie J, et al. Regulation of antibiotic production by signaling molecules in *Streptomyces*. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2927.
- [54] Barreales EG, Payero TD, Jambrina E, et al. The gamma-butyrolactone system from *Streptomyces filipinensis* reveals novel clues to understand secondary metabolism control. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(18):e00443-20.
- [55] Lee S, Sauerbrei B, Niggemann J, et al. Biosynthetic studies on the alpha-glucosidase inhibitor acarbose in *Actinoplanes* sp.: source of the maltose unit. *J Antibiot (Tokyo)*, 1997, 50(11): 954-960.
- [56] 姜玮, 生英涛, 蔡月明, 等. 麦芽糖浓度和渗透压对游动放线菌生长及阿卡波糖生物合成的综合影响. *中国医药工业杂志*, 2010, 41(3): 178-182.  
Jiang W, Sheng YT, Cai YM, et al. Comprehensive effects of acarbose concentration and medium osmotic pressure on acarbose production in *Actinoplanes* sp. fermentation. *Chin J Pharm*, 2010, 41(3): 178-182 (in Chinese).
- [57] 解慧欣, 赵芹芹, 白林泉. 麦芽糖及转运蛋白对游动放线菌生产阿卡波糖的影响. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(10): 4536-4544.  
Xie HX, Zhao QQ, Bai LQ. Maltose and transporter's effects on acarbose production in *Actinoplanes*. *Genom Appl Biol*, 2019, 38(10): 4536-4544 (in Chinese).
- [58] Droste J, Ortseifen V, Schaffert L, et al. The expression of the acarbose biosynthesis gene cluster in *Actinoplanes* sp. SE50/110 is dependent on the growth phase. *Bmc Genomics*, 2020, 21(1): 818.
- [59] Wolf T, Gren T, Thieme E, et al. Targeted genome editing in the rare actinomycete *Actinoplanes* sp. SE50/110 by using the CRISPR/Cas9 System. *J Biotechnol*, 2016, 231: 122-128.
- [60] Droste J, Kulisch M, Wolf T, et al. A maltose-regulated large genomic region is activated by the transcriptional regulator MalT in *Actinoplanes* sp. SE50/110. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(21): 9283-9294.
- [61] Schaffert L, Schneiker-Bekel S, Gierhake J, et al. Absence of the highly expressed small carbohydrate-binding protein Cgt improves the acarbose formation in *Actinoplanes* sp. SE50/110. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(12): 5395-5408.
- [62] Baltz RH. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(2/3): 343-370.
- [63] Bilyk O, Luzhetskyy A. Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 42: 98-107.
- [64] Li L, Liu X, Jiang W, et al. Recent advances in synthetic biology approaches to optimize production of bioactive natural products in actinobacteria. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2467.
- [65] Musiol-Kroll EM, Tocchetti A, Sosio M, et al. Challenges and advances in genetic manipulation of filamentous actinomycetes—the remarkable producers of specialized metabolites. *Nat Prod Rep*, 2019, 36(9): 1351-1369.
- [66] Mitousis L, Thoma Y, Musiol-Kroll EM. An update on molecular tools for genetic engineering of actinomycetes—the source of important antibiotics and other valuable compounds. *Antibiotics*, 2020, 9(8): 494.
- [67] 已上市化学药品生产工艺变更研究技术指导原则 [EB/OL]. [2021-03-22]. [http://mpa.gd.gov.cn/zwgk/gzwj/content/post\\_1841496.html](http://mpa.gd.gov.cn/zwgk/gzwj/content/post_1841496.html)
- [68] 已上市化学药品变更事项及申报资料要求 [EB/OL]. [2021-03-22]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/gtg/qtggtg/20210210101731196.html>.

(本文责编 郝丽芳)