

# 一株源自海绵的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性菌的鉴定、培养条件优化及活性物质的分离

俞思羽<sup>1</sup>, 陈毓遒<sup>1</sup>, 姜 薇<sup>1,2</sup>, 夏翊腾<sup>1</sup>, 靳翠丽<sup>1,2</sup>, 周晓见<sup>1,2</sup>

(1. 扬州大学 环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127; 2. 扬州大学 海洋科学与技术研究所, 江苏 扬州 225127)

**摘要:** 为从海洋微生物中获取天然  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性( $\alpha$ -glucosidase inhibiting,  $\alpha$ -GI)化合物, 对一株前期研究发现具有  $\alpha$ -GI 活性的细菌进行鉴定和培养条件优化, 并对其代谢产物进行分离, 获取和鉴定其活性化合物。通过形态学观察和 16S rDNA 测序鉴定活性菌株 HY<sub>95</sub> 为波茨坦短芽孢杆菌 (*Brevibacillus borstelensis*); 采用分析单因素和正交试验选取菌株的最佳培养条件为: 2.5%(V/V)的接种量, 130 r/min 的摇床转速, 28℃ 恒温培养 60 h。经优化后的 MB 培养基中: 蛋白胨 5.00 g/L, 酵母粉 1.50 g/L, 氯化钠 9.725 g/L, pH 7.5; 以生物活性测试为导向, 用化学方法(薄层色谱、高效液相色谱)对其中的活性组分进行分离纯化, 并经核磁共振氢谱分析确定得到一个  $\alpha$ -GI 活性化合物为环(苯丙氨酸-酪氨酸), 其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率为  $53.72\% \pm 4.92\%$ 。为  $\alpha$ -GI 活性化合物的筛选提供了一个极有开发前景的途径和来源。

**关键词:**  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性; 菌株鉴定; 培养条件优化; 活性化合物分离

中图分类号: P745 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)10-0036-09

doi: 10.11759/hyxx20141105002

海洋是地球生命之源, 孕育着最丰富的生物资源。特殊的海洋生态环境(高压、高盐、低营养、缺氧、避光)和漫长的进化历程, 赋予海洋生物拥有相对陆生生物不同的生理功能、代谢产物<sup>[1]</sup>。海洋中微生物的种类繁多, 超过陆生微生物的 20 倍, 已从中发现了众多结构特殊的活性代谢产物, 以及很多产生特殊酶的功能基因<sup>[2-6]</sup>。另外, 由于营养成分缺乏和生态环境条件限制, 海洋中微生物和动植物共生的现象十分普遍<sup>[7]</sup>。海绵的种类繁多, 具有复杂的孔状结构和滤食系统, 迄今为止从海绵中分离到种类繁多的次级代谢产物, 是目前发现的海洋天然产物的最大来源之一<sup>[8-11]</sup>。海绵特殊的身体结构使其是海洋微生物的天然宿主, 海绵共附生微生物约占自身体积的 40%, 不仅具有极高的密度, 而且拥有极高的多样性, 在海绵体内形成非常复杂的微生态系统<sup>[8]</sup>。在近年来的研究海绵天然产物的过程中, 越来越多的证据表明海绵共附生的微生物是其生物活性物质的真正来源<sup>[9-10]</sup>。

酶抑制剂的概念首先由日本 Umezawa 团队在 20 世纪 60 年代初提出, 该理论认为抑制剂在微生物有机体内和酶是共存的, 在抗生素研究的基础上开创

了酶抑制剂研究的新时代<sup>[12]</sup>。微生物能产生多种结构新颖的低分子质量抑制剂, 对于研究酶反应机制、分析立体构造和治疗疾病等都具有重要作用<sup>[13]</sup>。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶是一类能够催化含有  $\alpha$ -糖苷键底物的非还原端水解并释放葡萄糖的酶总称, 对于机体食物的消化、糖蛋白的生物合成、多糖及糖复合物的合成与分解代谢等生物过程起关键作用<sup>[14]</sup>。人们在饮食中摄取碳水化合物, 在  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的作用下分解成单糖吸收入血。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂( $\alpha$ -glucosidase inhibitors,  $\alpha$ -GIs)能可逆地占据  $\alpha$ -葡萄糖苷酶与糖结合位点, 降低酶活性, 阻滞肠道对碳水化合物的消化和吸收, 有效地降低餐后血糖峰值, 成为 II 型糖尿病的首选药物<sup>[14-15]</sup>。来源于微生物的先导化合物开发而成的阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇等, 在

收稿日期: 2014-11-05; 修回时间: 2014-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41076097, 41106113, 41271521); 教育部科学技术研究重点项目资助项目(211065); 江苏省自然科学基金(BK2012267); 江苏省教育厅高校自然科学基金资助项目(11KJB170011)

作者简介: 俞思羽, 女, 浙江舟山人, 硕士研究生, E-mail: yusiyu@xnmsn.cn; 周晓见, 男, 通信作者: 安徽安庆人, 博士, 教授; E-mail: zhouxiaojian@yzu.edu.cn.

临床上得到广泛应用<sup>[16-18]</sup>。另外,  $\alpha$ -GIs 还可以抑制蛋白糖基化和脂类糖基化过程, 影响细胞表面的复合糖质的形成, 也是调整细胞代谢功能的重要分子工具。因此,  $\alpha$ -GIs 不仅对糖尿病有重要的临床价值, 还具有抗癌、抗病毒、免疫刺激活性和抗动脉粥样硬化等作用, 是治疗艾滋病、恶性肿瘤、溶酶体贮积症等的潜在良性药物<sup>[19-20]</sup>。

前期工作已从海绵中分离出多个具有抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的菌株<sup>[22]</sup>, 本文将对一株有  $\alpha$ -GI 活性的海绵共附生细菌 HY<sub>95</sub><sup>[21-23]</sup>, 进行菌株鉴定, 发酵条件优化, 在活性测试指导下对其粗提物进行分离纯化, 得到有  $\alpha$ -GI 活性的化合物, 并利用核磁共振波谱分析确定其结构。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株培养和粗提物提取

菌株 HY<sub>95</sub> 是前期研究从 212 株海绵共附生菌株(由香港科技大学钱培元教授团队分离自美国圣璜岛海域的海绵)中筛选出的其中一株高  $\alpha$ -GI 活性菌株<sup>[21-23]</sup>。

菌株培养所用培养基为 Marine Broth(MB)培养基<sup>[23]</sup>。将保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 的 50%甘油中的菌种接入培养基试管中活化,  $25^{\circ}\text{C}$  恒温培养 48 h 后进行平板划线。挑取单菌落接种至培养基试管中培养 24 h, 以 2.5% 的接种量接种到装有 50 mL 培养基 150 mL 的三角瓶中培养 48 h, 以 2.5% 接种量接种到装有 800 mL 培养基 2 L 的三角瓶中, 在  $28^{\circ}\text{C}$  下 130 r/min 恒温振荡培养 4d。3 次加入等体积溶剂(95%乙酸乙酯+5%丙酮)萃取分离, 收集上层有机相, 减压浓缩得粗提物。

### 1.2 试剂与仪器

$\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -D-glucosidase, EC 3.2.1.20)和 4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, PNPG)均购自美国 Sigma 有限公司; 阿卡波糖(Acarbose, 商品名: 拜糖平)购自北京拜耳医药保健有限公司。

高效液相色谱仪(L-2000 型, 日本 Hitachi 公司); 半制备高效液相色谱仪(LC600, 美国 Labtech 公司); AVANCE 600 核磁共振仪(德国 Bruker 公司)。

### 1.3 抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性测试

参照 Chapdelaine 等<sup>[23-24]</sup>的方法测定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性, 测试在 96 孔板上进行。测试孔中加入 82  $\mu\text{L}$  PBS、40  $\mu\text{L}$  PNPG (10 mmol/L) 和 3  $\mu\text{L}$  待测样品(16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),

于  $37^{\circ}\text{C}$  保温 5 min, 然后加入 25  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液, 反应 25 min 后, 加入 50  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  中止反应, 混匀后测定其在 405 nm 波长下的 OD 值。阴性或阳性对照组分别以 3  $\mu\text{L}$  DMSO(2%)或阿卡波糖(0.8 mg/mL)代替待测样品。空白组只加 147  $\mu\text{L}$  PBS 和 3  $\mu\text{L}$  待测样品, 消除溶液的折光损失和样品颜色对 OD 值的影响。以上每个样品重复 3 次。

抑制剂活力单位定义为: 在相同的条件下降低 1 个酶活力单位所需的抑制剂量。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制率 IR 公式计算:

$$\text{抑制率 IR}(\%) = \left( 1 - \frac{\text{OD}_{\text{实验}} - \text{OD}_{\text{空白}}}{\text{OD}_{\text{阴性对照}}} \right) \times 100\%$$

### 1.4 菌种鉴定方法

形态学特征: 将菌株 HY<sub>95</sub> 平板培养 2 d, 观察菌落形态。

扫描电镜参照谢家仪等方法进行<sup>[23]</sup>: 取过夜培养的菌液, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复 3 次。加 2.5%戊二醛  $4^{\circ}\text{C}$  固定 2 h, 离心弃上清, 超纯水洗 3~4 次。乙醇梯度脱水(20 min/次): 50%、70%、80%、90%各 1 次, 100% 2 次。用 1:1 乙酸戊酯/乙醇置换 30 min, 纯戊酯置换 30 min。粘样, 离子溅射金, 在扫描电镜下观察。

16S rDNA 测序分析: 取过夜培养的菌液, 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA。16S rDNA 的 PCR 扩增参照 Moreno 等的方法<sup>[26]</sup>。对 PCR 产物进行凝胶电泳检测, 由上海生工生物技术有限公司完成测序。将 16S rDNA 序列与 Gen-Bank 比对, 获得同源序列, 采用 MEGA5.05 软件构建系统发育树确定该菌株的分类地位。

### 1.5 菌株发酵条件优化

单因素试验设置: 1、培养时间: 0、30 min 和 4、8、12、16、20、24、36、48、60、72 h; 2、接种量: 1%、2.5%、5%和 7.5%(V/V); 温度: 18、23、28 和  $33^{\circ}\text{C}$ ; 3、摇床转速: 80、110、130、150 和 180 r/min。分别测定培养结束时 630 nm 下的吸光度值以表征菌株的生长状况。

正交试验设置: 根据前期工作结果分析, 在 MB 培养基的基础上选定 pH、蛋白胨浓度、酵母粉浓度、NaCl 浓度四个对菌株生长和活性影响较大的因素进行正交试验。设置 4 因素 3 水平 3 重复试验, 选用  $L_9(3^4)$  正交表, 见表 1。

表 1 培养条件正交实验  $L_9(3^4)$  水平表

Tab.1 Orthogonal test  $L_9(3^4)$  of fermentation condition

| 水平 | 蛋白胨(g/L) | 酵母粉(g/L) | NaCl(g/L) | pH  |
|----|----------|----------|-----------|-----|
| 1  | 2.5      | 0.5      | 9.725     | 5.5 |
| 2  | 5.0      | 1.0      | 19.45     | 7.5 |
| 3  | 7.5      | 1.5      | 29.175    | 9.5 |

### 1.6 菌株活性化合物的分离与鉴定

对菌株进行规模发酵(68 L), 经处理, 获得粗提物 4.028 g。根据活性追踪指导下的分离原理, 对粗提物进行逐级分离, 采用的分离手段有硅胶柱分离、ODS 减压柱分离和半制备 HPLC 分离。所用流动相根据同步进行的薄层层析(Thin layer chromatography, TLC)测试结果选择。半制备 HPLC 的色谱条件为: C18: 0.46 cm × 25 cm; MeOH/H<sub>2</sub>O=20%~60%; 流速  $v=1.0$  mL/min; 检测波长 210 nm; 梯度洗脱 40 min。

分离纯化后的活性化合物, 通过核磁共振谱鉴定结构。在 600 MHz 下共振测量 <sup>1</sup>H-NMR 谱; 在 125 MHz 下共振测量 APT 谱(Attached Proton Test, 所连质子测试实验碳谱)。

### 1.7 数据处理

本文中的单因素培养条件优化和代谢产物粗提

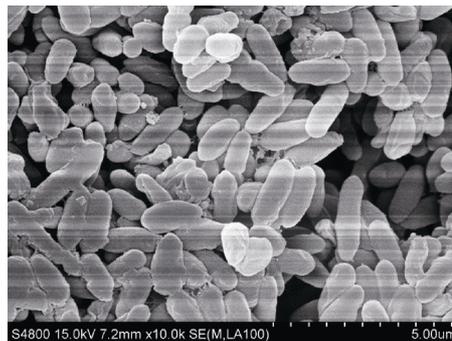
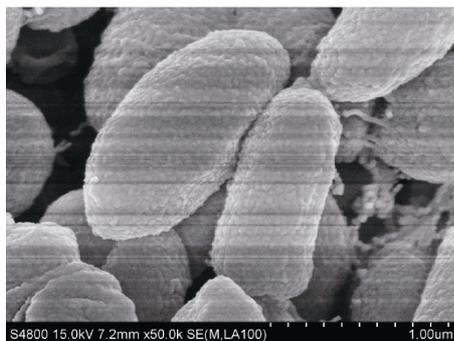


图 2 菌 HY<sub>95</sub> 的场发射扫描电子显微镜照片

Fig. 2 Photograph of strain HY<sub>95</sub> by Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM)

通过 16S rDNA 测序, 得到 1446 个碱基序列。进行同源性检索比较, 选取 9 株亲缘关系较近的菌株构建系统发育树(图 3)。可以看出 HY<sub>95</sub> 与芽孢杆菌属的波茨坦短芽孢杆菌(*Brevibacillus borstelensis*) 同源性很高, 有 99% 以上的相似度, 所以, 鉴定菌株 HY<sub>95</sub> 为波茨坦短芽孢杆菌。

### 2.2 菌株培养条件优化

对 4 个培养条件(培养时间、接种量、摇床转速、培养温度)进行单因子试验, 测定其 OD<sub>630</sub> 值, 结果如图 4 所示。以较高的菌体密度为培养目标、兼顾

物分离片段的活性比较, 采用方差分析(Duncan's 新复极差法)确定差异的显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株鉴定

菌株 HY<sub>95</sub> 菌落呈半球形、淡黄色, 边缘整齐, 表面湿润光滑(图 1)。用扫描电镜观察(图 2), 菌体呈条形短杆状。



图 1 菌株 HY<sub>95</sub> 的菌落照片

Fig. 1 Photograph of strain HY<sub>95</sub> colonies on agar dish

效率的原则, 确定菌株 HY<sub>95</sub> 的培养条件为: 培养时间 60 h、接种量 2.5%(*V/V*)、摇床转速 130 r/min、培养温度 28℃。

在 MB 培养基的基础上, 进行 4 因素(pH、蛋白胨浓度、酵母粉浓度、NaCl 浓度)3 水平 3 重复试验。以  $\alpha$ -GI 活性为指标进行测定分析, 正交试验结果如表 2 所示。

根据各水平均值(*ki*)大小, 各因素最适水平分别为 A<sub>2</sub>(7.5)、B<sub>3</sub>(7.5)、C<sub>3</sub>(1.5)、D<sub>2</sub>(19.45)。通过极差(*R*)分析, 各因素对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的影响由大到小依次为: pH(因素 A)>酵母粉(因素 C)>NaCl(因素

D)>蛋白胨(因素 B)。因此, 最佳培养基成分的理论组合为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>, 根据各因素对试验影响显著性的大小, 选取最接近的组合 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>, 该件下的粗提物对 α-GI 活性较高, 且该组合下粗提物产量最高, 代谢产物得率达到 0.0654 g/L。因此, 优化后的 MB 培养基中蛋白胨、酵母粉、和 NaCl 的浓度分别为:

5.00, 1.50 和 9.725g/L, pH 为 7.5。

### 2.3 活性物质的逐级分离与鉴定

通过 HY<sub>95</sub> 粗提物的 TLC 点样分析, 用硅胶柱分离, 采用二氯甲烷+甲醇、丙酮体系溶剂进行梯度洗脱, 按极性从小到大的顺序分别为: 100:1, 50:1, 40:1,

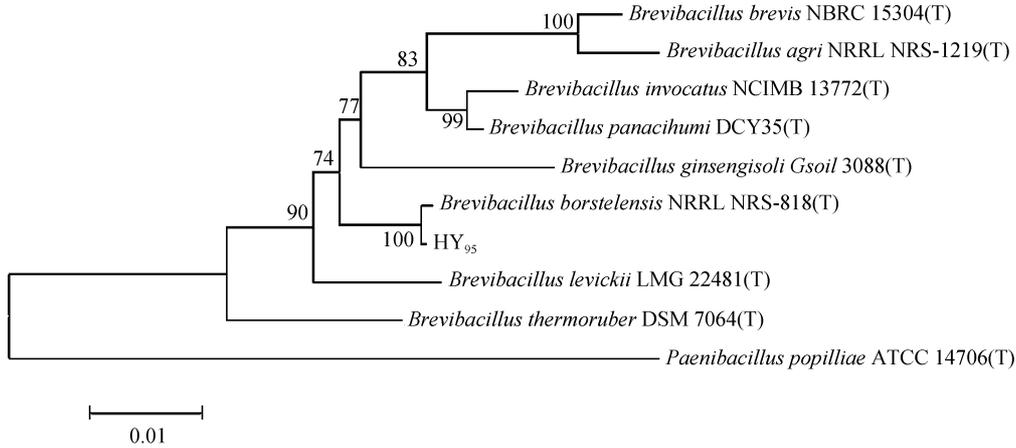


图 3 菌 HY<sub>95</sub> 的基于 16S rDNA 基因的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences for strain HY<sub>95</sub>

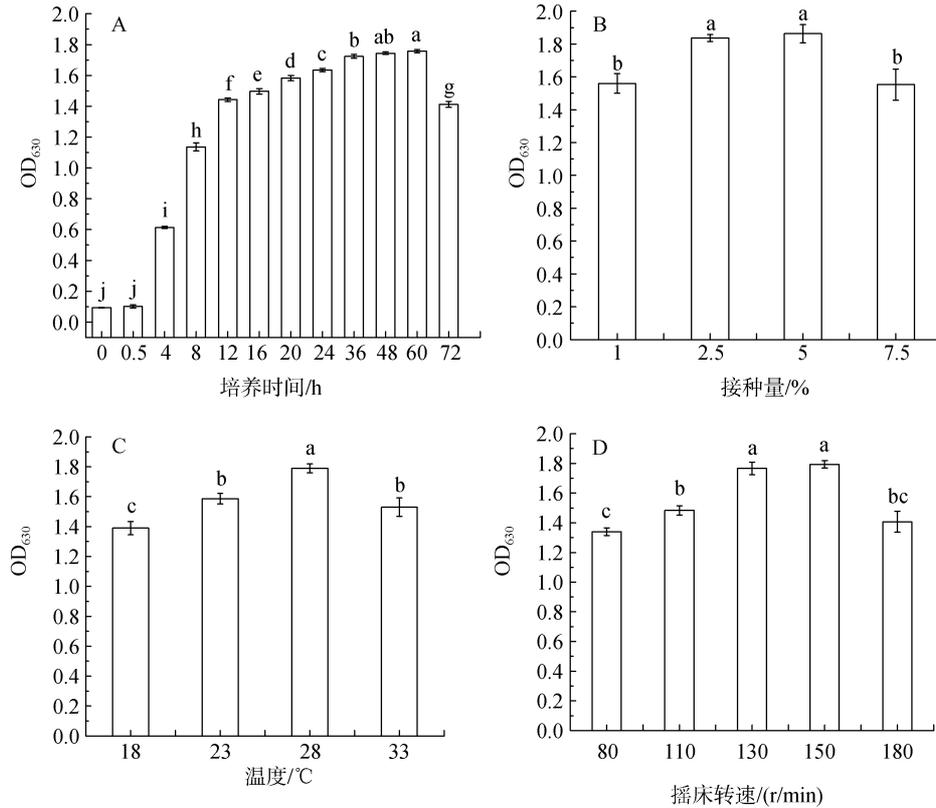


图 4 菌株 HY<sub>95</sub> 的生长(以吸光度表示)和培养条件的关系

Fig.4 The relationship between absorbance of strain culture and culture conditions for strains HY<sub>95</sub>

柱上有相同字母的两组数据, 表示两者经 Duncan's 新复极差法检验, 其差异不显著; 反之则表示差异显著 ( $P=0.05$ )

The same letter of data column indicates the difference was not significant by Duncan's multiple range test; otherwise indicates significant difference ( $P = 0.05$ )

表 2 菌株优化培养基成分优化正交试验结果  $L_9(3^4)$

Tab. 2 The results of orthogonal test  $L_9(3^4)$  on medium optimization

| 试验号 | pH      | 蛋白胨(g/mL) | 酵母粉(g/mL) | NaCl(g/mL) | $\alpha$ -GI 活性(%) |                 |       | $\bar{T}_i$ |
|-----|---------|-----------|-----------|------------|--------------------|-----------------|-------|-------------|
|     | A       | B         | C         | D          | 1                  | 2               | 3     |             |
| 1   | A1(5.5) | B1(2.5)   | C1(0.5)   | D1(9.725)  | 10.43              | 9.88            | 16.20 | 36.51       |
| 2   | A1(5.5) | B2(5)     | C2(1)     | D2(19.45)  | 14.68              | 12.08           | 16.45 | 43.21       |
| 3   | A1(5.5) | B3(7.5)   | C3(1.5)   | D3(29.175) | 24.94              | 25.11           | 21.48 | 71.53       |
| 4   | A2(7.5) | B1(2.5)   | C2(1)     | D3(29.175) | 44.69              | 44.68           | 54.32 | 143.69      |
| 5   | A2(7.5) | B2(5)     | C3(1.5)   | D1(9.725)  | 55.70              | 55.87           | 46.16 | 157.73      |
| 6   | A2(7.5) | B3(7.5)   | C1(0.5)   | D2(19.45)  | 55.91              | 61.46           | 51.66 | 169.03      |
| 7   | A3(9.5) | B1(2.5)   | C3(1.5)   | D2(19.45)  | 58.05              | 52.50           | 41.27 | 151.82      |
| 8   | A3(9.5) | B2(5)     | C1(0.5)   | D3(29.175) | 31.01              | 42.00           | 35.49 | 108.51      |
| 9   | A3(9.5) | B3(7.5)   | C2(1)     | D1(9.725)  | 40.58              | 47.78           | 27.15 | 115.50      |
| K1  | 151.25  | 332.02    | 314.05    | 309.73     |                    |                 |       |             |
| K2  | 470.45  | 309.44    | 302.39    | 364.06     |                    |                 |       |             |
| K3  | 375.83  | 356.06    | 381.08    | 323.73     |                    |                 |       |             |
| k1  | 50.416  | 110.673   | 104.682   | 103.244    |                    | $\sum T=997.52$ |       |             |
| k2  | 156.816 | 103.148   | 100.798   | 121.352    |                    |                 |       |             |
| k3  | 125.276 | 118.687   | 127.028   | 107.912    |                    |                 |       |             |
| R   | 106.400 | 15.539    | 26.229    | 18.108     |                    |                 |       |             |

3:1, 1:1, 丙酮, 甲醇。将得到的 7 个组分标记为 Fr-1~Fr-7, 其中 Fr-4 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用最好, 抑制率为 44.71%(图 5), 质量比重也最高(质量占比 34.09%), 位于中等极性区域。因此, 选取 Fr-4 进行下一步分离。

对 Fr-4 进行 TLC 分析得出该组分的极性中等偏大, 试验采用 ODS 柱分离, 采用甲醇/水体系进行梯度洗脱, 按极性从大到小的顺序分别为: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 得到 10 个组分: Fr-4.1~Fr-4.10。其中 Fr-4.2 对  $\alpha$ -葡萄糖苷

酶的抑制作用最好, 抑制率值 60.62%(图 6), 质量占比也最大(占总质量的 19.87%)。因此对 Fr-4.2 进行下一步分离。

用半制备液相对 Fr-4.2 进行制备分离, 根据出峰顺序按保留时间进行片段分割(图 7), 得到组分 Fr-4.2.1~Fr-4.2.10(图 8)。其中 Fr-4.2.6 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶有良好的抑制作用, 其抑制率为  $53.72\% \pm 4.92\%$ , 其活性相比 Fr-4.2 有所降低, 可能由于部分活性组分在分离过程中丢失或因分离导致的协同效应部分丧失<sup>[22]</sup>。

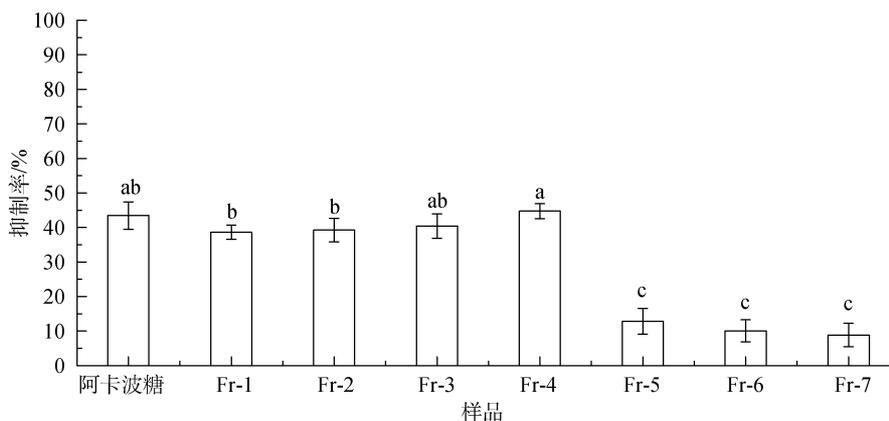


图 5 硅胶柱分离各组分的  $\alpha$ -GI 活性

Fig.5  $\alpha$ -GI activities of the fractions after silica gel column separation

柱上有相同字母的两组数据, 表示两者经 Duncan's 新复极差法检验, 其差异不显著; 反之则表示差异显著( $P=0.1$ )。下同  
The same letter of data column indicates the difference was not significant by Duncan's multiple range test; otherwise indicates significant difference ( $P = 0.05$ )

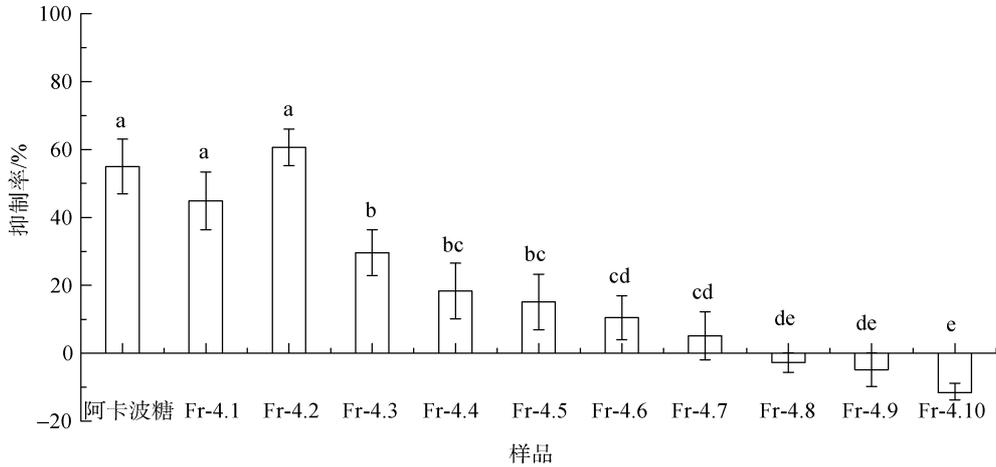


图 6 ODS 柱分离各组分的  $\alpha$ -GI 活性

Fig.6  $\alpha$ -GI activities of the fractions after ODS column separation

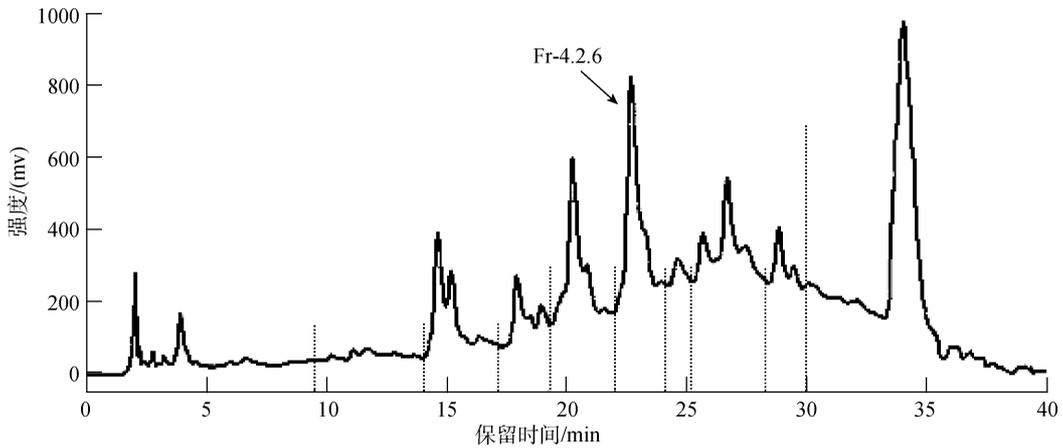


图 7 利用半制备高压液相对 Fr-4.2 进行制备分离

Fig.7 Semi-preparative HPLC profile for the separation of Fr-4.2

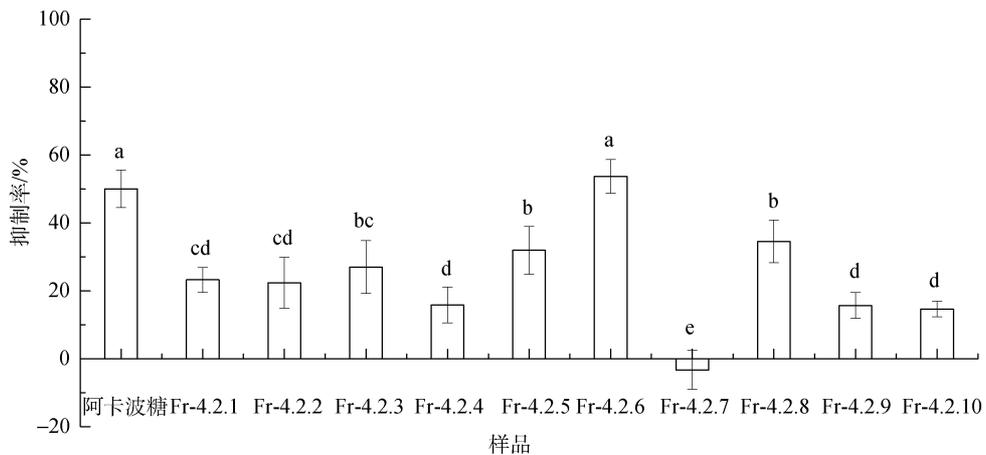


图 8 半制备 HPLC 分离纯化各组分的  $\alpha$ -GI 活性

Fig.8  $\alpha$ -GI activities of the fractions after semi-preparative HPLC separation

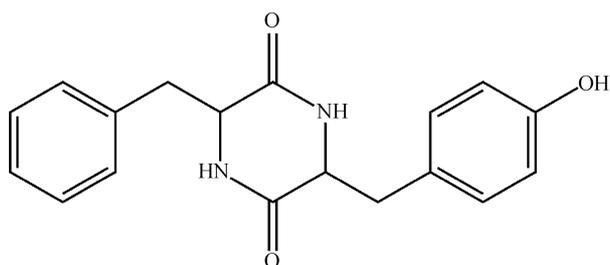
通过以  $\alpha$ -GI 活性为导向的逐步分离、纯化，得到的高活性组分 Fr-4.2.6，经 HPLC 分析发现，纯度

很高，无明显杂峰。所以，对 Fr-4.2.6 进行了 NMR 分析，NMR 波谱解析数据如下：

(1)  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz, TMS):  $\delta_{\text{H}}$ : 9.27 (s, 1H), 7.89 (brs, 2H), 7.29 (t, 2H,  $J=8.0$  Hz), 7.22 (t, 1H,  $J=8.0$  Hz), 7.29 (t, 2H,  $J=8.0$  Hz), 7.05 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz), 6.69 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz), 6.85 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz), 3.95 (1H), 3.90 (1H), 3.37 (m, 1H), 2.52 (m, 1H), 2.20 (m, 2H).

(2) APT NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz, TMS):  $\delta_{\text{C}}$ : 166.4 (C), 166.2 (C), 156.3 (C), 136.7 (C), 130.8 ( $2 \times \text{CH}$ ), 129.8 ( $2 \times \text{CH}$ ), 128.2 ( $2 \times \text{CH}$ ), 126.5 (CH), 126.4 (C), 115.1 (CH), 55.8 (CH), 55.5 (CH), 39.4 ( $\text{CH}_2$ ), 38.6 ( $\text{CH}_2$ ).

该化合物在 APT 谱图中  $\delta_{\text{C}}$  166.4 (s) 和 156.3 (s) 处有两个羰基碳,  $\delta_{\text{C}}$  55.8 和 55.5 处有两个叔碳, 结合  $^1\text{H}$  NMR  $\delta_{\text{H}}$  3.95(d) 和 3.90(d) 处和  $\delta_{\text{H}}$  7.89 处两个活泼质子, 推测该化合物具有二氧嘧啶类结构, 母核为环二肽物质。 $^1\text{H}$  NMR 中,  $\delta_{\text{H}}$  6.69 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.85 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz) 提示结构中存在 AA'BB' 耦合系统, APT 谱图中  $\delta_{\text{C}}$  156.3 (s) 提示苯环对位存在羟基取代, 因而推断环二肽结构中的一个氨基酸为酪氨酸。 $\delta_{\text{H}}$  7.22 (t, 1H,  $J=8.0$  Hz), 7.29 (t, 2H,  $J=8.0$  Hz), 7.05 (d, 2H,  $J=8.0$  Hz) 提示结构中存在单取代苯环, 推测结构中含有一个苯丙氨酸, 通过比对文献数据<sup>[27-28]</sup>, 确定该化合物结构为 Cyclo(Phe-Tyr), 环(苯丙氨酸-酪氨酸), 其平面结构如图 10 所示。



Chemical Formula:  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$

Exact Mass: 310.13

Molecular Weight: 310.35

$m/z$ : 310.13(100.0%), 311.14(19.8%), 312.14(2.5%)

Elemental Analysis: C, 69.66; H, 5.85; N, 9.03; O, 15.47

图 9 环(苯丙氨酸-酪氨酸)平面结构

Fig.9 The flat structure of Cyclo (Phe-Tyr)

### 3 讨论

本实验通过菌落形态、显微观察和 16S rDNA 测序鉴定菌株 HY<sub>95</sub> 为波茨坦短芽孢杆菌(*Brevibacillus borstelensis*); 采用分析单因素确定菌株的最佳培养条件为: 2.5%(V/V)的接种量, 130 r/min 的摇床转速,

28℃ 恒温培养 60 h。并通过正交试验优化后的 MB 培养基中含蛋白胨、酵母膏和 NaCl 分别为 5、1.5 和 9.725 g/L, 而 pH 为 7.5; 以  $\alpha$ -GI 活性为导向, 对该菌株的代谢产物用硅胶柱、ODS 柱、半制备 HPLC 逐步分离纯化活性组分, 得到的活性化合物经波谱分析鉴定为环(苯丙氨酸-酪氨酸)(Cyclo(Phe-Tyr)), 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率为  $53.72\% \pm 4.92\%$ , 高于作为阳性对照的阿卡波糖(约 45%)。

环二肽类化合物广泛存在于自然界中, 具有抗菌、抗肿瘤、调节激素、抑制群体感应等广泛的生物活性<sup>[29-30]</sup>。结构不同的环二肽, 生物活性和功能显著不同, 不过其生物学意义和药理活性的研究还不完善<sup>[29]</sup>。海绵共附生微生物是天然环二肽的重要来源<sup>[29, 31]</sup>, 本研究通过对微生物发酵条件优化, 大大提高了活性物质获取的效率, 为先导化合物的取得提供了稳定的保障。在活性追踪下对粗提物进行的逐级分离手段使试验高效地分离得到单个活性化合物, 得到的环二肽 Cyclo(Phe-Tyr)可以有效抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性。此外, 海洋微生物来源的环二肽类, 有着小分子量、低生物毒性等优势, 在生物功能和疾病过程的研究方面有很大的潜力, 更能适应药理学的性能, 在安全性方面有良好的保证<sup>[13, 15]</sup>。有资料表明, Cyclo(Phe-Tyr)在心血管系统等方面有一定的作用<sup>[31]</sup>, 其  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性未见报道。对于 Cyclo(Phe-Tyr)的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性机理, 以及是否有其他生物活性还需要进一步探究。后续工作建议: 开展动物实验, 考察 Cyclo(Phe-Tyr)在体内的效果, 以及研究其  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制的活性位点; 利用基因工程等技术手段, 对菌株进行改造, 以获得抑制效果更好的活性物质。

#### 参考文献:

- [1] 史清文, 顾玉诚. 海洋天然药物的研究概况[J]. 河北医科大学学报, 2006, (4): 308-313.
- [2] Imada C. Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2005, 87: 59-63.
- [3] Bernan V S, Greenstein M, Maiese W M. Marine microorganisms as a source of new natural products[J]. Advance in Applied Microbiology, 1997, 43: 57-90.
- [4] Bugni T S, Ireland C M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms[J]. Natural Products Report, 2004, 21:

- 143-163.
- [5] Radjasa O K. Deep-sea bacteria and their biotechnological potentials[J]. *Journal of Coastal Development*, 2004, 7: 109-118.
- [6] Chen X L, Xie B B, Bian F, et al. Ecological function of myroilysin, a novel bacterial M12 metalloprotease with elastinolytic activity and a synergistic role in collagen hydrolysis, in biodegradation of deep-sea high-molecular-weight organic nitrogen[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75: 1838-1844.
- [7] 郭跃伟. 海洋天然产物和海洋药物研究的历史、现状与未来[J]. *自然杂志*, 2009, 31(1): 27-32.
- [8] Grozdanov L, Hentschel U. An environmental genomics perspective on the diversity and function of marine sponge-associated microbiota [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, 10(3): 215-220.
- [9] Hochmuth T, Piel J. Polyketide synthases of bacterial symbionts in sponges – Evolution-based applications in natural products research[J]. *Phytochemistry*, 2009, 70: 1841-1849.
- [10] Jonathan K, Paul B, Clare P, et al. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11: 384-396.
- [11] Yang L H, Miao L, Lee O O, et al. Effect of culture conditions on antifouling compound production of a sponge-associated fungus[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74: 1221-1231.
- [12] Aoyagi T, Ishizuka M, Takeuchi T, Umezawa H. Enzyme inhibitors in relation to cancer therapy [J]. *The Japanese Journal of antibiotics*, 1978, 30( suppl): 121-132.
- [13] 刘华珍, 王嶽. 微生物产生的酶抑制剂[J]. *抗生素*, 1983, (01): 49-63.
- [14] 范亚平, 蒋季杰, 钱桐荪. 糖尿病治疗的新选择— $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂[J]. *国外医学, 内科学分册*, 1993, 20(9): 392-393.
- [15] 顾觉奋, 陈紫娟. $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的研究及应用[J]. *药学进展*, 2009, 33(2): 62-67.
- [16] Martin A E, Montgomery P A. Acarbose: an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor[J]. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 1996, 53( 9): 2277-2290.
- [17] Seifarth C, Bergmann J, Holst J, et al. Prolonged and enhanced secretion of glucagon-like peptide 1(7-36 amide) after oral sucrose due to alpha-glucosidase inhibition(acarbose) in type2 diabetic patients[J]. *Diabetic Medicine*, 1998, 15(6): 485-491.
- [18] Cherkaoui S, Daali Y, Christen P, et al. Development and validation of liquid chromatography and capillary electrophoresis methods for Acarbose determination in pharmaceutical tablets[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998, 18(4-5): 729-735.
- [19] Seo W D, Kim J H, Kang J E, et al. Sulfonamide chalcone as a new class of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15: 5514-5516.
- [20] De Malo E B, Gomes A D S, Carvalho I.  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity[J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(44): 10277-10302.
- [21] 查鑫垚, 靳翠丽, 陈毓道, 等. 海绵共附生微生物中具有  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性菌株的筛选与初步鉴定[J]. *台湾海峡*, 2012, 31(03): 380-386.
- [22] 查鑫垚. 具有  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的海绵共附生微生物及其活性产物研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [23] 陈毓道. 一株海绵共生芽孢杆菌代谢产物中的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性化合物的分离[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [24] Chapdelaine P, Tremblay R R, Dubé JY. P-Nitrophenol- $\alpha$ -D-glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen[J]. *Clinical chemistry*, 1978, 24(2): 208-211.
- [25] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. *电子显微学报*, 2005, 24(4): 440.
- [26] Moreno C, Romero J, Espejo R T. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*[J]. *Microbiology*. 2002, 148(4): 1233-1239.
- [27] 李春远, 陈敏, 丁唯嘉, 等. 一株南海木榄内生真菌 (*Gloesporium* sp.)代谢产物的研究[J]. 华南农业大学

- 学报, 2008, 29(1): 122-124.
- [28] 王双明, 谭宁华, 杨亚滨, 等. 三七环二肽成分[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(5): 83-386.
- [29] 周世宁, 林永成, 吴雄宇, 等. 海洋真菌与细菌发酵物中的环二肽[J]. 微生物学通报, 2002, 29(3): 59-62.
- [30] Holden M T G, Chhabra SR, de Nys R, et al. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria [J]. Molecular Microbiology, 1999, 33: 1254-1266.
- [31] 杨子娟, 向兰, 邢杰, 等. 环二肽的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(2): 73-81.

## Identification, culture conditions optimization and active compounds isolation for an $\alpha$ -glucosidase inhibiting bacterium from sponges

YU Si-yu<sup>1</sup>, CHEN Yu-qiu<sup>1</sup>, JIANG Wei<sup>1, 2</sup>, XIA Yi-teng<sup>1</sup>, JING Cui-li<sup>1, 2</sup>, ZHOU Xiao-jian<sup>1, 2</sup>

(1. College of Environmental Science & Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China; 2. Marine Science & Technology Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

**Received:** Nov., 5, 2014

**Key words:**  $\alpha$ -glucosidase inhibiting activity; strain identification; optimization of culture conditions; isolation of active compounds

**Abstract:** Aiming at isolating natural  $\alpha$ -glucosidase inhibiting ( $\alpha$ -GI) compounds from marine microorganisms, this paper identified an  $\alpha$ -GI active bacterium (HY<sub>95</sub>) which was screened by previous study. Its culture conditions were optimized and the  $\alpha$ -GI active compounds were isolated from it. Through the morphological observation and the analysis of 16S rDNA sequence, the active strain of HY<sub>95</sub> was identified as *Brevibacillus borstelensis*. By using single factor analysis and orthogonal test, the culture conditions were optimized as inoculum ratio of 2.5% (V/V), shaker speed of 130 rpm, culture temperature of 28°C, and incubation time of 60 h in the modified marine broth medium with 5.00 g/L peptone, 1.50 g/L yeast extract, 9.725 g/L sodium chloride, and the initial pH of 7.5. The active compounds were separated using the column chromatography, thin layer chromatography (TLC), and high performance liquid chromatography (HPLC) with the guidance of bioactive test. The final purified compound was subjected to <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) and was identified as the Cyclo(Tyr-Phe). The  $\alpha$ -GI activity of the pure compound was verified with inhibition rate of 53.72±4.92%. The results of the present study provide a promising direction and source for efficient  $\alpha$ -GI compounds.

(本文编辑: 康亦兼)