

一株产 α -葡萄糖苷酶抑制剂的牛类芽孢杆菌 BD3526韩 璠^{1,2}, 吴正钧², 刘振民², 赵 勇^{1*}¹上海海洋大学食品学院, 上海 201306; ²上海乳业生物工程技术研究中心, 乳业生物技术国家重点实验室, 光明乳业股份有限公司乳业研究院, 上海 200436

摘要:为拓宽 α -葡萄糖苷酶抑制剂的微生物来源, 筛选一株具有降糖效果的菌株。实验利用体外模型对西藏生牦牛乳来源的菌株进行初筛和复筛, 获得一株具有 α -葡萄糖苷酶高抑制活性的类芽孢杆菌 *Paenibacillus bovis* BD3526, 该菌株的降糖活性 (>60%) 显著高于其他分离菌株和常规乳酸菌。菌株产 α -GI 的遗传性状稳定有效, 中温、好氧发酵更有利于该菌株合成与积累活性物质。当在脱脂乳中发酵 12 h 后, 活菌总数达到峰值 1.75×10^9 CFU/mL, 6 h 后的发酵乳的糖苷酶抑制活性均处于高水平 (>80%), 不断递减的 IC_{50} 表明, α -GI 伴随着发酵程度的加深在进一步积累。

关键词:体外模型; 牛类芽孢杆菌; 筛选; α -葡萄糖苷酶抑制剂; 脱脂乳

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)9-1585-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.9.015

An α -glucosidase inhibitor-producing strain *Paenibacillus bovis* BD3526HAN Jin^{1,2}, WU Zheng-jun², LIU Zhen-min², ZHAO Yong^{1*}¹College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;²Shanghai Engineering Research Center of Dairy Biotechnology, State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Dairy Research Institute, Bright Dairy and Food Co. Ltd., Shanghai 200436, China

Abstract: This study was aimed to explore the microbial source of α -glucosidase inhibitor and to screen bacterial strains with hypoglycemic effect. A *Paenibacillus bovis* BD3526 with high inhibitory activity against α -glucosidase was isolated from raw yak milk collected in Tibet via primary and secondary screening by means of *in vitro* model. The supernatant of the fermented skim milk by the strain *P. bovis* BD3526 demonstrated a strong inhibitory activity to α -glucosidase (>60%) and was significantly higher than other tested bacterial isolates including some lactic acid bacteria. The ability of BD3526 to produce α -GI was genetically stable; furthermore, moderate cultivation temperature and aeration were beneficial for the strain BD3526 to accumulate the active components against α -glucosidase. The total viable counts reached a peak of 1.75×10^9 CFU/mL for 12 h fermentation and the α -glucosidase inhibitory of fermented milk 6 h after inoculated maintained a high level (>80%). However, constantly decreased IC_{50} value showed that α -GI was further accumulated with the deepening of fermentation degree.

Key words: *in vitro* model; *Paenibacillus bovis*; screening; α -glucosidase inhibitor; skimmed milk

糖尿病 (diabetes mellitus) 是一类由胰岛素分泌不足或外周组织对胰岛素不敏感引发的, 以高血糖为特征性指标的慢性代谢紊乱疾病, 其患者长期处于高血糖、高尿糖状态, 若不及时介入控制血糖水平, 可导致各种组织、脏器 (如眼、肾等) 功能障碍甚至衰竭, 严重时致残甚至危及患者生命, 因此, 糖尿病又被称为“万病之源”。

II 型糖尿病, 又称为非胰岛素依赖型糖尿病 (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM), 是临床上较多见的糖尿病类型 (占糖尿病患者总量的 85% 以上), 目前治疗 NIDDM 药物主要有磺脲类药物、双胍类药物、格列奈类药物、噻唑烷二酮类药物、DPP-IV 抑制剂以及 α -葡萄糖苷酶抑制剂 (α -glucosidase inhibitor, α -GI), 其中 α -GI 以其效果温和、副作用小等特点受到患者的青睐^[1]。据统计, 除米格列醇 (Miglitol) 有芽孢杆菌来源^[2] 外, 大部分临床上使用的 α -GI, 如阿卡波糖 (Acarbose)^[3]、伏格列波糖

收稿日期: 2019-03-13 接受日期: 2019-06-06

基金项目: 国家自然科学基金 (31571917)

* 通信作者 Tel: 86-21-61900354; E-mail: yzhao@shou.edu.cn

(Voglibose)^[4],均来自真菌类微生物(放线菌),由此可见,有关细菌类微生物发酵产 α -GI的开发利用仍然处于较低水平。

本文以体外模型为检测手段,从西藏生牦牛乳中筛选得到一株可发酵脱脂乳、产 α -GI的菌株,并将其与常规乳酸菌进行降糖活性比较,同时考察了产 α -GI的最适条件(好氧/厌氧,30/37℃)与遗传稳定性,最后对该菌株在脱脂乳中发酵及其产 α -GI特性进行了初步研究,旨在填补类芽孢杆菌产 α -GI相关领域的相对空白。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

用于筛选菌株的生牦牛乳取样自中国西藏当雄地区。

Paenibacillus bovis BD3526、*Leuconostoc mesenteroides* BD1710、*Leuconostoc citreum* BD1707、*Lactobacillus helveticus* BD3809(由光明乳业股份有限公司提供)、*Lactobacillus casei* ATCC 334、*Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103(购买自ATCC)、*Lactobacillus acidophilus* NCFM、*Lactobacillus bulgaricus* LB340、*Bifidobacterium animalis* BL-04(由丹尼斯克公司提供)、*Streptococcus thermophilus* ST-BODY-3(由科汉森公司提供)。

M17琼脂培养基、M17液体培养基、乳糖(OX-OID LTD.,英国)、脱脂乳粉(光明乳业股份有限公司,中国)、NaOH、Na₂CO₃、乳酸(国药集团化学试剂有限公司,上海)、 α -葡萄糖苷酶(E. C 3. 2. 1. 20)、pNPG(4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷)(Sigma公司,美国)、MRS培养基(merck公司,德国)、TPY培养基(海博生物科技有限公司,中国)。

HVE-50型高压灭菌锅 日本HIRAYAMA公司;SG-402TX型超净工作台 美国THE BAKER COMPANY公司;AVANTI J30I型高速冷冻离心机 美国BECKMAN COULTER公司;HZQ-F160型摇床 苏州培英实验设备有限公司;GNP-9270型隔水式恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司;PHS-25型pH计 美国奥立龙公司;XW-80A型漩涡混合仪 上海青浦沪西仪器厂;Spectra Max M5多功能酶标仪 美国Molecular Devices公司。

1.2 培养基的制备

分离培养基:取M17琼脂培养基4.8g溶解于100mL蒸馏水中,118℃灭菌15min,冷却备用。

种子培养基:取M17液体培养基3.7g,乳糖1

g溶解于100mL蒸馏水中,118℃灭菌15min,冷却备用。

发酵培养基:取脱脂乳粉10g溶解于90mL蒸馏水中,118℃灭菌15min,冷却备用。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株的分离与纯化

菌株的分离与纯化:采用逐级稀释法将西藏生牦牛乳稀释至原浓度的10⁻⁴,分别取原液以及各级稀释液0.1mL均匀涂布于分离培养基上,于37℃厌氧培养2天后,观察并用接种环挑出菌落形态(形状、大小、颜色等)有显著差异的菌株,再次划线于分离培养基上,置于37℃厌氧培养2天进行纯化。

1.3.2 发酵种子的制备

从平板上挑取一环已纯化菌株接种于10mL种子培养基中,于37℃静置培养12h后,10000rpm离心15min,取沉淀(菌饼),以相同体积的无菌蒸馏水反复洗涤三次后重悬,即得发酵用的种子。

1.3.3 α -葡萄糖苷酶抑制活性及IC₅₀的测定

α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定:在体外测定模型PNPG法^[5]的基础上加以改良,简言之:100 μ L待测样品与50 μ L α -葡萄糖苷酶(100mU/mL)混匀,37℃水浴15min,加入80 μ L pNPG(2mmol/L)混匀,再次37℃水浴15min,最后加入80 μ L Na₂CO₃(0.2mol/L)终止反应。该反应体系于4℃、10000rpm离心2min后,取200 μ L上清于96孔微孔板中,利用酶标仪测定OD₄₀₅。

为了规避脱脂乳/发酵乳对反应体系产生的影响,本研究采用脱脂乳上清作为阴性对照,具体制备方法如下:脱脂乳(10%,w/v)以乳酸调节至待测样品相同pH,10000rpm离心2min,取上清,1mol/L NaOH回调pH至6.80,10000rpm离心2min后取上清,即得阴性对照。取三次平行实验的平均OD₄₀₅值,代入以下公式计算 α -葡萄糖苷酶抑制活性:

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率} = \left[1 - \frac{OD_{\text{待测样品}} - OD_{\text{样品空白}}}{OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{阴性空白}}} \right] \times 100\%$$

式中:阴性对照组为脱脂乳上清。

阴性空白组为PBS替代阴性对照组中的 α -葡萄糖苷酶。

样品空白组为PBS替代待测样品组中的 α -葡萄糖苷酶。

IC₅₀的测定:将冻干粉末溶解于PBS(0.1mol/L,pH6.8)的缓冲液中,制得浓度为80、40、20、10、5

mg/mL 的待测样品组,测定各样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。以样品浓度为横坐标,抑制率为纵坐标作图,通过回归方程拟合并计算可得抑制 α -葡萄糖苷酶半数活性所需的样品浓度,即 IC_{50} 。

1.3.4 降糖菌株的初筛与复筛

初筛:分别挑取一环已纯化的菌株于 10 mL 发酵培养基中,经涡旋震荡后将菌体均匀分布于发酵体系中,37 °C 静置培养 24 h 得发酵乳。将发酵乳置于沸水浴中加热 5 min 灭活菌体,10 000 rpm 离心 15 min,取上清,以 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 6.8,再次 10 000 rpm 离心 15 min,取上清,检测其 α -葡萄糖苷酶抑制活性($n=3$)。

复筛:将发酵种子以 2% (v/v) 接种量接种于发酵培养基中,37 °C 静置培养 24 h 得发酵乳。参照初筛的方法由发酵乳制备获得上清,检测其 α -葡萄糖苷酶抑制活性($n=3$)。

1.3.5 不同乳酸菌制备的发酵乳对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

取不同菌株的冻干粉少量,分别划线于对应的培养基上 (BD1710、BD1707、BD3809、ATCC334、NCFM、LB340、LGG/MRS 培养基, BD3526、ST-BODY-3/M17 培养基, BL-04/TPY 培养基),37 °C 厌氧培养 2 天形成菌落,随后参照 1.3.4 初筛所述方法,测定不同乳酸菌制备的发酵乳对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。

1.3.6 菌株的鉴定

将菌株送至中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 进行生理生化与 16S rDNA 等菌株分型的相关测定。

1.3.7 发酵条件对 BD3526 产 α -GI 的影响

参照 1.3.4 初筛所述方法,在接种后,置于 30 °C 和 37 °C 条件下分别进行厌氧 (静置) 和好氧 (180 rpm 摇床振荡) 培养 24 h 得发酵乳,进而检测并比较两者的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

1.3.8 传代稳定性实验

将复筛获得的菌株以每周一次频率的传代 25 次,参照 1.3.4 初筛所述方法,以原代菌株为对照,检测第 5、10、15、20 和 25 代菌株所制备的发酵乳的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

1.3.9 BD3526 在脱脂乳中的发酵特性

将发酵种子以 2% (v/v) 接种量接种于发酵培养基中,30 °C、180 rpm 摇床振荡培养,于 0、3、6、9、12、24、36 h 取样,观察发酵过程中脱脂乳的颜色变

化,并测定不同菌株发酵上清的 pH、活菌数、糖苷酶抑制率及其冻干粉的半数抑制浓度 (IC_{50})。

1.3.10 数据统计分析

运用 Excel 2013 和 Origin Pro 2016 进行数据汇总、分析和作图。

2 结果与分析

2.1 降糖菌株的初筛与复筛

利用逐级稀释与涂布相结合的方法,在 M17 平板上共分离纯化获得 38 株菌株,将上述菌株分别接种于发酵培养基中 37 °C 静置培养 24 h 后发现,仅 16 株菌可代谢脱脂乳引起凝乳,进一步对这些菌株的发酵乳进行糖苷酶抑制活性的测定,部分筛选结果如图 1 所示。

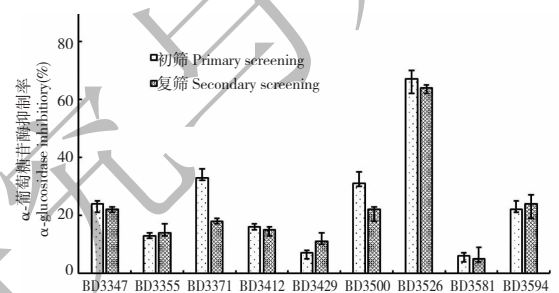


图 1 部分降糖菌株的初筛和复筛结果

Fig. 1 Partial results of primary and secondary screening for anti-diabetic strains

初筛和复筛结果显示,大部分受试菌株的发酵乳上清对 α -葡萄糖苷酶的抑制率较低 (<40%),而 BD3526 的抑制效果稳定维持在 60% (初筛 67%、复筛 64%) 以上,显著高于其他菌株,因此, BD3526 被选择作为潜在的降血糖菌株来进一步研究。

2.2 BD3526 与其他乳酸菌的比较

为了比较 BD3526 与其他酸奶发酵剂所制备的发酵乳对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,研究人员将 BD3526 及多种常规乳酸菌 (如 ST-BODY-3、LB340 等) 分别接种于发酵培养基中,37 °C 静置培养 24 h,所得发酵乳对 α -葡萄糖苷酶的抑制率如下图所示。

来自不同菌株的发酵乳对 α -葡萄糖苷酶的抑制率差异较大,其中大部分常规乳酸菌的糖苷酶抑制活力较低 (<20%),具体地,保加利亚乳杆菌 LB340、双歧杆菌 BL-04、嗜热链球菌 ST-BODY-3、嗜酸乳杆菌 NCFM、肠膜明串珠菌 BD1710、柠檬明串珠菌 BD1707 以及瑞士乳杆菌 BD3809 的抑制率分别为 13%、2%、11%、5%、6%、10% 和 14%,仅有少数几株菌具有一定的体外糖苷酶抑制活性,其中干

酪乳杆菌 ATCC334 与鼠李糖乳杆菌 LGG 发酵乳的抑制活力较强,为 22% 和 25%,而 BD3525 发酵乳的抑制效果最为佳,高达 66%,显著优于其他受试乳酸菌。

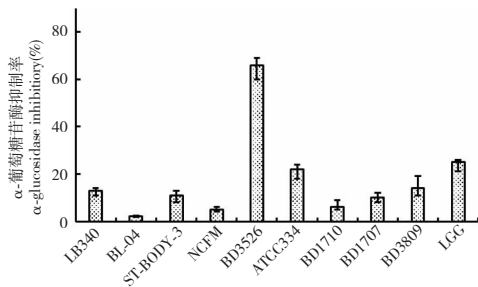


图 2 不同乳酸菌对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果

Fig. 2 Inhibitory effects of different lactic acid bacteria on α -glucosidase

BD3526 生理生化、16S rDNA 等分类数据及命名的依据,此前已有公开,结果显示,BD3526 为一株类芽孢杆菌新种,命名为 *Paenibacillus bovis* (牛类芽孢杆菌),并且该菌株成为该种的模式菌株^[6]。相较于其他产 α -GI 微生物(干酪乳杆菌与鼠李糖乳杆菌^[7])而言,有关类芽孢杆菌,尤其是牛类芽孢杆菌发酵脱脂乳、产 α -GI 的研究还未曾有过披露,因此,此类研究值得进一步深入开展。

2.3 产 α -葡萄糖苷酶抑制剂特性

2.3.1 发酵条件对 BD3526 产 α -GI 的影响

不同温度(30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C)与通氧(好氧、厌氧)组合条件下获得的 BD3526 发酵乳对 α -葡萄糖苷酶的抑制率及 IC_{50} 如图 3 所示。比较后发现,相同通氧条件下,30 $^{\circ}$ C 发酵乳的抑制活性高于 37 $^{\circ}$ C 发酵乳,并且前者的 IC_{50} 值低于后者,而在相同温度下,来自摇床培养的发乳的抑酶活性显著优于静置培养。由此可见,中温、好氧是 BD3526 代谢脱脂乳产 α -GI 的优选条件,该条件与类芽孢杆菌家族菌株(如多粘类芽孢杆菌等)的最适生长条件一致^[8],因此,根据糖苷酶抑制效果与菌体生长的正相关性推测,该抑制剂有可能是 BD3526 菌体生长过程中的代谢产物之一。

2.3.2 传代稳定性

某些微生物(如链霉菌^[9]、乳酸菌^[10]等)在传代过程中存在着遗传不稳定性现象,而这种现象往往会对微生物的诸多表型产生负面影响,尤其是那

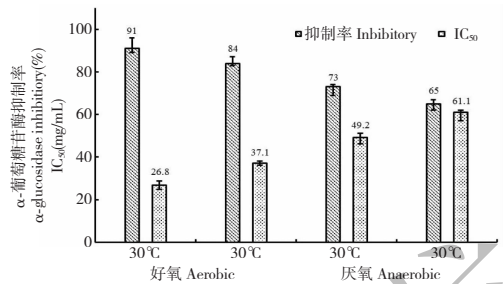


图 3 发酵条件对 BD3526 产 α -GI 的影响

Fig. 3 Effect of fermentation conditions on α -GI by BD3526

些具有潜在商业价值的菌株在发生退化后特定功能性物质的产量显得极不稳定,进而给科学研究和商业化应用带来很大烦恼。因此,本研究以原代作为对照,对第 5、10、15、20 和 25 代 BD3526 菌株发酵乳的糖苷酶抑制效果进行测定,旨在考察 BD3526 在 α -GI 产量方面的遗传稳定性,结果如图 4 所示。

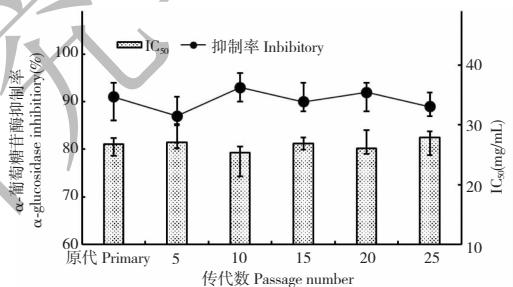


图 4 BD3526 产 α -GI 的遗传稳定性

Fig. 4 Genetic stability of BD3526 for α -GI production

不同传代次数所得的 BD3526 发酵乳的 α -葡萄糖苷酶抑制效果基本维持不变,无论抑制率(87%~93%)还是 IC_{50} (25.4~27.1 mg/mL),均与原代株(91%,26.8 mg/mL)保持在同一水平范围。由此可见,BD3526 连续传代 25 次后在产 α -GI 方面的遗传性状稳定有效。

2.4 BD3526 在 SKM 中的发酵特性

在发酵初期(0~6 h),BD3526 发酵乳呈典型的乳白色,随着培养时间的延长,发酵体系颜色逐渐加深,最终变成棕色。前期相关报道指出,BD3526 可产生一种高凝乳活性的金属蛋白酶^[11-14],上述变色现象的产生很可能是该蛋白酶水解乳蛋白后释放出的大量肽和氨基酸,与发酵体系中原有的乳糖等还原性糖,发生了美拉德反应^[15](又称“非酶棕色化反应”)所造成的。因此,发酵体系的颜色与乳蛋白的水解程度呈正相关性,颜色越深,则水解程度越高,反之亦然。

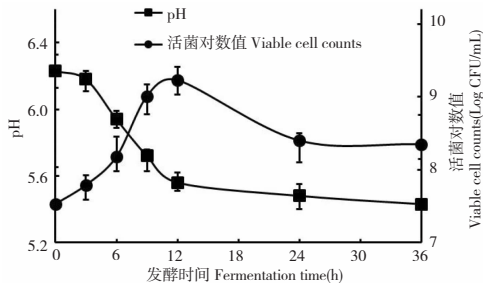


图5 BD3526在脱脂乳中生长时的pH和活菌数变化

Fig. 5 Variation of pH and viable counts of BD3526 grown in SKM

BD3526在脱脂乳中的活菌数与pH变化如图5所示,在发酵前期,BD3526在脱脂乳中的生长趋势与保加利亚乳杆菌等乳酸菌类似,呈典型的“S”型生长曲线,尤其在6~9 h时,菌体由于生境营养充足且活力旺盛的关系,导致增殖速率最快(活菌对数值8.18→9.01),直至12 h时达到活菌数峰值 1.75×10^9 CFU/mL,随着发酵时间的延长,活菌总数开始缓慢下滑至 2.5×10^8 CFU/mL(24 h),并一直保持至发酵终点(36 h),这是前期的高速代谢作用透支了发酵体系中的营养物质,并积累了某些不利于菌体生长的代谢产物的必然结果。

在pH变化方面,BD3526发酵体系的pH快速降低现象(pH6.23→5.56)主要出现在发酵前12 h,继续延长发酵时间至36 h并未发现有机酸的大量产生与进一步积累,其发酵终点pH为5.43。该现象的产生与常规乳酸菌完全不同,后者的发酵乳终点pH较低(5.0以下)主要得益于乳酸的大量积累,而BD3526发酵乳pH较高,除了少量乳酸的贡献外,菌株自身分泌的多种乳蛋白水解酶将酪蛋白水解成偏酸性的肽和氨基酸也可能是影响pH的重要因素之一。

图6为发酵过程中BD3526发酵乳的糖苷酶抑制率和 IC_{50} 变化。受到发酵前期活菌总量较低而引起代谢作用不足的影响,3 h发酵乳中抑制剂含量较低,其糖苷酶的抑制效果仅为8%(其 IC_{50} 不可测),延长发酵时间后发现,各取样点发酵乳(6、9、12、24、36 h)的糖苷酶抑制活性显著提高,分别为83%、91%、93%、92%、91%,各样品组的测定值处于高水平且无明显差异。但进一步分析显示各样品组的 IC_{50} 差别巨大,伴随发酵程度的加深,发酵乳 IC_{50} 不断递减,具体为:45 mg/mL(6 h)、40.4 mg/mL(9 h)、35 mg/mL(12 h)、26.8 mg/mL(24 h)和

22.4 mg/mL(36 h),意味着体系中 α -GI正逐步积累,这可能是发酵体系中BD3526菌体总量大、菌株活性高,转化效率高、积累速率快等多种作用的综合结果。

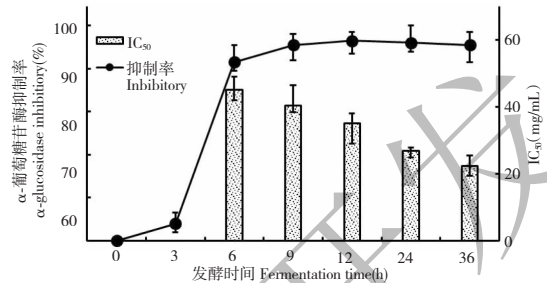


图6 BD3526在脱脂乳中生长时的糖苷酶抑制率和 IC_{50} 变化

Fig. 6 Variation of α -glucosidase inhibitory and IC_{50} of BD3526 grown in SKM

3 结论

有关 α -GI的研究最早可追溯至上世纪中期,据统计,已报道的降糖微生物中真菌类微生物占70%以上,如放线菌^[16]、霉菌^[17]等因研究起步早而分离线路成熟,活性物质明确,作用机制清晰。相比之下,细菌类微生物的相关研究尚处于的起步阶段(菌株筛选^[7]、技术路线的摸索^[18]等)。类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)细菌曾归于芽孢杆菌属(*Bacillus*)内,于1993年由Ash等利用PCR探针技术才将其独立为新属^[19],并确立多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)为其模式菌株,此类菌株兼性厌氧,嗜中温、中性pH生长,具有抗菌、固氮、土壤磷增溶、促微生物生长^[20]等多种生物活性,然而,有关类芽孢杆菌发酵脱脂乳产 α -GI的研究几乎没有,该领域的空白现状为本研究提供了契机。

本文以体外模型为检测手段,对西藏生牦牛乳来源的菌株进行初筛和复筛后发现,一株类芽孢杆菌新种*Paenibacillus bovis* BD3526具有代谢脱脂乳、产 α -GI的能力,该菌株发酵乳的糖苷酶抑制活性(>60%)显著高于其他牦牛乳分离菌株和常规乳酸菌,中温、好氧发酵有利于该菌株更好地合成与积累活性物质,30℃、180 rpm摇床振荡培养24 h的发酵乳对 α -葡萄糖苷酶的抑制率可达91%, IC_{50} 为26.8 mg/mL。传代25次的BD3526的降糖效果与原代保持同一水平,表明菌株产 α -GI的遗传性状稳定有效。当BD3526在脱脂乳中发酵时,发酵乳的颜色因受到美拉德反应的影响而由浅及深,12 h

发酵乳中活菌总数达到峰值 1.75×10^9 CFU/mL, 发酵终点 pH 为 5.43, 产酸能力显著低于乳酸菌, 6 h 后的发酵乳的糖苷酶抑制活性均处于高水平 (80% 以上), 但不断递减的 IC_{50} 表明, α -GI 伴随发酵程度的加深, 依然在进一步积累, 因此, 后期有必要对 BD3526 在发酵条件进行全面优化, 从而为后期的分离、纯化工作打下基础。

参考文献

- Han J, Ji H, Zhou FF, et al. Screening of lactic acid bacteria strains capable of biosynthesis α -glucosidase inhibitors [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25: 302-306.
- Schnack C, Rggla G, Luger A, et al. Effects of the α -glucosidase inhibitor 1 desoxynojirimycin (BAY M 1099) on post-prandial blood glucose, serum insulin and C-peptide levels in type II diabetic patients [J]. Eur J Clin Pharmacol, 1986, 30: 417-419.
- Kihara Y, Ogami Y, Tabaru A, et al. Safe and effective treatment of diabetes mellitus associated with chronic liver diseases with an alpha-glucosidase inhibitor, acarbose [J]. J Gastroenterol, 1997, 32: 777-782.
- Wada R, Koyama M, Mizukami H, et al. Effects of long-term treatment with alpha-glucosidase inhibitor on the peripheral nerve function and structure in Goto-Kakizaki rats; a genetic model for Type 2 diabetes [J]. Diabetes-Metab Res, 1999, 15: 332-337.
- Chapdelaine P, Tremblay RR, Dube J. P-Nitrophenol-alpha-D-glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen [J]. Clin Chem, 1978, 24: 208-211.
- Gao C, Han J, Liu Z, et al. *Paenibacillus bovis* sp. nov., isolated from raw yak (*Bos grunniens*) milk [J]. Int J Syst Evol Micr, 2016, 66: 1413-1418.
- Chen P, Zhang Q, Dang H, et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity [J]. Food Control, 2014, 35(1): 65-72.
- Grady EN, Macdonald J, Liu L, et al. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*; a review [J]. Microb Cell Fact, 2016, 15: 203-220.
- Chen W, Chen Z, Weng Y, et al. Overview and prospect on the genetic instability of *Streptomyces*-A review [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 2009, 49: 1271-1276.
- Zhang WY, Bai M, Zhang HP. Genetic stability of probiotic lactic acid bacteria-A review [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 2014, 54: 361-366.
- Hang F, Wang Q, Hong Q, et al. Purification and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase from *Paenibacillus* spp. BD3526 [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 85: 547-554.
- Hang F, Liu P, Wang Q, et al. High milk-clotting activity expressed by the newly isolated *Paenibacillus* spp. strain BD3526 [J]. Molecules, 2016, 21(1): 73-86.
- Hang F, Hong Q, Tao Y, et al. Study on milk-clotting enzyme produced by *Paenibacillus* spp. BD3526 in wheat bran broth [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2016, 42(2): 35-40.
- Hang F, Hong Q, Wang Q. Analysis of cleavage sites in bovine milk proteins by metalloproteinase (M4) from *Paenibacillus* spp. BD3526 [J]. J Dairy Sci Technol (乳业科学与技术), 2016, 39(5): 1-6.
- Fu L, Li TG. Reviews on maillard reaction [J]. Food Sci Technol (食品科技), 2006, 31(12): 9-11.
- Jasmine DJ, Agastina P. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* alpha glucosidase activity of endophytic *actinomycetes* isolated from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don [J]. J Pharmac Res, 2013, 6: 674-678.
- Liu Y, Xia G, Li H, et al. Vermistatin derivatives with α -glucosidase inhibitory activity from the mangrove endophytic fungus *Penicillium* sp. HN29-3B1 [J]. Planta Med, 2014, 80: 912-917.
- Han J, Ji H, Zhou FF, et al. Alpha-glucosidase inhibitors from fermented soybean milk and steamed soybean by *Lactobacillus plantarum* ST-III [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2014, 35: 100-104.
- Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test [J]. Anton Van Leeuwenhoek, 1993, 64: 253-260.
- Hong Q, Hang F, Wu ZJ. Growth promotion of *Lactobacillus plantarum* ST-III by the fermented supernatant of *Paenibacillus* spp. BD3526 [J]. J Dairy Sci Technol (乳业科学与技术), 2016, 39(6): 1-5.