



阿卡波糖代谢途径、酶系及发酵菌种改造的研究进展

王雨晴¹, 张贤¹, 李闯^{1,2*}, 薛正莲^{1,2}, 李翔飞^{1,2}

1 安徽工程大学 生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000

2 安徽省工业微生物分子育种工程实验室, 安徽 芜湖 241000

王雨晴, 张贤, 李闯, 薛正莲, 李翔飞. 阿卡波糖代谢途径、酶系及发酵菌种改造的研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4760-4773.

WANG Yuqing, ZHANG Xian, LI Chuang, XUE Zhenglian, LI Xiangfei. Advances in biosynthetic pathways, enzymes, and fermentation strain modification of acarbose[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(12): 4760-4773.

摘要: 阿卡波糖(acarbose)是一种 α -糖苷酶抑制剂, 通过竞争性抑制肠道内蔗糖酶、麦芽糖酶和葡萄糖淀粉酶的活性调节餐后血糖水平, 是一种药理活性极好的降糖药成分。阿卡波糖主要由游动放线菌发酵获得, 其代谢途径主要分为 4 个模块: C₇-环醇的合成、双脱氧氨基葡萄糖的合成、麦芽糖的整合进入和胞外阿卡波糖及其同系物的转运(Carbophore 循环)。本文根据近年来针对阿卡波糖的代谢途径、酶系和发酵菌株改造的研究现状展开综述, 以期为进一步完善阿卡波糖的代谢通路、深入探索相关酶系的催化机制和发酵菌株的分子改造提供思路。

关键词: 阿卡波糖; 代谢途径; 酶系; 菌种改造; 研究进展

资助项目: 国家自然科学基金(32401039, 32300059); 安徽省工业微生物分子育种工程实验室开放基金(ELMB-04)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32401039, 32300059) and the Open Project of Anhui Engineering Laboratory for Industrial Microbiology Molecular Breeding (ELMB-04).

*Corresponding author. E-mail: lichuang@ahpu.edu.cn

Received: 2024-07-10; Accepted: 2024-09-24; Published online: 2024-09-25

Advances in biosynthetic pathways, enzymes, and fermentation strain modification of acarbose

WANG Yuqing¹, ZHANG Xian¹, LI Chuang^{1,2*}, XUE Zhenglian^{1,2}, LI Xiangfei^{1,2}

1 College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China

2 Anhui Engineering Laboratory for Industrial Microbiology Molecular Breeding, Wuhu 241000, Anhui, China

Abstract: Acarbose, an α -glucosidase inhibitor, regulates the postprandial blood glucose level by competitively inhibiting the activities of sucrase, maltase, and glucamylase in the intestine, serving as an ideal drug ingredient with blood glucose-lowering activity. Acarbose is mainly produced by the fermentation of *Actinoplanes* sp., and its biosynthetic pathway is mainly divided into four modules: C₇-cyclitol synthesis, deoxyglucosamine synthesis, maltose integration, and extracellular transport of acarbose and its homologues (carbophore cycle). This paper reviewed the advances in the research fields mentioned above, aiming to provide ideas for further exploring the biosynthetic pathways of acarbose, catalytic mechanisms of related enzymes, and molecular modification of fermentation strains.

Keywords: acarbose; biosynthetic pathway; enzymes; strain modification; research advance

糖尿病(diabetes mellitus)是一种多发性的内分泌疾病,我国当前的患者数量已超过1.4亿,其中II型糖尿病患者约占总发病人数的90%^[1-2]。视网膜、神经元、心血管系统和肝肾功能障碍等并发症不仅严重危害民众的生命健康,还带来了巨大的医疗负担,可见糖尿病的防治具有重要的社会与经济意义^[3]。

阿卡波糖(acarbose)是一种主要由放线菌(*Actinoplanes* sp.)发酵获得的 α -糖苷酶抑制剂,广泛用于II型糖尿病的治疗,其通过竞争性抑制人小肠 α -糖苷酶的活性调节患者的餐后血糖水平^[4-5]。阿卡波糖是一种假四糖化合物,分子结构由阿卡维基(acarvioside)和麦芽糖基两部分组成,阿卡维基又由C₇-环醇和4-氨基-4,6-双脱氧葡萄糖通过N-糖苷键的氨基桥连接而成,该部分竞争性占据 α -糖苷酶的活性位点以抑制该酶的活性,从而降低肠道内糖的水解与吸收速率^[6]。本文将结合近年的研究成果,总结分析阿卡波糖的代谢途径、酶系以及发酵菌株分子改造等方面的研究进展,为进一步完善阿卡波糖的代谢途径、深入研究相关酶的催化机制和发酵菌株的改造提供参考,以期促

进阿卡波糖产量提升与杂质控制。

1 阿卡波糖的生物代谢途径

2003年,Wehmeier^[7]发现*Actinoplanes* sp. SE50/110全基因组中含有阿卡波糖代谢基因簇(*acb*基因簇)。2011年,Schwientek等^[8]通过焦磷酸测序技术对*Actinoplanes* sp. SE50/110进行全基因组测序,证实其基因组中含有完整的*acb*基因簇。随后,该团队首次在NCBI上公开了*Actinoplanes* sp.的全基因组信息(GenBank登录号为CP003170)^[9]。2015年,Wendler等^[10]对*Actinoplanes* sp. SE50/110展开全面的蛋白质组学分析,明确了*acb*基因簇在全基因组中的定位。目前,*acb*基因簇已基本清晰,包括合成相关基因*acb* CMOLNUJRSIVBA、胞外阿卡波糖代谢相关基因*acb* DEZ、跨膜转运蛋白复合体基因*acb* WXY和*acb* FGH、胞外阿卡波糖激酶基因*acb* K以及胞内4- α -葡萄糖基转移酶基因*acb* Q^[11-14](图1)。

阿卡波糖的代谢途径最早在2002年由Zhang等^[15]提出,后由Rockser等^[16]于2009年更新。由于该途径的复杂性,研究者们通过基因

组学、代谢组学和同位素掺入等手段仅证明了双脱氧氨基葡萄糖的合成和 C₇-环醇合成的前 3 步反应, 对于 C₇-环醇合成的后续反应仅依据已公布的基因簇推测各基因编码的蛋白活性建立。直到 2022 年, Tsunoda 等^[17]用实验验证了 C₇-环醇合成路径的后续部分, 纠正并完善了阿卡波糖的代谢途径, 本文将介绍由 Tsunoda 等更新后的途径(表 1)。阿卡波糖代谢途径主要分为 4 个模块: C₇-环醇的合成、双脱氧氨基葡萄糖的合成、麦芽糖的整合进入和胞外阿卡波糖及其同系物的转运(Carbophore 循环)^[14]。

1.1 C₇-环醇的合成

C₇-环醇模块的起始化合物为 2-*epi*-5-*epi*-valiolone (EEV), 该化合物由磷酸戊糖途径的一个中间化合物 *sedo*-heptulose-7-phosphate (SH7P) 经 Acb C 催化而来^[18]。接着, EEV 被 Acb M 磷酸化形成 2-*epi*-5-*epi*-valiolone-7-phosphate (EEV7P), 随后又被 Acb O 差向异构化生成 5-*epi*-valiolone-7-phosphate (EV7P), 该产物已得到质谱和核磁共振验证^[19]。EV7P 在环脱水酶 Acb L 的作用下脱水形成 Valienone-7-phosphate [V7P(1)], 再经 NADPH-依赖的氧化还原酶 Acb N 催化生成 Valienol-7-phosphate [V7P(2)], 后经磷酸激酶 Acb U 转化为 Valienol-1,7-diphosphate (V1,7PP), 再由 *acb J* 编码的磷酸酶脱磷酸化生成 Valienol-1-phosphate (V1P), 最后在 Acb R 的作用下将其核苷酸化生成 NDP-valienol (NDP-V)^[17]。

1.2 双脱氧氨基葡萄糖的合成

脱氧氨基葡萄糖合成模块的起始化合物为

D-glucose-1-phosphate (G1P), 首先, 在 Acb A 的催化作用下 G1P 被核苷酸化为 dTDP-D-glucose (dTDP-G)。随后, 在 Acb B 的催化下脱水生成 dTDP-4-*keto*-6-deoxy-D-glucose (dTDP-4k6dG), 最终在氨基转移酶 Acb V 的介导下, dTDP-4k6dG 转化为 dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-glucose (dTDP-4a6dG), 即双脱氧氨基葡萄糖。

1.3 麦芽糖的整合进入

dTDP-4a6dG 首先在假糖基转移酶 Acb I 的催化下与细胞内的麦芽糖结合形成复合物 O-4-amino-(4,6-dideoxy- α -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose (4-aminoDGG), 随后在 Acb S 催化下与来自 C₇-环醇模块的 NDP-V 结合生成阿卡波糖。

1.4 Carbophore 循环

Carbophore 循环模块的途径主要包括: 胞外淀粉由淀粉水解酶 Acb E 和 Acb Z 催化形成不同聚合度的寡糖, 再经阿卡维基转移酶 Acb D 的转糖基作用与阿卡维基(主要来自阿卡波糖)连接形成阿卡波糖同系物, 而后借助转运蛋白复合体 Acb FGH 转至胞内, 由 Acb K 催化 C₇位磷酸化, 再由 4- α -葡萄糖糖基转移酶 Acb Q 催化脱去所结合的糖基生成阿卡波糖-7-磷酸, 最后通过另一种转运蛋白复合体 Acb WXY 转运至胞外形成阿卡波糖, 从而完成 1 个循环, 该循环与胞内碳源的利用相关联^[30]。由于与胞外代谢相关的 3 个酶中仅有 Acb D 的功能得到了验证, Acb E 和 Acb Z 的功能尚未明晰, 因此“Carbophore 循环”尚处于假说阶段, 完整代谢途径见图 2。

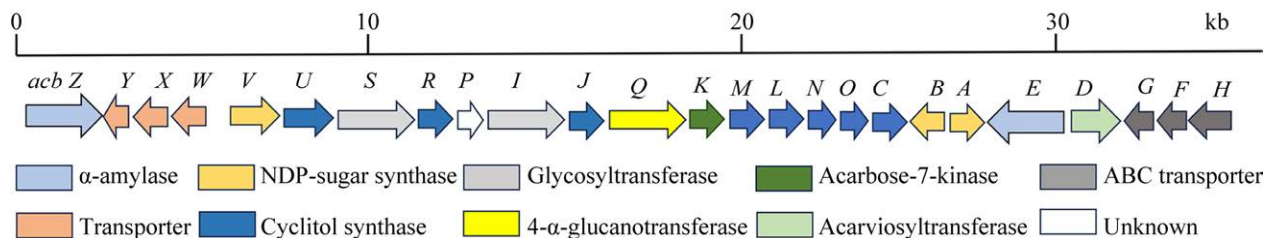


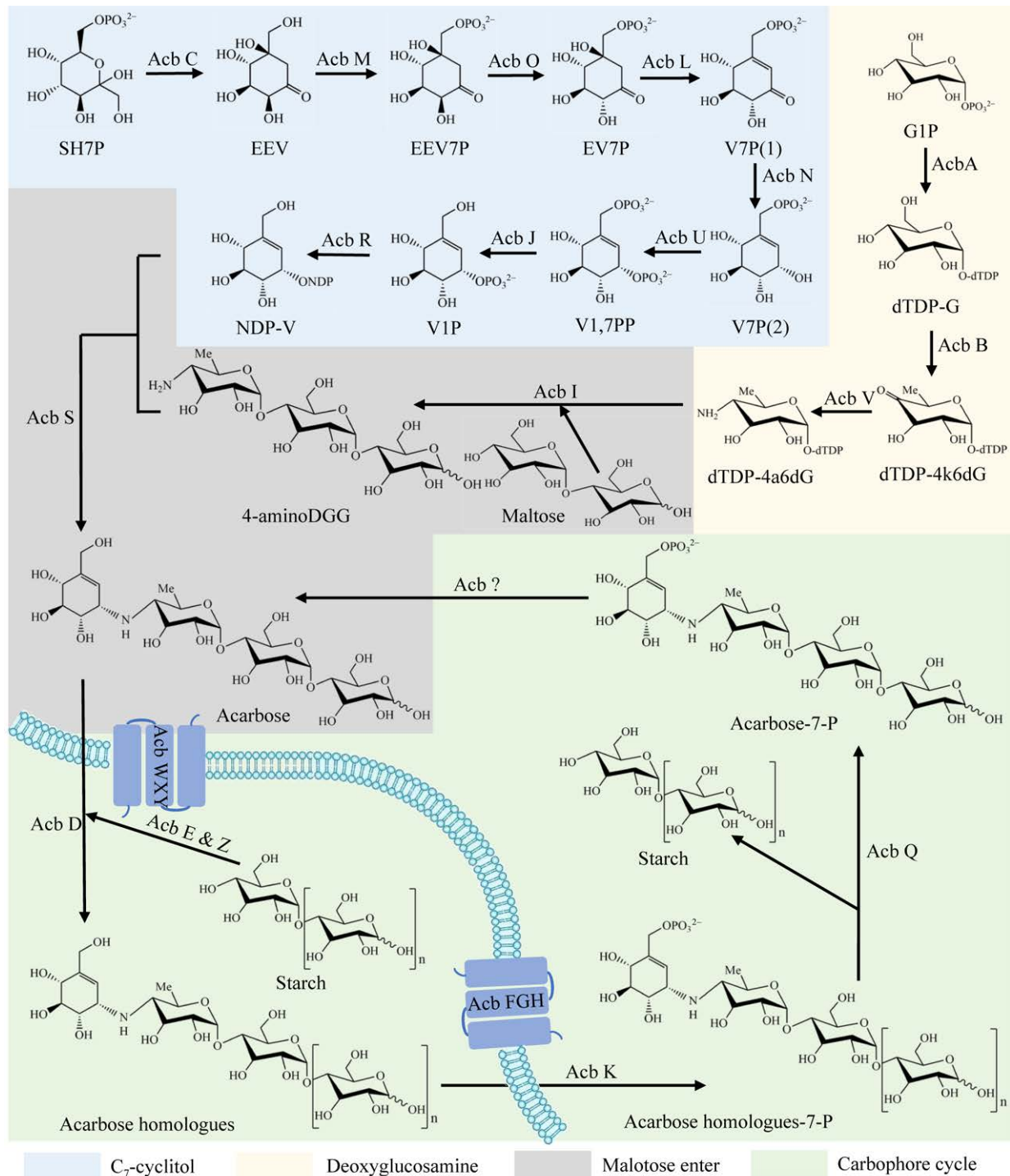
图 1 *Actinoplanes* sp. SE50/110 的 *acb* 基因簇及表达产物

Figure 1 *acb* gene cluster and the corresponding expression products of *Actinoplanes* sp. SE50/110.

表 1 研究阿卡波糖代谢途径的主要文献

Table 1 Main references studied on the biosynthetic pathways of acarbose

Biosynthetic module	Research content
C ₇ -cyclitol synthesis	<p>The process of conversion from precursor to C₇-cyclitol was studied by testing the reaction mechanism of various enzymes. During the process, an ATP-dependent phosphotransferase activity of 2-<i>epi</i>-5-<i>epi</i>-valiolone was identified, which was later verified by experiments to be derived from the protein Acb M. It is speculated that Acb M may catalyze the first step of acarbose synthesis pathway, and the functions of Acb O and Acb K are preliminarily explored^[15]</p> <p>By cloning the DNA fragment containing the conserved gene of dTDP-D-glucose-4,6-dehydratase (<i>acb B</i>), two genes involved in acarbose synthesis, <i>acb A</i> and <i>acb C</i>, were identified, and their functions were subsequently identified by heterologous expression. Based on the analysis of 3-dehydroquinate synthase in eukaryotes, a possible five-step reaction mechanism for Acb C-catalyzed cyclization was proposed^[18]</p> <p>Acb M was found to act on 2-<i>epi</i>-5-<i>epi</i>-valiolone-7-phosphate by enzymatic reaction <i>in vitro</i>^[19]</p> <p>This paper summarized the physiology, genetics and enzymology of acarbose biosynthesis, and put forward a novel pathway and metabolic cycle called “carbonation group”, which provided new clues for the further development of acarbose biotechnology^[20]</p> <p>The researchers found that 1-<i>epi</i>-valienol and valienol did not directly participate in the biosynthesis of acarbose, but played a diversion role, and the diversion products had an impact on the synthesis module of deoxyhexose. Strategies to minimize the flux of the diversion products and maximize the partial supply of aminodeoxyhexose can increase the yield of acarbose^[21]</p> <p>The researchers experimentally verified the reactions after the first three steps of the C₇-cyclitol synthesis pathway, correcting and perfecting the entire acarbose biosynthesis pathway^[17]</p>
Deoxyglucosamine synthesis	<p>In this paper, the biosynthetic pathways and mechanisms of several new deoxysugars in bacteria were summarized, aiming to provide reference for the synthesis mechanism of deoxysugar unit in acarbose^[22]</p> <p>The researchers explored the differences in the synthetic pathways of acarbose and validamycin A, laying the foundation for revealing the unique coupling mechanism of the two components of acarbose and validamycin A <i>via</i> nitrogen bridge^[23]</p> <p>Based on the comparative analysis of gene functions, <i>acb A</i>, <i>acb B</i>, and <i>acb V</i> were the genes involved in the synthesis of dideoxyglucosamine units. Then, the deletion and replacement of these three genes proved that they were all essential genes for acarbose biosynthesis, and the <i>in vitro</i> enzymatic reaction of Acb A, Acb B, and Acb V successfully revealed the synthesis pathway of dideoxyglucosamine^[24]</p>
Maltose integration	<p>In order to determine the origin of maltose units in acarbose, the resting cells of <i>Actinoplanes</i> sp. SN223/29 were fed with ³H- or ²H-labeled maltose or maltotriose, and maltotriose was found to be an effective precursor of acarbose and maltose^[6]</p> <p>On the basis of excluding the participation of dTDP-acarviosin-7-P in the biosynthesis of acarbose, the catalytic functions of Acb I and Acb S were explored, and the specific reaction steps of maltose integration were finally determined^[17,25]</p>
Carbophore cycle	<p>An ATP-dependent phosphotransferase, Acb K, was isolated from <i>Actinoplanes</i>. The function of Acb K was preliminarily identified by enzymatic reaction <i>in vitro</i>, and it was found to be related to phosphorylation of acarbose and its homologues^[26]</p> <p>An enzyme activity was found in the supernatant of acarbose fermentation broth, which was identified to be encoded by <i>acb D</i> gene. The functional difference between Acb D and CGTase was analyzed, and it was found to be related to the formation of acarbose and its homologues by radiolabel-based catalytic experiments^[27]</p> <p>The researchers constructed recombinant strains associated with <i>acb D</i>, <i>acb E</i> and <i>acb Z</i> by gene knockout and replacement, respectively, and found that deletion of the <i>acb D</i> gene had a negative effect on acarbose synthesis, while deletion of the <i>acb E</i> and <i>acb Z</i> genes did not affect the synthesis of acarbose^[28]</p> <p>In this study, the researchers analyzed the specific function of Acb Q by reacting with dextran of different polymerization degrees <i>in vitro</i>, and determined that Acb Q was related to the formation of acarbose homologues^[29]</p>



SH7P: *sedo*-heptulose-7-phosphate

EEV: 2-*epi*-5-*epi*-valiolone

EEV7P: 2-*epi*-5-*epi*-valiolone-7-phosphate

EV7P: 5-*epi*-valiolone-7-phosphate

dTDP-4k6dG: dTDP-4-*keto*-6-deoxy-D-glucose

4-aminoDGG: O-4-amino-(4,6-dideoxy- α -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose

V7P(1): Valienone-7-phosphate

V7P(2): Valienol-7-phosphate

V1,7PP: Valienol-1,7-diphosphate

V1P: Valienol-1-phosphate

dTDP-4a6dG: dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-glucose

NDP-V: NDP-valienol

G1P: D-glucose-1-phosphate

dTDP-G: dTDP-D-glucose

Acarbose-7-P: Acarbose-7-phosphate

图 2 阿卡波糖生物代谢途径

Figure 2 The biosynthetic pathways of acarbose.

2 阿卡波糖生物代谢途径中的酶系

阿卡波糖的代谢途径错综复杂, 但归根结底仍是一系列存在级联关系的酶促反应过程的统合, 本文仅介绍功能获得鉴定的相关酶或蛋白质(表 2)。

2.1 C₇-环醇模块中的关键酶

2.1.1 2-*epi*-5-*epi*-valiolone 合成酶(Acb C)

1999 年, Stratmann 等^[18]以灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)中 dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶的编码基因 *str E* 为探针, 在 *Actinoplanes* sp. SE50/110 基因组中钓取出 *str E* 的同源基因 *acb*

B 和 *acb B* 两侧的基因 *acb C* 与 *acb A*, 随后用变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*) 66 对 *acb C* 异源表达, 通过酶促反应证实了酶 Acb C 的作用是催化 SH7P 产生 C₇-环醇前体物质 EEV。Acb C 属于脱氢奎宁酸合酶 DHQS 家族, 其与该家族中的 3-脱氢奎宁酸合酶(AroB)在氨基酸序列上有很高的相似性; DHQS 参与莽草酸生物合成途径, 几乎存在于所有微生物和植物中^[31]。2019 年, Schaffert 等^[32]利用 PSET152 中的强启动子过表达了 *acb C*, 但过表达菌株的阿卡波糖合成量却略有减少, 推测可能的原因之一是存在催化中间体的负反馈抑制。

表 2 阿卡波糖代谢途径酶系

Table 2 Enzymes in the biosynthetic pathways of acarbose

Biosynthetic pathways of acarbose	Acb protein	Name or function
C ₇ -cyclitol synthesis	Acb C	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone synthase
	Acb M	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone-7-kinase
	Acb O	2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -valiolone-7-phosphate-2-epimerase
	Acb L	2- <i>epi</i> -valiolone-7-phosphate-1-reductase
	Acb N	Cyclitol oxidoreductase
	Acb U	Valienol-7-phosphate-1-kinase
	Acb J	HAD family hydrolase
	Acb R	Nucleoside transferase
	Deoxyglucosamine synthesis	Acb A
Acb B		dTDP-D-glucose-4,6-dehydratase
Acb V		dTDP-4-amino-4,6-dideoxy-D-glucose transaminase
Maltose integration	Acb I	Glycosyltransferase
	Acb S	Preglycosyltransferase
Carbophore cycle	Acb Z	α -amylase
	Acb E	Acarbose resistant α -amylase
	Acb Q	4- α -glucanotransferase
	Acb K	Acarbose-7-kinase
	Acb D	Acarviosyltransferase
	Transmembrane transport	Acb W
Acb X		ABC transporter permease
Acb Y		ABC transporter ATP-binding protein
Acb H		ABC transporter ATP-binding protein
Acb F		ABC transporter permease
Acb G		ABC transporter permease
Acb P		NUDIX hydrolase (putative)
Unknown	Acb P	NUDIX hydrolase (putative)

2.1.2 2-*epi*-5-*epi*-valiolone-7-激酶(Acb M)和差向异构酶(Acb O)

严格来说, Acb M 才是催化 C₇-环醇模块代谢途径的第 1 种酶。2002 年, Zhang 等^[15]通过对脱水、环化、磷酸化等酶反应机理的测试, 研究了从前体物质 EEV 经多步反应最终转化为 C₇-环醇的过程, 期间鉴定出一种 ATP 依赖的 EEV 磷酸转移酶活性, 后将基因 *acb M* 在 *Streptomyces lividans* TK64 中异源表达和纯化, 通过实验证明了该活性来源于表达产物 Acb M。Acb M 是己糖-6-激酶家族的成员, 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 Glck 以及其他微生物的葡萄糖激酶有很大相似性, 葡萄糖激酶几乎存在于所有微生物中, 与生物体内的糖代谢密切相关^[33]。近期有研究表明, 糖尿病患者体内葡萄糖激酶的活性很高, 葡萄糖激酶抑制剂的使用可能会为糖尿病的预防和控制提供新思路^[34]。2003 年, Zhang 等^[19]再次用 *Streptomyces lividans* TK64 异源表达基因 *acb M* 和 *acb O*, 其中 Acb O 的催化产物经质谱和核磁共振确定为 EV7P, 由此证实 Acb O 与 Acb M 在催化关系上直接偶联。值得一提的是, Acb O 的氨基酸序列与已知的蛋白无显著的相似性且不需要任何辅因子参与反应, 是一种新的只作用于碳水化合物及其衍生物的差向异构酶^[19,33]。

2.1.3 环醇脱氢酶(Acb L)和环醇氧化还原酶(Acb N)

Acb L 是一种 NADPH 依赖的环醇脱氢酶, 其氨基酸序列与 Zn²⁺依赖的环醇脱氢酶高度相似。之前普遍认为 Acb L 催化 EV7P 形成 5-*epi*-valiolol-7-P, 之后再依次由 Acb N、Acb U、Acb J 和 Acb R 介导的级联反应最终生成 NDP-1,1-*epi*-valienol-7-P, 从而合成 C₇-环醇^[15]。为验证该推测, Zhao 等^[21]通过代谢分析、化学

掺入和生化实验证实了 Acb L 和 Acb N 的催化功能; 首先, 他们以 EEV 为底物, 利用 Acb M 和 Acb O 依次催化获得了 EV7P, 接着在 NADPH 存在下加入纯化的 Acb L 进行反应, 产物经 HPLC-TOF/MS 验证为 V7P(1) 而不是 5-*epi*-valiolol-7-P, 由此证明 V7P(1) 是参与该代谢模块的一个中间产物。

Acb N 是短链脱氢酶家族中的一种依赖 NADPH 的氧化还原酶, 推测其功能是用于还原 V7P(1)。为验证这一假设, Zhao 等^[21]将 V7P(1) 和 NADPH 一起孵育, 反应产物由核磁共振验证为 V7P(2); 接着, 又将 Acb N、V7P(2) 和 NAD⁺ 共同孵育却未检测到产物, 这表明 Acb N 不催化该反应的逆反应。至此, C₇-环醇代谢模块中从 SH7P 到 V7P(2) 的 5 个步骤已通过实验证明。

2.1.4 Valienol-7-P-1-激酶(Acb U)

2020 年, Zhao 等^[21]发现 V7P(2) 是 C₇-环醇代谢模块中的一个中间体, 而 Acb U 被认为可能作用于 V7P(2)。2 年后, Tsunoda 等^[17]通过实验证明了 V1,7PP 参与阿卡波糖的生物合成, 该物质正是由激酶 Acb U 催化 V7P(2) 所生成, 但是在 ATP 存在的环境下将 Acb U 与 V1P 孵育却无任何产物的生成, 这表明 Acb U 只催化 1-OH 的磷酸化。此外, 在无底物的情况下, Acb U 也可以和 ATP 反应产生 ADP, 这说明 Acb U 是一种具有 ATPase 活性的双功能酶。

2.1.5 HAD 家族水解酶(Acb J)和核苷转移酶(Acb R)

Acb J 和 HAD 超家族的水解酶具有很高的序列相似性, Zhao 等^[21]采用同框缺失和回补的方法表征其功能, 发现 Acb J 能够将 V7P(2) 和 1-*epi*-valienol-7-P 去磷酸化生成 valienol 和 1-*epi*-valienol; 然而, 这 2 种化合物并不参与阿卡波糖的合成, 只起到分流作用。Tsunoda 等^[17]

为了验证 *Acb J* 是否能将 V1,7PP 去磷酸化, 将基因 *acb J* 导入 *Streptomyces lividans* TK24 中异源表达, 后续的催化实验证实了 *Acb J* 可以将 V1,7PP 去磷酸化生成 V1P, 同时发现 *Acb J* 只能使 C₇ 位磷酸基团去磷酸化, 因为该酶与 V1P 反应未检测出新生产物。

Acb R 与环醇核苷酸转移酶 *VldB* 有 63% 的一致性, 后者在有效霉素合成过程中负责将 V1P 转化为 GDP-valienol, 因此推测 *Acb R* 也是一种核苷转移酶^[20]。为验证 C₇-环醇合成模块的后续反应, Tsunoda 等^[17]将重组 *Acb R* 与 V1P 在 ATP、UTP、GTP、CTP 或 dTTP 存在下反应, 通过使用无机焦磷酸酶、嘌呤核苷磷酸化酶和 7-甲基-6-硫代鸟苷的偶联实验, 确定 *Acb R* 可以高效率地将 V1P 转化为 NDP-V, 且在 5 种核苷三磷酸中 GTP 是首选底物。虽然 *Acb R* 也可以将 1-*epi*-V1P、V1,7PP 和 1-*epi*-V1,7PP 转化为 NDP 衍生物, 但转化率显著低于 V1P 与 GTP, 表明 V1P 是 *Acb R* 最可能的底物。至此, C₇-环醇模块的代谢途径经实验完整验证。

2.2 双脱氧氨基葡萄糖模块中的关键酶 (*Acb A*、*Acb B* 和 *Acb V*)

结构多样性的脱氧糖存在于多种次级代谢产物中, 其合成途径一般都以 G1P 为前体, 经 D-葡萄糖-1-P-胸腺嘧啶转移酶和 dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶催化形成 dTDP-4k6dG, 最后再经转氨、异构化等修饰作用形成多样化的脱氧糖, 为各合成通路提供原料^[22]。Maumud 等^[23]首先发现阿卡波糖的脱氧己糖部分由葡萄糖产生, dTDP-4k6dG 是一个类似中间体。张丹等^[24,35]在比对分析基因功能的基础上推测 *acb A*、*acb B* 和 *acb V* 是参与双脱氧氨基葡萄糖单元合成的基因, 首先通过基因敲除和回补实验证实了这 3 个基因在阿卡波糖生物合成中不可或缺, 接着借助体外酶促反应实验成功揭示了 *Acb A*、*Acb B* 和

Acb V 在双脱氧氨基葡萄糖合成模块中的具体作用, 最后确定了 *Acb A* 的氨基酸序列与铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 *RmlA* 有 55.0% 的相似性, 属于葡萄糖-1-磷酸胸腺嘧啶转移酶家族, 催化 dTDP-4a6dG 合成的第 1 步反应, 需 Mg²⁺ 作为辅因子; *Acb B* 的氨基酸序列与 *P. aeruginosa* 的 *RmlB* 有 45.7% 的相似性, 是 dTDP-D-葡萄糖-4,6-脱水酶, 它的功能是使 dTDP-G 分子内脱水, 需要 NAD⁺ 作辅因子; *Acb V* 氨基酸序列与转氨酶的相似性较高, 是一种氨基转移酶, 功能是将谷氨酸的氨基转移到 dTDP-4k6dG 的 C₄ 位产生 dTDP-4a6dG。

2.3 麦芽糖的整合进入和 Carbophore 循环模块中的关键酶

2.3.1 糖基转移酶 (*Acb I*) 和假糖基转移酶 (*Acb S*)

最开始推测形成阿卡波糖的最后一步反应是由中间体 dTDP-acarviosin-7-P 或者 dTDP-acarviosin 和麦芽糖经 *Acb J*、*Acb I*、*Acb S* 和 *Acb Q* 中的一种酶催化形成, dTDP-acarviosin-7-P 和 dTDP-acarviosin 则被推测是 dTDP-4a6dG 分别与 GDP-valienol-7-P 和 GDP-V 偶联反应所生成, 该反应由一种与糖基转移酶 (Gts) 高度相似的假糖基转移酶 (PsGts) 介导^[20,25]; 由于已经证实 *Acb R* 能高效催化 V1P 生成 GDP-V, 因此排除 dTDP-acarviosin-7-P 参与阿卡波糖的合成。为了验证 dTDP-4a6dG 是否能偶联 GDP-V 产生 dTDP-acarviosin, 研究者们在大肠杆菌中异源表达了 *acb* 基因簇中可能为 GT 基因的 *acb I* 和 *acb S*, 但将重组 *Acb I* 和 *Acb S* 与 dTDP-4a6dG 和 GDP-V 一起孵育却无任何新生物, 这表明 dTDP-acarviosin 也不参与阿卡波糖的生物合成^[17]。为验证阿卡波糖合成路径的最后一部分, 根据早期研究者的推测, 4-aminoDGG 可能是由 dTDP-4a6dG 和麦芽糖或低聚麦芽糖通过转糖基

反应偶联形成, Tsunoda 等^[17]最终以实验证明了 Acb I 能够催化 dTDP-4a6dG 和麦芽糖反应生成复合物 4-aminoDGG, 但用低聚麦芽糖代替麦芽糖反应时却未产生任何新物质, 这表明 Acb I 具有严格的底物专一性。

Acb I 的功能明确之后, Acb S 被推测是最有可能参与阿卡波糖合成的最终步骤的酶。Tsunoda 等^[17]又将 4-aminoDGG 与 NDP-valienol 同 Acb S 一起孵育的产物经 ESI-MS/MS 检测, 确定产物为阿卡波糖。Acb S 属于淀粉合成酶 (GTs family 5), 虽与同为淀粉合成酶的 Acb I 有 42.5% 的一致性, 但二者的催化类型迥异, 前者催化非糖苷键的形成, 而后者催化糖苷键的形成。

2.3.2 阿卡波糖-7-激酶(Acb K)

1999 年, Drepper 等^[26]在 *Actinoplanes* sp. 中分离出一种 ATP 依赖的阿卡波糖磷酸转移酶, 即 Acb K。研究发现, 放线菌胞质中含有一种麦芽糖酶, 阿卡波糖会严重抑制麦芽糖酶的活性, 而 Acb K 的产物阿卡波糖-7-磷酸对该酶的抑制作用显著削弱, 这说明阿卡波糖-7-磷酸对菌体有一定保护作用。此外, 还推测 Acb K 与阿卡波糖合成过程中麦芽糖和低聚麦芽糖等碳源物质的利用相关。为进一步探究该酶的催化特性和生理功能, Zhang 等^[15]在 2002 年借助 *S. lividans* 菌株表达 Acb K, 发现其与磷酸转移酶的核糖激酶家族成员有较高相似性, 并且与 *acb M* 存在于同一个多顺反子; 底物特异性分析表明, Acb K 只作用于阿卡波糖及其同系物, 因此该酶被认为在 Carbophore 循环中起作用。2009 年, Rcocker 等^[16]发现 Acb K 与一个未知蛋白质的氨基酸序列有 57.9% 相似性, 该蛋白质的编码基因与链霉菌 (*Streptomyces* sp.) 基因组中 α -淀粉酶的编码基因相邻。

2.3.3 阿卡维基转移酶(Acb D)

Hemker 等^[27]在阿卡波糖发酵液的上清中发现了一种酶活性, 经鉴定该酶是由 *acb D* 基因编码; Acb D 属于 α -淀粉酶 glycoside hydrolases 13 超家族, 具有 α -糖苷酶的所有结构特征, 并与该家族中的环糊精糖基转移酶 (cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase) 有 46% 的一致性, 但 Acb D 却未表现出 CGTase 的功能; 基于放射性标记法的催化实验表明, Acb D 能以多种阿卡波糖及其同系物作为阿卡维基供体和多种糖类及衍生物作为糖基受体, 具体功能是将阿卡维基转移到糖基受体分子上形成阿卡波糖及其同系物。Leemhuis 等^[36]通过定点突变将 Acb D 保守序列中的第 140 位氨基酸突变为 His 或者去掉 CGTase 的 His140, 发现二者的催化活性可以部分互换。许贤恩^[37]从放线菌胞外提取物中分离纯化出 Acb D, 用其催化阿卡波糖和寡糖混合物确定了阿卡波糖同系物 4b (acarviosy-1,4-glucose-1,4-glucose-1,4-glucose) 的形成机制。张欣等^[28]构建 *acb D* 基因的缺失菌株, 导致阿卡波糖合成量下降 42%, 通过该菌株的基因回补, 其合成能力又恢复正常, 证明了 Acb D 在阿卡波糖的代谢过程中发挥着重要作用。薛正莲等^[38]在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 中实现了 Acb D 的可溶性表达, 研究了反应时间、温度和 pH 对重组 Acb D 催化反应的影响, 探索了 Acb D 在 21 种不同糖基供体下催化活性的差异, 为进一步明确 Acb D 在阿卡波糖代谢循环中的作用提供了参考。

2.3.4 4- α -葡萄糖基转移酶(Acb Q)

Acb Q 属于糖基水解酶家族, 是一种 4- α -葡聚糖转移酶, 与来自流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 的淀粉麦芽糖酶 MalQ 有最高相似性^[20]。MalQ 几乎参与所有生物体细胞内的麦芽糖和麦芽糊精的代谢, 其具体功能是

水解直链葡聚糖的 α -1,4-糖苷键, 并将从还原端释放的葡萄糖残基转移到 α -1,4-葡聚糖受体的非还原端^[39]。Tsunoda 等^[17]通过实验证明 *Acb Q* 不参与阿卡波糖的生物合成, 推测其可能与阿卡波糖的修饰相关。Nölting 等^[29]在 *E. coli* 中异源表达了 *acb Q* 并分析其功能, 发现葡萄糖聚合度不高于 7 的 α -1,4-葡聚糖均可作为 *Acb Q* 的底物, 其中麦芽三糖为首选底物, 但 *Acb Q* 不识别含有 α -1,1-和 α -1,2-糖苷的底物。不同的是, *MalQ* 只作用于主链长度不少于 2 个葡萄糖分子的糖苷且最佳底物为麦芽四糖^[40]。阿卡波糖是 *Acb Q* 葡聚糖转糖基反应的特异性受体, 但阿卡波糖不能作为单一底物, 其可在 *Acb Q* 存在的环境中接受不同长度的麦芽寡糖形成多种阿卡波糖同系物, 这点与 *Acb D* 的功能相似。在阿卡波糖合成过程中, *Acb Q* 与其他 *Acb* 蛋白相比具有最高的蛋白稳定性, 其稳定性受翻译后影响, 这表明该蛋白与阿卡波糖的代谢高度相关^[29]。进一步的实验证明, *Acb Q* 还可作用于磷酸化的阿卡波糖同系物, 因此推测 *Acb Q* 在细胞内的底物主要为阿卡波糖同系物-7-磷酸^[26,39]。

3 阿卡波糖生产菌株的分子改造

利用游动放线菌发酵生产阿卡波糖时所生成的阿卡波糖同系物(组分 A、B、C、D、4a、4b、4c 和假阿卡波糖等, 见表 3)^[41]将增加下游分离纯化工作的难度, 得益于 *Actinoplanes sp.* SE50/110 全基因组信息的注释与公布, 阿卡波糖发酵菌株的分子改造取得了很大的进展。近年来, 研究者们多通过对相关基因敲除^[13,21,42-44]、回补^[28,45]、过表达^[46]和基因整合^[47-49]来改造阿卡波糖的发酵菌株以提高阿卡波糖的产量和质量。

基因敲除方面, 2015 年, 余贞等^[42]首次报道了 *E. coli* ET2567 和游动放线菌之间的结合转

移体系, 采用同源重组技术对 *tre Y* 基因进行敲除, 成功使发酵液中杂质组分 C 的含量减少到敲除前的 10%。2016 年, Wolf 等^[43]基于 pKC1139 质粒构建, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 *Actinoplanes sp.* SE50/110 基因组中酪氨酸酶的编码基因 *MelC*, 使发酵液中黑色素的含量显著降低, 证明了 *MelC* 与发酵液中黑色素的形成相关。2019 年, Xie 等^[13]通过对比 *Actinoplanes sp.* SE50 与其衍生菌株 *Actinoplanes sp.* SE50/110 的 *acb* 基因转录水平, 将 *Actinoplanes sp.* SE50 基因组上发生突变的 8 个基因分别敲除验证, 发现 CWT_4325 基因的缺失可使阿卡波糖的产量提高 25%, 推测 CWT_4325 的敲除直接导致细胞内乙酰辅酶 A 和乙醇的累积, 进而导致了 C₇-环醇前体物质 7-磷酸-景天庚酮糖(SH7P)的含量增高。同年, 解慧欣等^[44]通过检测不同麦芽糖浓度下阿卡波糖合成相关基因的转录水平, 发现麦芽糖浓度的提高显著促进基因 *acb W* 的转录, 敲除 *acb W* 基因就不再产生阿卡波糖, 证明了 *acb W* 在阿卡波糖的合成中不可或缺; 分别将基因 *acb W* 和 *acb WXY* 过表达, 阿卡波糖合成量提高了 6.4%和 8%。2020 年, Zhao 等^[21]通过生物实验证明了发酵液中存在 2 种分流产物, 并认为分流产物的形成与磷酸水解酶有着很大关系。为减少分流产物的形成, 敲除水解酶基因 ACPL_8310 和 ACPL_2834, 并将 *acb J* 基因的启动子替换为弱启动子 *WVp* 和 *kasOp**, 同时最大限度增加氨基脱氧己糖部分的供应, 使阿卡波糖的合成量达到了 7.4 g/L。

基因回补方面, 2022 年, 张欣等^[28]分别构建基因 *acb E*、*acb Z* 和 *acb D* 的缺失菌株, 发现 *acb E* 和 *acb Z* 基因的缺失对阿卡波糖的合成量无影响, *acb D* 基因的缺失导致阿卡波糖的合成量下降 42%, 将 *acb D* 基因回补后, 菌株又可正常生产阿卡波糖, 证实了 *acb D* 在阿卡波糖生物

合成中的重要作用。同年, Li 等^[45]通过对 Tet R 家族转录调控因子的基因 *TetR1* 敲除和回补, 证实其可以促进 *acb B* 和 *acb D* 基因的表达, 对阿卡波糖的生物合成有正向作用。

过表达方面, 2017 年, Zhao 等^[46]调整了受体和供体细胞的数量及比例, 优化了孵育时间和培养基中 $MgCl_2$ 的浓度, 使用甲氧苄啶代替萘啶酮酸来抑制大肠杆菌的生长, 提高了种属间接转移的效率, 利用高效的基因操作方法将 *acb* 过表达使阿卡波糖的产量提升了 35%。

基因整合方面, 2023 年, 周健等^[47]基于酶标仪检测方法, 建立了与孔板发酵相结合的游动放线菌产阿卡波糖的高通量筛选模型, 并通过 CRISPR/Cas9 技术, 将假糖基转移酶基因 *acb S* 和酪氨酸酶基因 *melC* 整合, 使重组菌株的阿卡波糖合成量提高了 22%^[48]。薛正莲等^[49]通过比较转录组学分析挖掘得到了一种来源于游动放线菌的转录因子 *AcaR* (ACPL_RS31540), 其有调控阿卡波糖合成的能力; 基于此, 利用分子生物学手段将 *AcaR* 整合至 *Actinoplanes* sp. ZFAC 得到重组菌株 *Actinoplanes* sp. ZFAC/*AcaR*, 该重组菌株经发酵后可生产阿卡波糖 4.86 g/L, 相比于出发菌株, 重组菌株的阿卡波糖合成量提高了 20.8%。

表 3 阿卡波糖及其同系物

Table 3 Acarbose and its homologues

Name	Structure
Acarbose	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc
Homologue A	Ac-1,4-Glc-1,4-Fru
Homologue B	Ac-1,4-Glc-1,4-(1- <i>epi</i> -vlienol)
Homologue C	Ac-1,4-Glc-1,1-Glc
Homologue D	Ac-1,4-Glc-1,4-Man
Homologue 4a	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc-1,4-Fru
Homologue 4b	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc-1,4-Glc
Homologue 4c	Ac-1,4-Glc-1,4-Glc-1,1-Glc
Pseudoacarbose	Acarviosyl-1-4-(6-desoxy) Glc-1-4-Glc

Ac: Acarviosyl; Glc: Glucose; Fru: Fructose; Man: Mannose.

4 展望

阿卡波糖是一种主要由 *Actinoplanes* sp. 发酵获得的 α -糖苷酶抑制剂, 广泛用于 II 型糖尿病的治疗中。阿卡波糖的代谢路径庞大复杂, 且涉及多种 *Acb* 酶催化的级联反应体系, 随着基因组学、代谢组学和转录组学等技术的发展, 阿卡波糖代谢通路的基本框架正逐步明确, 相关酶系的研究和发酵菌株的改造也取得了一定的进展, 但以下 3 个方面还需推进研究。(1) 目前, *Acb P*、*Acb E* 和 *Acb Z* 在代谢途径中具体功能尚未被证实, 这使得 *Carbophore* 循环仍处于假说阶段, 因此通过实验证实上述酶的催化功能, 进一步完善阿卡波糖的代谢路径是未来研究的大方向。(2) 已鉴定的若干关键酶有必要深入研究, 如 *Acb D*、*Acb Q* 等与阿卡波糖及其同系物的合成密切相关, 明确其催化机制和催化特性可对阿卡波糖杂质组分的控制起重要作用。(3) 由于阿卡波糖的代谢路径是多个酶协作的复杂网络系统, 相关调控因子的功能也尤为重要, 但目前关于调控因子方面的研究较为薄弱。因此, 基于调控因子的研究, 以提高阿卡波糖产量与质量为目的持续性改造阿卡波糖发酵菌株将成为未来十分有效的手段。

参考文献

- [1] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, PINKEPANK M, OGURTSOVA K, DUNCAN BB, STEIN C, BASIT A, CHAN JCN, MBANYA JC, PAVKOV ME, RAMACHANDARAN A, WILD SH, JAMES S, HERMAN WH, ZHANG P, BOMMER C, KUO S, BOYKO EJ, MAGLIANO DJ. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2022, 183: 109119.
- [2] 李兰英, 孙曙光. 我国糖尿病健康教育模式的研究现状及展望[J]. *中国医学创新*, 2022, 19(17): 173-178.

LI LY, SUN SG. Research status and prospect of health

- education model of diabetes mellitus in China[J]. Medical Innovation of China, 2022, 19(17): 173-178 (in Chinese).
- [3] DEMIR S, NAWROTH PP, HERZIG S, ÜSTÜNEL BE. Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications[J]. Advanced Science, 2021, 8(18): e2100275.
- [4] CAMPBELL LK, WHITE JR, CAMPBELL RK. Acarbose: its role in the treatment of diabetes mellitus[J]. The Annals of Pharmacotherapy, 1996, 30(11): 1255-1262.
- [5] DALSGAARD NB, GASBJERG LS, HANSEN LS, HANSEN NL, STENSEN S, HARTMANN B, REHFELD JF, HOLST JJ, VILSBØLL T, KNOP FK. The role of GLP-1 in the postprandial effects of acarbose in type 2 diabetes[J]. European Journal of Endocrinology, 2021, 184(3): 383-394.
- [6] LEE S, SAUERBREI B, NIGGEMANN J, EGELKROUT E. Biosynthetic studies on the alpha-glucosidase inhibitor acarbose in *Actinoplanes* sp.: source of the maltose unit[J]. The Journal of Antibiotics, 1997, 50(11): 954-960.
- [7] WEHMEIER UF. The biosynthesis and metabolism of acarbose in *Actinoplanes* sp. SE50/110: a progress report[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2003, 21(4/5): 279-284.
- [8] SCHWIENIEK P, SZCZEPANOWSKI R, RÜCKERT C, STOYE J, PÜHLER A. Sequencing of high G+C microbial genomes using the ultrafast pyrosequencing technology[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 155(1): 68-77.
- [9] SCHWIENIEK P, SZCZEPANOWSKI R, RÜCKERT C, KALINOWSKI J, KLEIN A, SELBER K, WEHMEIER UF, STOYE J, PÜHLER A. The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 112.
- [10] WENDLER S, OTTO A, ORTSEIFEN V, BONN F, NESHAT A, SCHNEIKER-BEKEL S, WALTER F, WOLF T, ZEMKE T, WEHMEIER UF, HECKER M, KALINOWSKI J, BECHER D, PÜHLER A. Comprehensive proteome analysis of *Actinoplanes* sp. SE50/110 highlighting the location of proteins encoded by the acarbose and the pyochelin biosynthesis gene cluster[J]. Journal of Proteomics, 2015, 125: 1-16.
- [11] WENDLER S, HÜRTGEN D, KALINOWSKI J, KLEIN A, NIEHAUS K, SCHULTE F, SCHWIENIEK P, WEHLMANN H, WEHMEIER UF, PÜHLER A. The cytosolic and extracellular proteomes of *Actinoplanes* sp. SE50/110 led to the identification of gene products involved in acarbose metabolism[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167(2): 178-189.
- [12] 汪雪梅, 翁倩卉, 赵芹芹, 白林泉. 阿卡波糖生物合成调控蛋白的钓取与功能解析[J]. 微生物学报, 2021, 61(11): 3667-3685.
- WANG XM, WENG QH, ZHAO QQ, BAI LQ. Mining and function studies of regulators for acarbose biosynthesis in *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(11): 3667-3685 (in Chinese).
- [13] XIE HX, ZHAO QQ, ZHANG X, KANG QJ, BAI LQ. Comparative functional genomics of the acarbose producers reveals potential targets for metabolic engineering[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2019, 4(1): 49-56.
- [14] 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[J]. 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[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(2): 605-619 (in Chinese).
- [15] ZHANG CS, STRATMANN A, BLOCK O, BRÜCKNER R, PODESCHWA M, ALTENBACH HJ, WEHMEIER UF, PIEPERSBERG W. Biosynthesis of the C(7)-cyclitol moiety of acarbose in *Actinoplanes* species SE50/110. 7-O-phosphorylation of the initial cyclitol precursor leads to proposal of a new biosynthetic pathway[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(25): 22853-22862.
- [16] ROCKSER Y, WEHMEIER UF. The *gac*-gene cluster for the production of acarbose from *Streptomyces glaucescens* GLA.O-identification, isolation and characterization[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(1/2): 114-123.
- [17] TSUNODA T, SAMADI A, BURADE S, MAHMUD T. Complete biosynthetic pathway to the antidiabetic drug acarbose[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 3455.
- [18] STRATMANN A, MAHMUD T, LEE S, DISTLER J, FLOSS HG, PIEPERSBERG W. The AcbC protein from *Actinoplanes* species is a C7-cyclitol synthase related to 3-dehydroquinase synthases and is involved in the biosynthesis of the α -glucosidase inhibitor acarbose[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(16): 10889-10896.

- [19] ZHANG CS, PODESCHWA M, ALTENBACH HJ, PIEPERSBERG W, WEHMEIER UF. The acarbose-biosynthetic enzyme AcbO from *Actinoplanes* sp. SE 50/110 is a 2-*epi*-5-*epi*-valiolone-7-phosphate 2-epimerase[J]. *FEBS Letters*, 2003, 540(1/2/3): 47-52.
- [20] WEHMEIER UF, PIEPERSBERG W. Biotechnology and molecular biology of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(6): 613-625.
- [21] ZHAO QQ, LUO YC, ZHANG X, KANG QJ, ZHANG D, ZHANG LL, BAI LQ, DENG ZX. A severe leakage of intermediates to shunt products in acarbose biosynthesis[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1468.
- [22] LIU HW, THORSON JS. Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1994, 48: 223-256.
- [23] MAHMUD T, LEE S, FLOSS HG. The biosynthesis of acarbose and validamycin[J]. *Chemical Record*, 2001, 1(4): 300-310.
- [24] 张丹, 赵芹芹, 蒋明, 康前进, 白林泉. 游动放线菌 *Actinoplanes* sp. SE50/110 中阿卡波糖脱氧氨基糖单位的生物合成[J]. *微生物学报*, 2020, 60(1): 118-134. ZHANG D, ZHAO QQ, JIANG M, KANG QJ, BAI LQ. Biosynthetic pathway of deoxyaminosugar moiety in acarbose from *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(1): 118-134 (in Chinese).
- [25] TSUNODA T, ABUELIZZ HA, SAMADI A, WONG CP, AWAKAWA T, BRUMSTED CJ, ABE I, MAHMUD T. Catalytic mechanism of nonglycosidic C-N bond formation by the pseudoglycosyltransferase enzyme VldE[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(20): 13369-13382.
- [26] DREPPER A, PAPE H. Acarbose 7-phosphotransferase from *Actinoplanes* sp.: purification, properties, and possible physiological function[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1996, 49(7): 664-668.
- [27] HEMKER M, STRATMANN A, GOEKE K, SCHRÖDER W, LENZ J, PIEPERSBERG W, PAPE H. Identification, cloning, expression, and characterization of the extracellular acarbose-modifying glycosyltransferase, AcbD, from *Actinoplanes* sp. strain SE50[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(15): 4484-4492.
- [28] 张欣, 赵芹芹, 白林泉. 游动放线菌 *Actinoplanes* sp. SE50/110 阿卡波糖胞外代谢相关基因功能的初步研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(5): 1006-1016. ZHANG X, ZHAO QQ, BAI LQ. Functions of genes involved in extracellular acarbose metabolic pathway from *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2022, 41(5): 1006-1016 (in Chinese).
- [29] NÖLTING S, MÄRZ C, JACOB L, PERSICKE M, SCHNEIKER-BEKEL S, KALINOWSKI J. The 4- α -glucanotransferase AcbQ is involved in acarbose modification in *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(4): 848.
- [30] 冯志华, 王远山, 郑裕国. 阿卡波糖的生物合成途径研究进展[J]. *生物技术通报*, 2011(8): 60-67. FENG ZH, WANG YS, ZHENG YG. Progress in biosynthesis pathway of acarbose[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011(8): 60-67 (in Chinese).
- [31] CARPENTER EP, HAWKINS AR, FROST JW, BROWN KA. Structure of dehydroquinase synthase reveals an active site capable of multistep catalysis[J]. *Nature*, 1998, 394(6690): 299-302.
- [32] SCHAFFERT L, MÄRZ C, BURKHARDT L, DROSTE J, BRANDT D, BUSCHE T, ROSEN W, SCHNEIKER-BEKEL S, PERSICKE M, PÜHLER A, KALINOWSKI J. Evaluation of vector systems and promoters for overexpression of the acarbose biosynthesis gene *acbC* in *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 114.
- [33] ROMERO-RODRÍGUEZ A, RUIZ-VILLAFÁN B, ROCHA-MENDOZA D, MANZO-RUIZ M, SÁNCHEZ S. Biochemistry and regulatory functions of bacterial glucose kinases[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, 577: 1-10.
- [34] ASHCROFT FM, LLOYD M, HAYTHORNE EA. Glucokinase activity in diabetes: too much of a good thing?[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2023, 34(2): 119-130.
- [35] 张丹. 解析阿卡波糖中 C₇-环醇和双脱氧糖模块的生物合成[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2019. ZHANG D. Analysis of biosynthesis of C₇-cyclol and dideoxysugar modules in acarbose[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2019 (in Chinese).
- [36] LEEMHUIS H, WEHMEIER UF, DIJKHUIZEN L. Single amino acid mutations interchange the reaction specificities of cyclodextrin glycosyltransferase and the acarbose-modifying enzyme *acarviosyl transferase*[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(41): 13204-13213.

- [37] 许贤恩. *Actinoplanes* sp. ZJB03852 阿卡波糖结构类似杂质组分形成酶学基础及其发酵控制研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2014.
XU XN. *Actinoplanes* sp. ZJB03852 enzymological basis of formation and fermentation control of structurally similar impurity components of acarbose[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2014 (in Chinese).
- [38] 薛正莲, 王雨晴, 李闯, 李丹丹, 朱司宝, 李翔飞. 阿卡维基转移酶的异源表达及转糖基作用[J/OL]. 食品科学, 2024. <https://link.cnki.net/urlid/11.2206.TS.20240821.1515.060>.
XUE ZL, WANG YQ, LI C, LI DD, ZHU SB, LI XF. Heterologous expression and transglycosylation of acarviosyltransferase[J/OL]. Food Science, 2024. <https://link.cnki.net/urlid/11.2206.TS.20240821.1515.060> (in Chinese).
- [39] NGUYEN DHD, PARK SH, TRAN PL, KIM JW, LE QT, BOOS W, PARK JT. Characterization of the transglycosylation reaction of 4- α -glucanotransferase (MalQ) and its role in glycogen breakdown in *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 29(3): 357-366.
- [40] KIM JE, TRAN PL, KO JM, KIM SR, KIM JH, PARK JT. Comparison of catalyzing properties of bacterial 4- α -glucanotransferases focusing on their cyclizing activity[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 31(1): 43-50.
- [41] LEISTNER A, HOLZGRABE U. Alternative methods to assess the impurity profile of a monographed API using acarbose as an example[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2022, 221: 115063.
- [42] 余贞, 李美红, 李娜, 郑玲辉, 黄隽. 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[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1301-1306.
YU Z, LI MH, LI N, ZHENG LH, HUANG J. Effect of *treY* gene inactivation on reducing of acarbose component C in *Actinoplanes* 8-22[J]. Microbiology China, 2015, 42(7): 1301-1306 (in Chinese).
- [43] WOLF T, GREN T, THIEME E, WIBBERG D, ZEMKE T, PÜHLER A, KALINOWSKI J. Targeted genome editing in the rare actinomycete *Actinoplanes* sp. SE50/110 by using the CRISPR/Cas9 System[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 231: 122-128.
- [44] 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[J]. 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*[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(10): 4536-4544 (in Chinese).
- [45] LI ZX, YANG SB, ZHANG ZY, WU YJ, TANG JW, WANG LJ, CHEN SX. Enhancement of acarbose production by genetic engineering and fed-batch fermentation strategy in *Actinoplanes* sp. SIPI12-34[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 240.
- [46] ZHAO QQ, XIE HX, PENG Y, WANG XR, BAI LQ. Improving acarbose production and eliminating the by-product component C with an efficient genetic manipulation system of *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2017, 2(4): 302-309.
- [47] 周健, 李翔飞, 李闯, 刘坤, 赵世光, 薛正莲. 游动放线菌产阿卡波糖高通量筛选模型的建立及优化[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(20): 73-80.
ZHOU J, LI XF, LI C, LIU K, ZHAO SG, XUE ZL. Establishment and optimization of high-throughput screening model for acarbose production by *Actinoplanes* sp. SE50[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(20): 73-80 (in Chinese).
- [48] 周健. 阿卡波糖高产菌株选育及分子改造[D]. 芜湖: 安徽工程大学硕士学位论文, 2023.
ZHOU J. Breeding and molecular modification of acarbose high-yielding strains[D]. Wuhu: Master's Thesis of Anhui Polytechnic University, 2023 (in Chinese).
- [49] 薛正莲, 李翔飞, 韩如梦, 周健, 刘坤, 赵明, 刘艳, 刘瑞华, 秦艳飞, 李为全. 一种游动放线菌来源的转录因子 *AcaR*、基因、重组菌及其制备方法和应用: CN117843740A[P]. 2024-04-09.
XUE ZL, LI XF, HAN RM, LIU K, ZHAO M, LIU Y, LIU RH, QIN YF, LI WQ. The invention relates to transcription factor *AcaR*, gene, recombinant bacterium derived from swimming actinomycetes, preparation method and application thereof: CN117843740A[P]. 2024-04-09.