

TÁCH CHIẾT, TINH SẠCH HOẠT CHẤT DNJ (1-Deoxynojirimycin) ỨC CHẾ α -GLUCOSIDASE TỪ CHỦNG *B. subtilis* VN9 PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM

Đỗ Thị Tuyên¹, Vũ Văn Hạnh¹, Vũ Thị Thu Hằng¹, Trịnh Đình Khả², Quyền Đình Thi^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Khoa Khoa học Sự sống, Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên

TÓM TẮT

Hợp chất DNJ (1-Deoxynojirimycin) là carbohydrats (đường) có tác dụng ức chế α -glucosidase (AG) bằng cơ chế cạnh tranh cơ chất carbohydrats (α -glucosidase trên bề mặt ruột) của enzyme. Enzyme α -glucosidase trên bề mặt ruột non thủy phân các oligosaccharide, trisaccharide và disaccharide tạo glucose và các monosaccharide. Việc ức chế enzyme này đã làm giảm sự thủy phân hợp chất carbohydrats, dẫn đến giảm lượng đường hấp thu, qua đó hạn chế quá trình tăng glucose huyết. Hoạt chất DNJ từ chủng *B. subtilis* VN9 đã được tinh sạch qua các bước tủa cồn, cô đặc, cột than hoạt tính và cột sephadex G75 kết hợp với sắc ký lỏng cao áp HPLC. Hiệu suất tinh sạch là 39,7%. Hoạt chất này ức chế 93% hoạt tính α -glucosidase, bền nhiệt và có Rf = 0,34 tương ứng với Rf của DNJ (Sigma) khi kiểm tra trên sắc ký bản mỏng với hệ dung môi isopropanol/ acetic acid: nước cất (4:1:1). Hoạt chất DNJ từ chủng *B. subtilis* VN9 được phân lập tại Việt Nam có thể được sử dụng làm nguyên liệu thuốc chữa bệnh đái tháo đường type 2.

Keyword: *B. subtilis* VN9, 1-Deoxynojirimycin, α -glucosidase, sephadex G75

MỞ ĐẦU

Bệnh đái tháo đường (ĐTĐ) được chia làm ba loại, trong đó ĐTĐ type 2 hay còn gọi là ĐTĐ không liên quan đến insulin, là dạng phổ biến nhất, chiếm khoảng 90% tổng số, thường có nguyên nhân liên quan tới chế độ sinh hoạt và lối sống. Bốn hướng giải pháp làm giảm lượng đường huyết cho các bệnh nhân mắc bệnh ĐTĐ type 2 là: tăng sản sinh insulin từ tuyến tụy, tăng khả năng sử dụng glucose, giảm tổng glucagon từ tế bào beta của tuyến tụy dẫn đến giảm quá trình phân giải glycogen thành glucose ở gan và cuối cùng là giảm quá trình phân giải các loại đường thành glucose ở ruột non. Trong đó hướng giải pháp cuối cùng, ức chế hình thành glucose từ ruột non mới được phát hiện và ứng dụng gần đây. Nó có những ưu điểm nổi bật so với các nhóm giải pháp còn lại và chất được sử dụng nhiều nhất cho hướng điều trị này là miglitol mà hoạt chất chính là 1-deoxynojirimycin.

Hợp chất 1-deoxynojirimycin (DNJ) là hydrocarbon, ức chế cạnh tranh, thuận nghịch của enzyme alpha-glucosidase trong ruột, do tác dụng của thuốc, glucose ở ruột sẽ được hấp thu chậm hơn, rải rộng ra nên tránh được hiện tượng tăng đường huyết sau khi ăn. Ngoài ra, DNJ còn có tác dụng kháng virus gây bệnh la chầy và virus gây bệnh viêm gan. Khi kết hợp với một muối, DNJ có khả năng cản trở quá trình sao chép bộ genome của virus HIV, do đó mở ra triển vọng trong việc phòng và điều trị virus HIV. DNJ được tổng hợp từ *B. subtilis* S10 và *S. subtilis*, chủng *Bacillus* (Frommer et al., 1978; Schmidt et al., 1979), từ chủng *Streptomyces* (Matusumuka et al., 1979) và *S. lavendulae* MB-733 (Ezure et al., 1985). DNJ có khả năng kìm hãm mạnh các enzyme oligo-saccharidase, disaccharidase (Schmidt et al., 1979), trehalase (Muraio và Miyata, 1980) ở ruột của động vật có vú. DNJ giống như một piperidine alkanoid có khả năng ức chế enzyme α -glucosidase, có hiệu quả chống lại sự tăng đường huyết. DNJ ngăn cản quá trình tảo tạt glucose tại thành ruột và gan từ đó giảm lượng glucose đi vào máu (Muraio và Miyata, 1980). Chất này được miêu tả như moranolin (1,5-dideoxy-1,5 imino glucitol), là tiền chất quan trọng để tổng hợp miglitol (Matusumuka et al., 1979)

Trên thị trường có nhiều loại thuốc có thành phần chính là acarbose như glucobay (Đức), precosa (Mỹ), glumeca (Việt Nam), miglitol (Đức) nhưng giá thành còn cao. Nguồn gốc của DNJ là được tách chiết từ thực vật (lá dâu tằm ...) và từ vi sinh vật: *Bacillus*, *S. Subutilis*, *Streptomyces* và *S. lavendulae*. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về chọn lọc và tối ưu môi trường nuôi cấy chủng vi sinh vật sinh DNJ. Ở Việt Nam vẫn chưa có công bố nào liên quan đến việc sản xuất DNJ từ các chủng vi sinh vật, hầu hết nguồn nguyên liệu sản xuất thuốc được nhập khẩu từ nước ngoài nên giá thành còn cao. Với mục tiêu tuyển chọn chủng *Bacillus* sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase (AG) dùng cho bệnh nhân đái tháo đường type II, trong một số nghiên cứu trước, chúng tôi đã tiến hành tuyển chọn các chủng *Bacillus* sp. sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase và tối ưu điều kiện tổng hợp chất ức chế α -glucosidase từ *Bacillus* dùng cho điều trị tiểu đường (Vũ Thị Thu Hằng et al., 2012). Trong bài báo này chúng tôi tiến hành tách chiết tinh sạch hoạt chất DNJ bằng các phương pháp sắc ký tạo hoạt chất tinh sạch nhằm định hướng tạo nguyên liệu thuốc an toàn không gây độc hại, không gây tác dụng phụ cho người sử dụng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu chủng vi sinh vật và môi trường nuôi cấy

Chủng *Bacillus* sp. được phân lập từ vỏ hoa quả, đất, sản phẩm lên men truyền thống và thu thập từ các phòng thí nghiệm trong và ngoài nước. Môi trường lên men (w/v): 1% tinh ngô bột; 0,5% soybean meal; 0,5% cao nấm men; 0,05% KH₂PO₄; 0,05% (NH₄)₂SO₄; pH 7,5 được dùng để nuôi cấy.

Hóa chất

Các hóa chất như: sodium chloride, D-glucose từ Merck (Đức), màng lọc Minisart (Biotech), agar (Việt Nam), cao nấm men, peptone được mua từ ICN (Mỹ). Các hóa chất sử dụng trong thí nghiệm đều ở dạng tinh khiết. Các dung môi ethanol, methanol... được mua từ Merck hoặc Trung Quốc. Một số nguyên liệu dùng thay thế nguồn carbon và nitơ như tinh bột khoai tây, bột đậu tương được mua ở ngoài thị trường.

Bột acetone ruột của chuột (Sigma I1630-10G) chứa α -glucosidase được pha trong đệm 100 mM potassium phosphate pH 6.8 với nồng độ 0,4% (w/v), lắc kỹ trong 5 phút. Sau đó ly tâm ở 10000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch nổi.

Phương pháp nuôi cấy và thu hồi chất ức chế

Chủng *B. subtilis* VN9 được nuôi cấy trong môi trường lỏng lên men bao gồm: (w/v) 1% tinh ngô bột; 0,5% soybean meal; 0,5% cao nấm men; 0,05% KH_2PO_4 ; 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; pH 7,5; thời gian lên men sau 4 ngày, lắc 200rpm, 37°C

Xác định hoạt tính ức chế AG

Dịch nuôi cấy của mỗi chủng *Bacillus* sp. được sử dụng để thử khả năng ức chế α -glucosidase lặp lại thí nghiệm 3 lần. Mỗi thí nghiệm gồm 3 ống thí nghiệm (TN), đối chứng âm (CÂ) và đối chứng dương (CD). Dịch nổi 10 μl được hút cho vào mỗi ống thí nghiệm và đối chứng âm; bổ sung 10 μl dung dịch α -glucosidase AG vào ống thí nghiệm và chứng dương; 80 μl đệm PPB vào ống thí nghiệm, 90 μl đệm PPB vào ống đối chứng âm và đối chứng dương, 100 μl cơ chất p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside vào cả 3 ống trên. Ủ hỗn hợp phản ứng ở 37°C. Sau khi ủ 30-60 phút, thêm 100 μl 200 mM Na_2CO_3 để kết thúc phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được đo ở bước sóng 415 nm trên máy Elisa reader (Biotek, ELX800, USA). Mức độ ức chế AG được tính theo công thức:
$$\text{ức chế (\%)} = \left[1 - \frac{A_{415(\text{TN})} - A_{415(\text{CÂ})}}{A_{415(\text{CD})}} \right] \times 100 \quad (1).$$
 Trong đó, A_{415}

(TN), $A_{415}(\text{CÂ})$, $A_{415}(\text{CD})$ là các giá trị OD đo tại bước sóng 415 nm của các ống thí nghiệm, đối chứng âm và đối chứng dương.

Sắc ký lớp mỏng

Sắc ký lớp mỏng là phương pháp nghiên cứu hiệu quả để phân tích và xác định số lượng các nhóm chất khác nhau có trong thành phần các phân đoạn tách ra từ đó. Dựa trên nguyên tắc các chất khác nhau có độ phân cực khác nhau nên được tách ra ở các vị trí khác nhau. Đây là phương pháp vi lượng, hiệu quả tách cao và thời gian thực hiện ngắn. Thu dịch lên men, ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ cặn, thu dịch trên, tiếp tục ly tâm tốc độ cao ở 12500 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ cặn, thu dịch trên. Dịch thu được tủa cồn 96° với tỷ lệ 1 thể tích dịch nuôi cấy: 4 thể tích cồn 96°. Sau 30 phút tủa cồn ly tâm 12500 vòng/phút trong 15 phút, loại tủa, thu hoạt chất DNJ và kiểm tra trên sắc ký lớp mỏng TLC.

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng silica gel Merck 60 F254, dày 0,25 mm, với hệ dung môi: 4 Isopropanol : 1 acid acetic: 1 H_2O . Bản TLC sau khi chạy xong được sấy khô dung môi sau đó hiện màu bằng thuốc thử ninhydrin.

Phân tách hợp chất ức chế AG

Dịch nổi (5 ml) lên cột sephadex G75 (24x0,6 cm), dùng nước cất để đẩy. Thu 25 phân đoạn, 1,5 ml/phân đoạn. Kiểm tra khả năng ức chế AG của các phân đoạn. Phân đoạn có hoạt tính ức chế α -glucosidase cao dùng kiểm tra trên bản TLC và sắc ký lỏng cao áp HPLC với hệ dung môi acetonitrile và H_2O để thu hoạt chất tinh sạch.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1. Hoạt tính ức chế AG của các chủng *Bacillus* sp. sau 30 phút ở 37°C.

Chủng	UC (%)	Chủng	UC (%)	Chủng	UC (%)	Chủng	UC (%)	Chủng	UC (%)
G1	90	G26	6	I20	78	G76	22	G102	65
G2	92	G27	5	G52	65	G77	23	G103	60
G3	24	G28	9	G53	26	G78	23	G104	64
G4	5	G29	52	G54	9	G79	14	G105	62
G5	92	G30	52	G55	11	G80	23	G106	64
G6	16	G31	9	G56	25	G81	12	G107	65
G7	75	G32	7	G57	56	G82	45	G108	62
G8	56	G33	9	G58	7	G83	26	G109	65
VN9	93	G34	6	G59	5	G84	34	G110	65
G10	66	G35	45	G60	1	G85	26	G111	58
G11	25	G36	56	G61	32	G86	23	G112	55
G12	68	G37	33	G62	22	G87	22	G113	63
G13-1	66	G38	50	G63	22	G88	8	G114	58
G13-2	69	G39	33	G64	57	G89	45	G115	67
G15	0	G40	49	G65	21	G90	22	G116	60
G16	89	G41	48	G66	2	G91	60	G117	64
G17	25	G42	47	G67	4	G92	62	G118	12
G18	12	G43	25	G68	50	G93	53	G119	61
G19	71	G44	32	G69	45	G94	56	G120	65
G20	3	G45	45	G70	18	G95	62	G121	62
G21	35	G46	12	G71	22	G96	65	G122	62
G22	24	G47	45	G72	22	G97	62	G123	65
G23	53	G48	23	G73	11	G98	64	G124	64
G24	0	G49	24	G74	34	G99	56	G125	58
G25	6	G50	63	G75	13	G100	66	G126	59
I23-1	70	I23-2	61			G101	65	G127	60

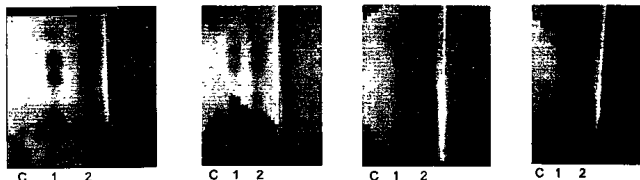
Chú thích: UC: ức chế.

Trong số 129 chủng *Bacillus* sp. tổng hợp chất ức chế AG, 14 chủng G1, G2, G5, G7, VN9, G10, G12, G13-1, G13-2, G16, G19, I23-1, I23-2 và I20 tổng hợp chất ức chế AG ngoại bào có hoạt tính 61-93% cao hơn so với các chủng

Bacillus sp. còn lại và được chọn lọc để nghiên cứu tiếp. Đặc biệt, dịch ngoại bào của chủng *Bacillus* sp. VN9 (phân lập ở Việt Nam) ức chế 93% hoạt tính AG (Bảng 1). Dịch sau lên men của chủng *B. subtilis* VN9 được sử dụng để tách chiết các hoạt chất từ cấp DNJ.

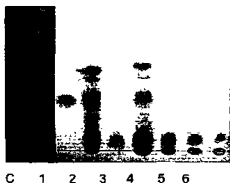
Lựa chọn dung môi

Chúng tôi cần lựa chọn hệ dung môi phù hợp để kiểm tra sản phẩm bằng sắc ký lớp mỏng từ dịch nuôi và dịch chiết thô cũng như hoạt chất tinh sạch được tách ra từ chủng *B. subtilis* VN9. Sử dụng các hệ dung môi khác nhau để khảo sát, với hệ dung môi dichloromethane : methanol : nước : acid acetic = 64:25:4:2,8 cho thấy dịch nuôi của chủng *B. subtilis* VN9 có xuất hiện băng ngang với chuẩn với Rf 0,18. Trong khi đó khi thay đổi hệ dung môi theo tỷ lệ dichloromethane : methanol : nước : acid acetic = 64:25:4:4 thì Rf 0,2 tuy nhiên vẫn ngang với chuẩn.

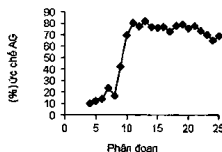


Hình 1. Sắc ký đồ TLC dịch chiết ngoại bào có chứa hoạt chất DNJ sinh tổng hợp từ chủng *B. subtilis* VN9 với các hệ dung môi khác nhau (C: DNJ chuẩn (5 ppm); 1-2: dịch chiết ngoại bào).

Theo tài liệu của Zhu và cộng sự (2010), hoạt chất DNJ được tinh sạch từ *B. subtilis* B2 được kiểm tra trên sắc ký TLC với hệ dung môi chloroform: methanol: 5,6% ammonium = 3:3:1. Tuy nhiên khi sử dụng các hệ dung môi trên chúng tôi thấy hệ số hoạt chất DNJ có trong dịch lên men đã có sự phân tách rõ ràng và xuất hiện ngang với chuẩn (Zhu et al., 2010)



Hình 2. Sắc ký đồ TLC của các mẫu có chứa hoạt chất DNJ được tách ra từ chủng *B. subtilis* VN9 (C: DNJ chuẩn; 1: Dịch đã loại bỏ tế bào; Giếng: 2, 3, 4, 5, 6 là phân đoạn 24; 19; 15; 13; 11 sau khi mẫu qua cột Sephadex G75) với hệ dung môi Isopropanol: acetic acid: nước (4:1:1; v/v).



Hình 3. Khả năng ức chế AG của các phân đoạn thu từ cột Sephadex G75 (B).

Sắc ký đồ TLC trên hệ dung môi isopropanol: acetic acid: nước (4:1:1) của các mẫu dịch lên men và dịch tinh sạch hoạt chất DNJ từ chủng *B. subtilis* VN9 (Hình 2). Các băng vạch xuất hiện ngang chuẩn. Đặc biệt hoạt chất tinh sạch đã xuất hiện một băng ngang chuẩn và có Rf 0,34, tương ứng với một số tài liệu trên thế giới đã công bố.

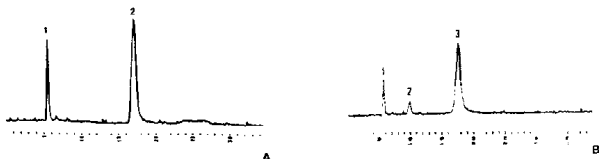
Tinh sạch hoạt chất DNJ

Để tinh sạch được hoạt chất DNJ từ dịch lên men từ *B. subtilis* VN9, dịch nổi sau lên men được ly tâm 12000 vòng/phút trong 15 phút và được rửa cặn ở 4°C trong 1 giờ với tỷ lệ 1: 4, nhằm loại bỏ các polysaccharide và protein. Dịch nổi sau cô đặc sẽ được hòa vào H₂O và đưa qua màng lọc có kích thước 0,45μm sau đó đưa qua hai cột có kích thước màng 100Da và 1000Da (MWCO). Dịch sau khi qua cột đưa lên cột than hoạt tính (kích thước cột: 24x0,6cm, tốc độ dòng chảy 1,5ml/phút) và sử dụng ethanol 5-30% để thu các phân đoạn có chứa DNJ. Các phân đoạn này được kiểm tra TLC và thử hoạt tính ức chế AG, những phân đoạn có hoạt tính ức chế AG cao sẽ được đưa lên cột sephadex G75 và sắc ký lỏng cao áp (HPLC) với hệ dung môi acetonitrile và H₂O để thu hoạt chất tinh sạch.

Các mẫu sau khi qua cột sephadex G75 được thử hoạt tính ức chế AG ở các phân đoạn tương đối sạch. Hoạt tính ức chế AG thể hiện rõ ở các phân đoạn từ phân đoạn 10 đến phân đoạn 25 (Hình 3).

Đặc biệt phân đoạn 11; 13; 15; 19; 21 thu được sau sắc ký Sephadex G75 cho hoạt tính ức chế tương ứng là 80,4; 81,8; 76,7; 79,5 và 78,1% cao hơn các phân đoạn khác (Hình 3). Các phân đoạn này được kiểm tra trên TLC (Hình 5) đều cho vạch có Rf 0,34 tương ứng với Rf của DNJ trên cùng hệ dung môi

Tập trung các phân đoạn có hoạt tính ức chế AG vào đưa lên cột HPLC với hệ dung môi acetonitrile và H₂O tỷ lệ 81: 19 (v/v) chứa 6,5mM ammonium acetate pH 5,5, tốc độ dòng chảy 1ml/phút. Hoạt chất DNJ chuẩn được hòa vào hỗn hợp acetonitrile và H₂O với tỷ lệ 50:50, có chứa 6,5mM ammonium acetate và 20µl mẫu được đưa lên hệ thống HPLC.



Hình 4. Phổ HPLC của hoạt chất DNJ sau khi tinh sạch được đo trên máy (A: DNJ chuẩn (Sigma); B: mẫu tinh sạch).



Hình 5. Sắc kí đồ TLC của các mẫu chứa hoạt chất DNJ được tách ra từ *B. subtilis* VN9 sau khi qua cột sephadex G75 (A); (C: DNJ chuẩn; 1: dịch đã qua cột sephadex G75; 2: dịch ngoại bào; 3: phân đoạn ở đỉnh 3 sau khi qua cột HPLC) với hệ dung môi isopropanol: acetic acid: nước (4:1:1; v/v).

Phổ HPLC cho thấy khi chạy so sánh với hoạt chất DNJ chuẩn, trên sắc ký đồ của mẫu ngoại trừ đỉnh 1 là đỉnh dung môi với thời gian lưu là 5,5 phút và đỉnh 2 nhỏ với thời gian lưu giữ của 10 phút, thời gian lưu của đỉnh 3 là đỉnh chính có thời gian lưu là 17,2 phút, đỉnh này tương tự với đỉnh 2 của mẫu chuẩn DNJ cũng có thời gian lưu là 17,2 phút.

Từ các số liệu thu được chúng tôi đưa ra bảng tinh hiệu suất DNJ sau khi qua các bước tinh sạch như sau:

Bảng 2. Tóm tắt quá trình tinh sạch hoạt chất ức chế DNJ

Các bước tinh sạch	Khối lượng (mg)	DNJ (mg)	Hiệu suất thu hồi (%)
Dịch nổi sau cô đặc (dạng cao)	1000	0,73	100
Cặn ethanol	500	0,61	83,5
Cột cô đặc	134	0,52	71,2
Than hoạt tính	70	0,41	56,1
Cột sephadex G75	1,5	0,34	46,5
Phân đoạn TLC	2,2	0,29	39,7

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy hiệu suất tinh sạch DNJ từ chủng *B. subtilis* VN9 đạt 39%. Điều này chứng tỏ có thể ứng dụng sản xuất hoạt chất DNJ bằng chủng *B. subtilis* VN9 được phân lập tại Việt Nam làm thuốc chữa bệnh đái tháo đường type 2. Tuy nhiên, chúng tôi cần nghiên cứu các điều kiện tối ưu cho lên men ở các quy mô 5 lít, 10 lít và 20 lít để nâng cao hàm lượng hoạt chất ức chế AG, định hướng ứng dụng làm nguyên liệu thuốc chữa bệnh đái tháo đường type 2.

KẾT LUẬN

Đã tinh sạch được hoạt chất DNJ (1-deoxynojirymycin) từ chủng *B. subtilis* VN9 ức chế mạnh α -glucosidase, bền nhiệt và có Rf 0,34 tương ứng với Rf của DNJ chuẩn (Sigma) khi kiểm tra trên sắc ký bản mỏng với hệ isopropanol: acetic acid: nước cất (4:1:1). Hoạt chất DNJ được tinh sạch qua các bước tủa cồn, cô đặc, cột than hoạt tính, cột sephadex G75 và kết hợp với phổ HPLC với hiệu suất tinh sạch đạt 39,7%. Điều này chứng tỏ có thể ứng dụng sản xuất hoạt chất DNJ bằng chủng *B. subtilis* VN9 được phân lập tại Việt Nam làm nguyên liệu thuốc chữa bệnh đái tháo đường type 2.

Lời cảm ơn

Công trình có sự hỗ trợ của kinh phí từ Đề tài cấp cơ sở "Phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật sinh tổng hợp chất ức chế α -glucosidase dùng trong điều trị bệnh đái tháo đường type II" Viện Công nghệ sinh học (VAST), giai đoạn 2011-2012.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ezure Y, Maruo S, Miyazaki K, Kawamata M (1985). Moranoline (1-Deoxynojirimycin) Fermentation and Its Improvement *Agric Biol Chem* 49:1119-1125
- Frommer W, Muller L, Schmidt DD, Puls W, Krausse HP, Heber U (1978). *Inhibitors for glycoside hydrolases from bacilli*. DOS 2658563 German Priority December, Bayer AG, Federal Republic of Germany
- Matusumuka S, Enomoto H, Aoyagi Y, Ezure Y, Yoshikuni Y, Yagi M (1979). *Moranolin and N-methyl moranolin*. DOS 2850467. Japan Priority. Nippon Shinyaka Co., Ltd., Japan
- Murao S, Miyata S (1980). Isolation and characterization of a new trehalase inhibitor. *S-Gl Agric Biol Chem* 44:219-221
- Schmidt D, Frommer W, Muller L, Truscheit E (1979). *Glucosidase-Inhibitoren aus Bazillen*. *Naturwissenschaften* 66 584-585
- Vũ Thị Thu Hằng, Vũ Văn Hạnh, Quyền Đình Thi (2012). Tối ưu điều kiện tổng hợp chất ức chế α -glucosidase từ *Bacillus* dùng cho điều trị tiểu đường. *Tạp chí y học Việt Nam* 2(396):149-153
- Zhu YP, Yamaki K, Yoshihashi T, Kameyama MO, Li XT, Cheng YQ, Mon Y, Li LT (2010). Purification and Identification of 1-Deoxynojirimycin (DNJ) in Okara Fermented by *Bacillus subtilis* B2 from Chinese Traditional Food (Meitaoza). *J Agric Food Chem* 58:4097-4103

PURIFICATION OF 1-Deoxynojirimycin -- AN α -GLUCOSIDASE INHIBITOR- FROM *Bacillus subtilis* VN9 ISOLATED IN VIETNAM

Do Thi Tuyen¹, Vu Van Hanh¹, Vu Thi Thu Hang¹, Trinh Dinh Kha², Quyen Dinh Thi^{1*}

¹ Institute of Biotechnology, VAST

² Department of Life Science, College of Sciences, Thai Nguyen University

SUMMARY

1-Deoxynojirimycin is carbohydrate (sugar)- α -glucosidase inhibitor (AGI)- by the competitive mechanism of carbohydrates (α -glucosidase on the intestinal surface). The α -glucosidase on the surface of the intestinal hydrolyzes of oligosaccharides, trisaccharides and disaccharides to produce glucose and the monosaccharides. The inhibition of this enzyme has reduced the hydrolysis of carbohydrate compounds, leading to reduced glucose uptake, there by limiting process hyperglycaemia 1-Deoxynojirimycin was purified from *B. subtilis* VN9 strain by four steps: ethanol precipitation; concentration by vacuum evaporator; charcoal column exchange; Sephadex G75 chromatography column in combination of high-pressure liquid chromatography (HPLC). Purification efficiency of process is 39.7%. Obtained DNJ inhibited 93% of α -glucosidase activity and was thermal stability. Thin layer chromatography (TLC) was used for checking of DNJ production and reached Rf value is 0.34 corresponding to the Rf value of DNJ (Sigma) examined with solvent system of isopropanol: acetic acid: distilled water (4:1:1). DNJ from strain *B. subtilis* VN9 isolated in Vietnam can be used as materials to treat diabetes type 2.

Keyword: *B. subtilis* VN9, 1-Deoxynojirimycin, α -glucosidase, sephadex G75

* Author for correspondence: Tel. 04 7568260; Fax: 04.8363144; E-mail: quyen@ibt.vast.vn