

右旋糖酐酶产生菌的筛选及其酶学性质的比较研究

孙晋武 程秀兰 严自正 朱梅芳 张树政

(中国科学院微生物研究所,北京)

从 3162 株真菌中筛出具有右旋糖酐酶活力的菌株 528 株,其中黄柄白曲霉 (*Asp. flavipes*)、蠕形青霉 (*Pen. vermiculatum*)、产黄青霉 (*Pen. chrysogenum*) 和构巢曲霉 (*Asp. nidulans*) 也产该酶,这在文献中尚未见报道。

通过复筛,从中选出 5 株,它们分属黄柄白曲霉 (*Asp. flavipes*, 二株)、肉色曲霉 (*Asp. carneus*)、焦曲霉 (*Asp. ustus*) 和淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*) (各一株)。对它们的产酶特性作了一系列比较研究,发现所有酶的最适温度皆为 50—55℃,最适作用 pH 为 5.0—5.5,酶解最终产物是异麦芽糖、异麦芽三糖及少量葡萄糖,故它们皆属内切型右旋糖酐酶。此外它们在温度和 pH 稳定性、其它酶活力存在的情况、对不同底物作用的情况、凝胶电泳模式、金属离子和一些蛋白质变性剂的影响等方面都有一些差异。通过比较发现,由淡紫拟青霉 8523 菌产生的右旋糖酐酶具有较好的酶学性质:它在 50℃ 保温 24 小时和 60℃ 保温 1 小时,剩余活力分别为 95% 和 90%,在 pH 3.5—10.5 很宽的范围内是稳定的,此外它对 SDS 和脲的耐受性也较其它菌株的酶好。

关键词 右旋糖酐酶;真菌;酶学性质

右旋糖酐酶 (Dextranase, α -D-1, 6-Glucan 6-D-Glucanohydrolase, EC 3.2.1.11) 是专一性地裂解右旋糖酐 (Dextran) 分子中的 α -1, 6-葡萄糖糖苷键的水解酶。由于它在龋齿防治方面具有一定功效^[1]、在制糖工业中能消除产生的“蔗饭”(即右旋糖酐,工厂俗称葡聚糖)、提高生产效率和产品质量^[2]、并能应用于临床用右旋糖酐的生产^[3]。近年来国外对该酶的研究日益广泛深入^[4-5]。丹麦 Novo 公司、美国 Miles 公司等都有商品右旋糖酐酶制品出售。在国内此项工作开展甚少,也无该酶制剂生产。

我们从分离纯化和收集到的 3162 株真菌中初步筛出具有右旋糖酐酶活力的菌株 528 株,从中选出活力较高而又略具特色的 46 株菌进行复筛,最终确定 5 株。经鉴定,它们分属黄柄白曲霉 (*Aspergillus flavipes*)、肉色曲霉 (*Asp. carneus*)、焦曲

霉 (*Asp. ustus*) 和淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilacinus*)。对它们的酶学性质等作了一些比较研究。本文报道取得的一些初步结果。

材料和方 法

(一) 菌种和土样

经鉴定过的纯菌 241 株由本所真菌室齐祖同先生及本所菌种保藏室提供。来自全国不同地区的土样 302 个由我组及本所其他同志采集。

(二) 化学试剂

右旋糖酐(分子量约 10 万,天津空军医院产品);右旋糖酐 Dextran T-2000 (瑞典 Pharmacia Fine Chemicals 产品);异麦芽糖、异麦芽三糖、海藻三糖、地衣多糖、昆布多糖、酵母抽提物及各种对(或邻)-硝基苯糖苷(美国 Sigma 公司产品);

本文于 1986 年 9 月 8 日收到。

本所齐祖同先生帮助鉴定菌种并提供部分菌株,化学所王维通等同志为我们制备的变聚糖 (mutan) 作了结构分析,在此表示衷心感谢。

Polypeptone (日本武田藥品工业株式会社生产); 变聚糖 (Mutan, 本实验室按 M. D. Hare 所述方法制备^[6]); 环状糊精, 茁霉多糖(日本林原公司产品); 对氯苯汞甲酸 (PCMB, 英国 light 公司产品)。

(三) 酶活力测定法

1. 右旋糖酐酶活力的测定: 将 4 ml 用 0.1 mol/L pH 5.2 醋酸缓冲液配制的 1.5% 右旋糖酐溶液置于 40°C 水浴中预热 5 分钟, 然后加入适当稀释的酶液 1 ml 开始反应, 准确计时, 10 分钟后加入 1 ml 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 10 分钟后加入 1 ml 2 mol/L NaOH 中和, 然后用 Somogyi-Nelson 法^[7]测定生成的还原糖。在上述条件下每分钟产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为一个酶活力单位。文中采用在固定条件下的光密度值 (OD_{510nm} 的读数) 表示。

2. 转化酶活力的测定: 按 R. L. Metznerberg 所述方法进行^[8], 只是略加修改。2 ml 反应液中含蔗糖 100 μmol, pH 5.2 醋酸钠缓冲液 20 μmol 和适当稀释的酶液, 在 40°C 准确反应 10 分钟, 以加入 1 ml 0.2 mol/L 高氯酸溶液终止反应。10 分钟后加入 1 ml 0.2 mol/L KOH 中和, 以加入煮死的酶液作空白对照。用 Somogyi-Nelson 法测定所生成的还原糖。在上述条件下每分钟产生 1 μmol 还原糖的酶量定义为一个酶活力单位。

3. 葡萄糖淀粉酶活力测定^[9]。

4. 一些糖苷酶的定性鉴定法按戈苏国等^[10]所述方法进行。

(四) 其它分析法

糖的纸层析按文献^[11]所述方法进行。异麦芽寡糖的制作是将右旋糖酐 Dextran T-2000 以 100 mg/ml 的浓度溶于 0.1 mol/L HCl 中, 密封, 置于沸水浴中酸水解 4 小时后, 用氮气吹走剩余的氯化氢而得。聚丙烯酰胺凝胶电泳按 Davis 法进行^[12]。

(五) 筛选方法

土样菌种的分离及右旋糖酐酶产生菌的筛选所采用的透明圈法基本上按文献^[13]所述进行。菌种分离和保藏斜面采用察氏培养基, 液体培养在 20 × 2.0 cm 大试管中进行。试管中放置 5 ml 液体培养基。培养基成份为 (%): 右旋糖酐(分子量为 10 万) 1, Polypeptone 0.5, 酵母抽提物 0.1,

K₂HPO₄ 0.4, MgSO₄ 0.02, KCl 0.02, FeSO₄ 0.001, pH 6.5。采用 220 r/min 摇床, 30°C 震荡培养 5—6 天后过滤, 滤液用于各种分析。

结果和讨论

(一) 右旋糖酐酶产生菌的筛选

1. 对经鉴定的 241 株纯菌进行筛选, 结果见表 1。在所筛的 241 株真菌中有 65

表 1 对 241 株已知菌筛选的结果

Table 1 Screening from 241 designated strains

菌名 Strain	筛选的菌株数 The number of screening strains	产酶的菌株数 The number of dextranase producing strains
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	66	12
日本曲霉 <i>Asp. japonicus</i>	12	3
文氏曲霉 <i>Asp. wentii</i>	12	0
肉色曲霉 <i>Asp. carneus</i>	6	4
黄柄白曲霉 <i>Asp. flavipes</i>	8	4
焦曲霉 <i>Asp. ustus</i>	12	7
构巢曲霉 <i>Asp. nidulans</i>	10	2
淡黄青霉 <i>Penicillium luteum</i>	3	1
蝶形青霉 <i>Pen. vermiculatum</i>	9	5
绳状青霉 <i>Pen. funiculosum</i>	9	1
产黄青霉 <i>Pen. chrysogenum</i>	26	3
疣孢青霉 <i>Pen. verruculosum</i>	2	1
棘孢青霉 <i>Pen. aculeatum</i>	1	0
淡紫拟青霉 <i>Paecilomyces lilacinus</i>	25	14
米根霉 <i>Rhizopus oryzae</i>	12	0
绿色木霉 <i>Trichoderma viride</i>	11	2
康宁木霉 <i>Trichoderma koningii</i>	2	0
串珠链孢霉 <i>Fusarium moniliforme</i>	15	6
共计 Sum	241	65

株产右旋糖酐酶,占 27%。说明右旋糖酐酶在真菌中存在较普遍。从产酶菌株的分布来看,大多已有报道^[4],但我们发现该酶在黄柄白曲霉 (*Asp. flavipes*)、蠕形青霉 (*Pen. vermiculatum*)、产黄青霉 (*Pen. chrysogenum*) 和构巢曲霉 (*Asp. nidulans*) 中也存在,而且有的活力相当高,这在文献中尚未见报道。

2. 对土样筛选的结果: 对不同地区和生态环境下采集的 302 个土样在右旋糖酐为唯一碳源的平皿培养基上分离到的 2921 株菌进行筛选,根据透明圈的有无,初步筛选出具有右旋糖酐酶活力的菌株 463 株,所占比例为 16%。合并上述筛选到的 65 株菌,共 528 株,进行大试管液体培养,测定发酵液的右旋糖酐酶活力,将其中活力较高或略有特色的 46 株菌挑出来进行复筛,最后确定 5 株作为进一步研究的对象。经鉴定它们是黄柄白曲霉 (2 株,菌号 8501 和 8514)、肉色曲霉 (菌号 8541)、焦曲霉 (菌号 8519) 和淡紫拟青霉 (菌号 8523) (各一株)。

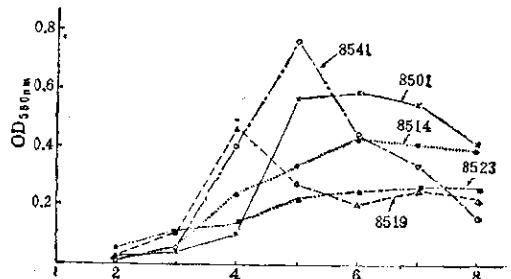
(二) 酶学性质的比较

对上述经复筛得到的 5 株菌进行大试管液体培养,然后进行一系列酶学性质的研究。

1. 产酶过程: 将经活化的 5 株菌从斜面上接入大试管进行液体培养,每株接 21 支,在 30℃ 培养二天后,每天取下三支,滤去菌体,测定滤液中右旋糖酐酶活力,取其平均值,制作酶活力(以 OD 值表示)与培养时间的关系曲线 (图 1)。图 2 是 8541 菌产酶过程中培养液 pH 值的变化及转化酶生成的情况,其他菌株情况类似。

由图可见,不同菌产酶情况不同,一般在培养 4—6 天产酶力达到最高峰,随后活力下降。在此过程中,培养液 pH 逐渐上升,到第 8 天 pH 可上升到 7.1—7.9。

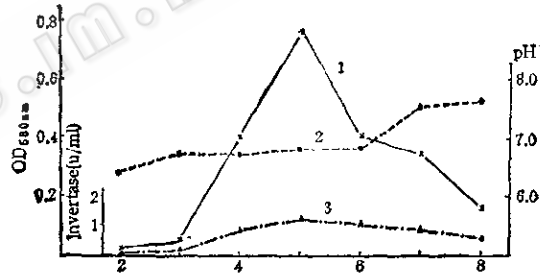
2. 酶的最适作用温度: 在不同温度下测定酶的活性,得到酶的最适反应温度皆



培养时间 Cultural time (d)

图 1 五株菌右旋糖酐酶的时间过程

Fig. 1 The time course of dextranase production by 5 strains



培养时间: Cultural time(d)

图 2 8541 菌产酶过程中,培养液 pH 变化及转化酶生成情况

Fig. 2 The time course of the culture pH and invertase activity during dextranase production by strain 8541

1. Dextranase activity; 2. pH; 3. Invertase activity

在 50—55℃ 左右。其中四株菌产生的酶超过 60℃ 时活力急剧下降,在 70℃ 时几乎无酶活存在,而 8523 菌的酶在超过 60℃ 后,酶活力逐步下降,在 65℃ 时酶活力仍有最高活力的 60%,但在 70℃ 时活力完全丧失。说明该菌所产生的酶,热稳定性

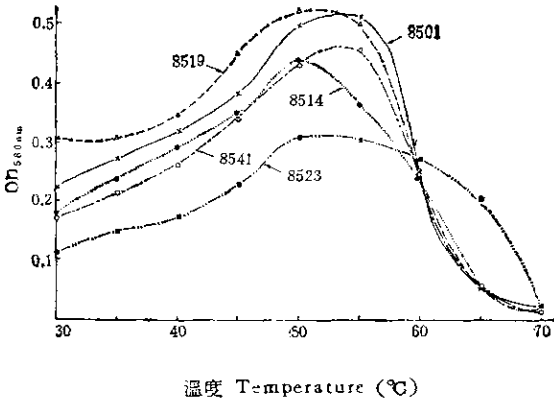


图3 温度与右旋糖酐酶活力的关系
Fig. 3 Temperature-dextranase activity relationship of 5 strains

较好(图3)。

3. 酶的温度稳定性: 将酶液(蛋白浓度约为 1 mg/ml)置于 40、50、60 和 70°C 不同温度下保温不同时间, 然后在标准条件下测定剩余活力, 以保温前的原酶液活

力为 100%, 计算其相对活力, 得到它们的温度稳定性曲线(图 4)。8519 菌的酶温度稳定性较差, 在 40°C 保温 4 小时活力残剩 30%, 50°C 保温 1 小时活力只剩 10%。而 8523 菌的温度稳定性较好, 在 50°C 保温 24 小时和 60°C 保温 1 小时, 剩余活力分别为 95% 和 90%, 但在 70°C 保温 10 分钟, 活力就丧失一半, 30 分钟活力全部丧失。这一结果与最适反应温度所表现的情况相符, 说明这是耐热性能较好的酶。

4. 酶的最适作用 pH: 在酶活力测定体系中加入不同 pH 的缓冲液(在 pH 3.0—8.5 采用柠檬酸缓冲液, 在 pH 7.0—11.0 采用 Tris-HCl 缓冲液), 使其最终浓度为 0.1 mol/L, 进行酶活力测定便可得到酶的作用 pH 曲线(图 5)。它们的最适作用 pH 皆在 5.0—5.5 之间, 这与文献报道的真菌的右旋糖酐酶的最适

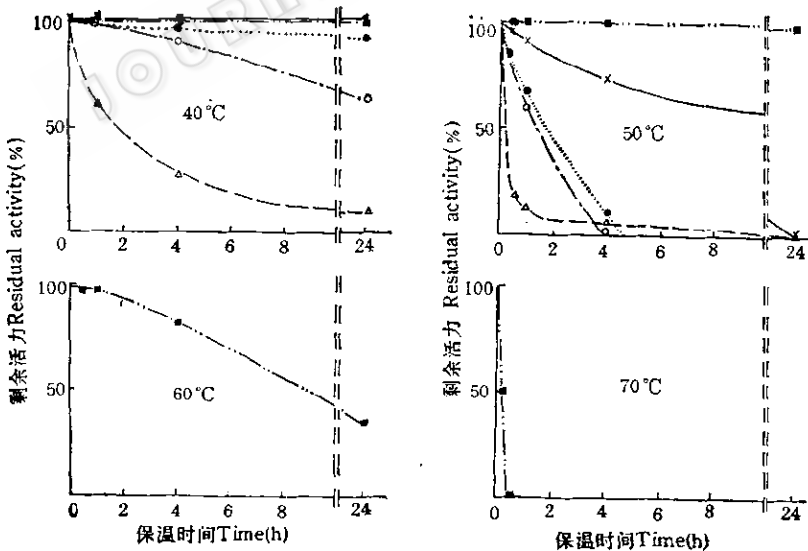


图4 酶的温度稳定性曲线

Fig. 4 Thermal stability of dextranases
Strain 8501 ×——×, Strain 8514 ●.....●, Strain 8519 △----△
Strain 8523 ■---■, Strain 8541 ○---○

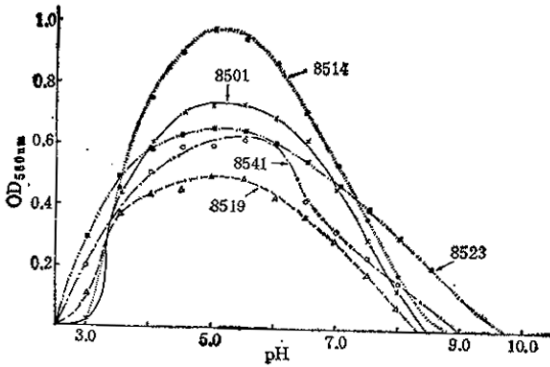


图5 pH 对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on dextranase activity

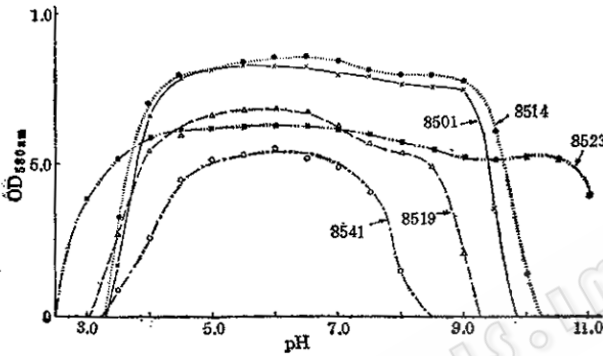


图6 酶的 pH 稳定性曲线

Fig. 6 pH stability of dextranases

pH 大多在酸性范围内是一致的^[4]。

5. 酶的 pH 稳定性：将酶液加到不同 pH 的缓冲液中，在 40℃ 保温 30 分钟后用醋酸缓冲液调到 pH 5.2，再测其活力（图 6）。如以剩余活力在 80% 以上为稳定，则 8541 菌只在 pH 4.5—7.5 范围内稳定，而 8523 菌则在 pH 3.5—10.5 很宽的范围内是稳定的。

6. 酶解产物分析：将酶液与用 0.1 mol/L pH 5.2 醋酸缓冲液配制的 5% 右旋糖酐底物在 40℃ 下保温不同时间，煮沸灭活后，用纸层析对酶作用产物进行分析。5 株菌所产酶的作用模式完全相同。图 7 示 8501 菌所产酶的结果。可见它们作用于右旋糖酐底物，先产生一些异麦芽寡糖，随着作用时间的延长，逐渐出现少量葡萄糖

斑点，而主要产物为异麦芽糖，另有一些异麦芽三糖和异麦芽寡糖存在，说明它们作用方式是内切型的。与 J. Pukumoto 等人报道的淡黄青霉 (*Pen. luteum*)^[14]和 L. Chalet 等人报道的绳状青霉 (*Pen. funiculosum*)^[15] 的情况类似。

7. 其它酶活力存在情况：(1) 转化酶活力：8501, 8514 和 8541 菌略具该酶活力，最高活力达 1—2 u/ml，而另二株菌无此酶活力。(2) 葡萄糖淀粉酶活性：所有 5 株菌都不具该酶活力。(3) 对 13 种糖苷酶的合成底物的作用进行定性分析结果列于表 2。这 5 株菌除 8523 菌外都具有 β -葡萄糖苷酶、 β -N-乙酰葡萄糖苷酶和 β -N-乙酰半乳糖苷酶的活力，而 8523 菌分泌的酶较纯，测不出这些糖苷酶的活力。(4) 培养液对不同天然底物的作用：按与右旋糖酐酶活力测定相同的方

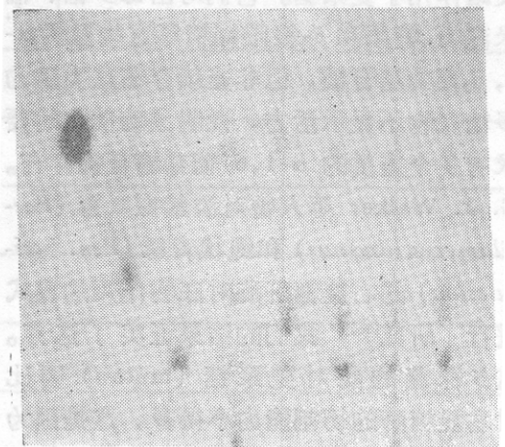


图7 8501 菌培养液作用于右旋糖酐的产物纸层析图谱

Fig. 7 Paper chromatogram of dextran hydrolyzate by strain 8501 broth
Abbr. Glu: glucose; IM₂: isomaltose; IM₃: isomaltotriose; T-2000: dextran T-2000

表 2 培养液对不同糖苷键的作用

Table 2 The action of broth to 13 substrates possessed different glycosidic bonds

菌株 Strain	底物 Substrate												
	α -gal	β -gal	α -glc	β -glc	α -man	β -man	α -xyl	β -xyl	α -L-fuc	D- β -fuc	α -NAC-gal	β -NAC-gal	β -NAC-glc
8501	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++	++
8514	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++	+
8519	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	++
8523	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8541	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++	++

Notes: 1 “-”: no reaction; “+”: reactant was light yellow; “++”: reactant was yellow.

2. Abbr.: α/β -gal: p-nitrophenyl- α/β -D-galactoside;
 α/β -glc: p-nitrophenyl- α/β -D-glucoside;
 α/β -man: p-nitrophenyl- α/β -D-mannoside;
 α/β -xyl: p-nitrophenyl- α/β -D-xyloside;
 α/β -L/D-fuc: p-nitrophenyl- α/β -L/D-fucoside;
 α/β -NAC-gal: p-nitrophenyl-N-acetyl- α/β -D-galactosaminide;
 β -NAC-glc: p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide

法,配制不同的底物,并进行活力测定。试验了该 5 株菌的培养液对 19 种葡萄糖基以不同键构成的寡糖和多糖底物的作用,结果列于表 3。所有 5 株菌的酶皆能专一地作用于右旋糖酐的 α -1,6 葡萄糖苷键及略作用于变聚糖。它们对茁霉多糖、糯米淀粉、糖原和 β -极限糊精等这些虽具 α -1,6 葡萄糖苷键,但非连续存在这类键的多糖底物不显示活力,说明该酶催化时要求有多个连贯的 α -1,6 葡萄糖苷键存在。G. J. Walker 等人曾对淡紫拟青霉 (*Penicillium lilacinus*) 和绳状青霉 (*Pen. funiculosum*) 的右旋糖酐酶对底物作用的模式进行了研究^[16],我们的结果证实了这点。这 5 株菌的酶对变聚糖 (mutan) 要比对右旋糖酐的切割能力小得多,这是因为前者约由 53% α -1,3 和 21% α -1,6-葡萄糖苷键组成 (由中国科学院化学研究所王维通等同志测定),且为水不溶性的,而后者 α -1,6 葡萄糖苷键约占 95% 以上,水溶性能很好。所有 5 株菌的酶系对由半乳糖 α -1,6-葡萄糖构成的密二糖皆不作用,

而 8501, 8514 和 8541 菌的酶却能作用于棉子糖和蔗糖,另二株菌对此二底物不作

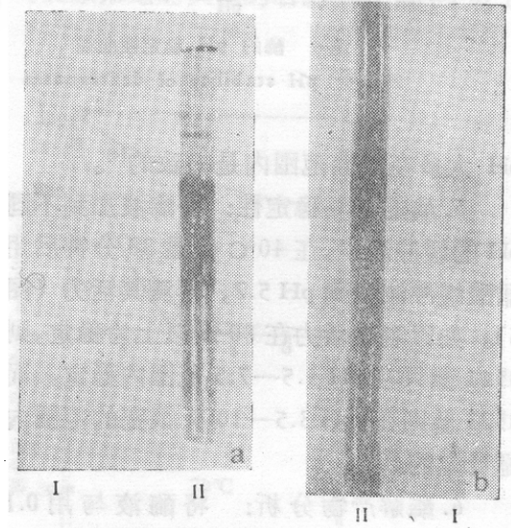


图 8 培养液的聚丙烯酰胺凝胶电泳模式及酶区带定位

a 8519 菌; b. 8523 菌

I 为酶区带定位; II 为凝胶电泳模式

Fig. 8 Patterns of PAGE and sites of enzymatic zone

a. Strain 8519; b. Strain 8523

I. The sites of enzymatic zone

II. The pattern of PAGE

表 3 培养液对不同天然底物的作用

Table 3 The action of broth to different natural substrates

底物 Substrate	主要的键 Major linkages	相对活力 Relative activity(%)				
		8501	8514	8519	8523	8541
右旋糖酐 T-2000 Dextran T-2000	α -1, 6(95%)	100	100	100	100	100
右旋糖酐 Dextran (MW 10 ⁵)	α -1, 6(95-98%)	93.8	92.2	96.8	101.7	106.0
茁霉多糖 Pullulan	α -1, 4; α -1, 6	0	0	0	0	0
糯米淀粉 Glutinous rice starch	α -1, 4; α -1, 6	0	0	0	0	0
β -极限糊精 α -limit dextrin	α -1, 4; α -1, 6	0	0	0	0	0
糖原 Glycogen	α -1, 4; α -1, 6	0	0	0	0	0
可溶性淀粉 Soluble starch	α -1, 4	0	0	0	0	0
纤维二糖 Cellobiose	β -1, 4	0	0	0	0	0
变聚糖 Mutan	α -1,3(53%); α -1,6(21%)	1.5	2.4	3.8	2.9	3.6
蜜二糖 Melibiose	α -1, 6 gal-glc	0	0	0	0	0
棉子糖 Raffinose	gal-glc-fru	1.0	1.1	0	0	2.3
蔗糖 Sucrose	α -glc1, 2- β -fru	1.3	1.7	0	0	2.6
麦芽糖 Maltose	α -1, 4	0	0	0	0	0
海藻二糖 Trehalose	α -1, 1- α	0	0	0	0	0
昆布多糖 Laminarin	β -1, 3	0	0	0	0	0
地衣多糖 Lichenin	β -1, 3; 1, 4	0	0	3.2	0	0
α -环状糊精	cyclic molecule, α -1, 4	0	0	0	0	0
β -环状糊精		0	0	0	0	0
γ -环状糊精 Cyclodextrin		0	0	0	0	0

Abbr.: glc: glucose; gal: galactose; fru: fructose

用, 这与测定转化酶活性所得结果是吻合的。另外 8519 菌对地衣多糖 (β -1, 3, 1, 4 葡聚糖) 也略具活力。

8. 凝胶电泳模式及酶区带定位: 将培养液进行盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕, 将凝胶柱取出, 对半剖开, 一半用于

染色,一半置于用 0.1 mol/L pH 5.2 醋酸缓冲液配制的 1% 右旋糖酐 (内含 1.25% 琼脂)的平皿上,在 37°C 放置 1—1.5 小时后,倒入 95% 酒精盖住琼脂面,置于冰箱内冷冻 2 小时,在有酶活性的区带部位出现透明带,与已染色的胶进行对照,便可确定酶活性区带所在部位。图 8a 是 8519 菌所产酶区带的定位照片,只有一条酶活性区带;而 8523 菌则有多条酶活性区带 (图 8-b)。A. Takahashi 报道在拟杆菌中筛选到的右旋糖酐酶具有两种不同的分子型,它们在底物专一性上有差别^[17],而 8523 菌不同酶活性区带在酶学性质和本质上的差异,还有待进一步研究。

9. 对不同交联度葡聚糖的作用: 葡聚糖凝胶 (Sephadex) 是右旋糖酐和甘油基以醚桥相互交联而形成的网状结构物,根据交联程度不同而有多种型号。本实验以它们为底物来观察右旋糖酐酶活力与葡聚糖交联度的关系。反应体系中含 2% Sephadex 悬液和 0.1 mol/L、pH 5.2 醋酸缓冲液及一定量的酶液,在 40°C 反应 10 分钟 (其间不时搅动以使酶能充分作用于 Sephadex 颗粒),煮沸杀死酶,以加入死酶的作为空白对照。离心取上清液,测其释放出的还原糖量。表 4 表明,交联度越大,右旋糖酐酶作用能力越弱,对交联度很大

的 Sephadex G-25, 该酶难以作用。这种情况在五株菌的酶所得结果完全一致。

10. 金属离子和一些蛋白质侧链修饰剂的影响: 在酶反应体系中,先加入酶液和所需量的 pH 5.2 醋酸缓冲液,再加入各种金属离子和一些蛋白质侧链修饰剂,置于 40°C 水浴保温 30 分钟后,然后加入底物开始反应,测定其右旋糖酐酶活力。以原始酶液活力为 100%, 计算各自相对活力,结果见表 5。Hg²⁺、Ag⁺ 对 5 株菌的酶有强烈抑制作用,Cu²⁺、Pb²⁺、Be²⁺ 和 Fe³⁺ 也有部分抑制效应,但对不同菌的酶抑制程度不同。如 Cu²⁺ 对 8541 菌的酶的抑制能力达 70%,而对 8523 菌的酶几乎不抑制。EDTA 对它们皆无影响,说明该酶的活性不需要金属离子的存在。巯基试剂碘乙酸和 PCMB 对酶活力无影响,而色氨酸残基修饰剂 NBS 对所有 5 株菌的酶都有强烈抑制作用,这些结果在一定程度上反映了这些酶的催化本质。在我们的实

表 4 培养液对不同交联度葡聚糖凝胶的作用
Table 4 The action of broth on Sephadex with different degree of cross-linkage

菌株 Strain	相对活力 Relative activity (%)			
	Sephadex G-100	Sephadex G-75	Sephadex G-50	Sephadex G-25
8501	100	64.8	15.5	0
8514	100	80.0	15.6	0
8519	100	81.0	18.9	0
8523	100	74.0	14.0	0
8541	100	75.0	15.6	0

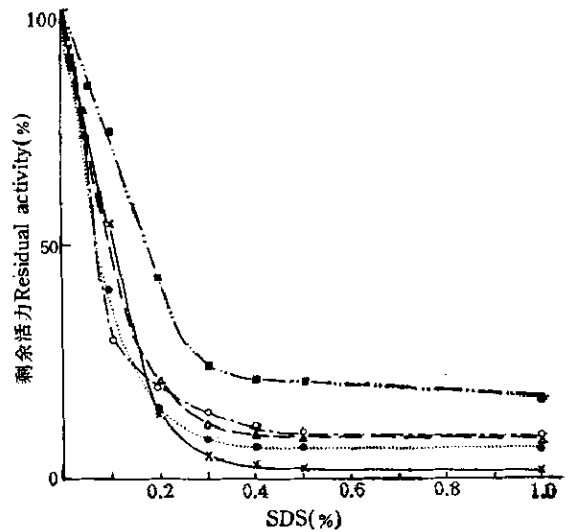


图 9 SDS 对酶活力的影响

Fig. 9 Effect of SDS on enzymatic activity
Strain 8501 ×—×; Strain 8514 ●.....●;
Strain 8519 △--△; Strain 8523 ■-.-■;
Strain 8541 ○-.-○

表 5 金属离子和一些蛋白质侧链修饰剂对酶活力的影响

Table 5 Effect of metal ions and some modification reagents on enzyme activity

试剂 Reagent	最终浓度 Final concn. m mol/L	相对活力 (%) Relative activity				
		8501	8514	8519	8523	8541
原酶液 (No reagent)	0	100	100	100	100	100
EDTA	1	90.6	98.8	98.0	103.9	95.7
CuSO ₄	1	60.2	64	36.8	94.9	30.5
MgSO ₄	1	89.1	102.6	86.0	94.6	101.8
Li ₂ SO ₄	1	91.4	103.7	92.5	100.8	100.1
MnSO ₄	1	76.0	84.0	80.8	95.3	65.9
CaCl ₂	1	88.9	101.9	94.2	94.6	82.8
BaCl ₂	1	97.0	101.9	95.7	97.7	102.4
HgCl ₂	1	0	2.5	5.2	0	0
SrSO ₄	1	97.0	97.6	97.9	104.0	104.1
AgNO ₃	1	4.8	6.3	10.4	4.7	0
NiCl ₂	1	88.1	103.6	70.7	97.6	66.4
FeSO ₄	0.1	93.3	96.7	94.9	92.6	98.6
FeCl ₃	1	51.8	60.4	66.9	54.8	80.0
ZnSO ₄	1	82.6	98.8	83.5	94.9	58.0
Al ₂ (SO ₄) ₃	1	84.3	83.3	93.3	92.7	87.3
Pb(AC) ₂	1	58.6	63.1	72.1	52.9	83.1
Cr ₂ (SO ₄) ₃	1	93.1	97.1	94.0	91.3	93.8
SnCl ₄	1	74.8	106.2	95.6	80.0	84.2
BeSO ₄	1	70.3	78.7	74.2	77.6	57.3
CoCl ₂	1	103.8	104.3	97.8	107.4	95.9
碘乙酸 Iodoacetate	1	99.1	102.8	94.4	100	105.4
对氯汞苯甲酸 PCMB	0.01	99.3	97.5	93.9	105.8	99.4
N-溴代琥珀酰亚胺 NBS	1	7.6	4.8	7.3	9.3	10.7

Abb.: PCMB: p-chloromercuribenzoic acid NBS: N-bromosuccinimide

验中,未发现明显的激活剂。

11. 一些蛋白质变性剂对酶活力的影响: (1) SDS 对酶活力的影响: 将培养液与 SDS (最终浓度分别为 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 和 1%) 一起在室温 (23℃) 下保温 16 小时, 然后按常规法测定剩余活力, 结果示于图 9。SDS 对酶具有明显的钝化作用, 但各菌表现程度不一。总的说来, 8523 菌的酶较稳定, 在上述条件下, 0.1% 的 SDS 处理后, 剩余活力仍在 70% 以上, 而其它菌的酶都在 50% 以下。(2) 脲对酶活力的影响: 将培养液与脲 (最终浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 和 8.0

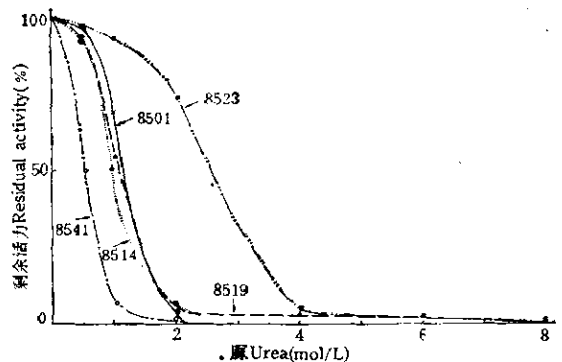


图 10 脲对酶活力的影响

Fig. 10 Effect of urea on enzymatic activity
Strain 8501 X—X; Strain 8514 ●.....●;
Strain 8519 △---△; Strain 8523 ■---■;
Strain 8541 ○---○

mol/L) 一起在室温(23℃)下保温 16 小时后,测定剩余活力,结果见图 10。脲对酶的钝化作用也很明显,而 8523 菌的酶相比之下较为稳定,在上述条件下用 1 mol/L 脲处理后,剩余活力在 90% 以上,而 8541 菌的酶在此条件下活力几乎完全丧失。

A. Hattori 等人^[18]对 556 株真菌和 115 株链霉菌进行了筛选,从中选出 8 株,进行了少数几项性质的比较。我们则是在 3000 多株菌中作了广泛筛选,对选出的 5 株菌的酶系作了较全面的酶学性质比较。从所有这些比较中,我们发现 8523 菌所产的右旋糖酐酶在温度稳定性、pH 稳定性、对蛋白质变性剂的耐受性及酶组分的单纯性等都比其它几株菌的酶要好,有些性质甚至超过了文献报道所列的数据,因而是一株很有理论研究和应用价值的菌株,有关这方面的工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] 岡田禎三: 齿科医学, 45(2): 190—205, 1982。
- [2] Godfrey, T.: Industrial Enzymology — The Application of Enzymes in Industry. (Eds. by Godfrey, T. and Reichelt, J.), The Nature Press, Surrey, England, p. 422—423, 1983.
- [3] 石家骏治等: 日本特許公报, 昭 60—6631, 1985。
- [4] 凑贞正: 日本農芸化学会誌, 57(2): 155—166, 1982。
- [5] 管沼信夫, 馬场久衛: 日本特許公报, 昭 57—36249, 1982。
- [6] Hare, M. D. et al.: *Carbohydr. Res.*, 66: 245—264, 1978.
- [7] Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, 153: 375, 1944.
- [8] Metznerberg, R. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 96: 468—474, 1962.
- [9] 中国科学院微生物所酶结构与功能研究组: 微生物学报, 16(3): 200—205, 1976。
- [10] 戈苏国等: 微生物学通报, 12(4): 157—159, 1985。
- [11] 王杨声等: 微生物学报, 20(4): 398—406, 1980。
- [12] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404, 1964.
- [13] 上海市工业微生物所等: 工业微生物, 第 1 期, p. 32—48, 1974。
- [14] Pukumoto, J. et al.: *J. Biochem.*, 69: 1113—1121, 1971.
- [15] Chaiet, L. et al.: *Applied Microbiol.*, 20(3): 421—426, 1970.
- [16] Walker, G. J. and A. Palkownik: *Carbohydr. Res.*, 36: 53, 1974.
- [17] Takahashi, A.: *Microb. Immu.*, 26(5): 375—386, 1982.
- [18] Hattori, A. and K. Ishibashi: *Agric. Biol. Chem.*, 45(10): 2347—2349, 1981.

SCREENING OF DEXTRANASE PRODUCING STRAINS AND COMPARISON OF THEIR ENZYMATIC PROPERTIES

Sun Jinwu Cheng Xiulan Yan Zizheng Zhu Meifang Zhang Shuzheng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

From 3162 strains of fungi, 528 strains had dextranase activity. It widely distributed over many species including *Asp. flavipes*, *Pen. vermiculatum*, *Pen. chrysogerum* and *Asp. nidulans*, which we haven't found in other reports. After rescreening, 5 strains were selected, they were *Asp. flavipes* (2 strains), *Asp. corneus*, *Asp. ustus* and *Paecilomyces lilacinus*. The detailed comparison of their dextranase properties were made. The optimum active temperature of all of them were 50—55°C, optimum pH were 5.0—5.5. The hydrolytic end products from dextran were isomaltose, isomaltotriose and rare glucose. They were typical endoenzyme. Except these, they had some differences in other

properties such as heat and pH stability, the other enzyme activities, the activity towards to different substrates, the pattern of PAGE, and the effects by metal ions and some protein denatural agents. The enzyme from *Paecilomyces lilacinus* 8523 possessed quiet good enzymatic properties. The residual activity was 95% and 90% after incubated at 50°C for 24 h and 60°C for one hour respectively. It was stable in a wide pH range from 3.5—10.5, and the enduring ability to SDS and urea of this enzyme was better than those from other strains.

Key words

Dextranase; Fungi; Enzyme property