

## 一株产右旋糖酐酶青霉的分离及酶的纯化和性质

张洪斌, 吴定涛, 黄丽君, 胡雪芹, 王旭

合肥工业大学化工学院制药工程系, 合肥 230009

**摘要:**【目的】从土壤中筛选到一株新的产右旋糖酐酶的真菌 F1001, 为酶法制备药用级右旋糖酐提供新的右旋糖酐酶产生菌株。【方法】通过形态特征和 ITS rDNA 序列分析方法鉴定菌株。利用硫酸铵盐析、Sephrose 6B 凝胶柱纯化, 得到纯度较高的酶蛋白。以右旋糖酐 70 kDa 为底物, 对右旋糖酐酶学性质及催化机理进行研究。【结果】经过鉴定确定菌株 F1001 为棘孢青霉 (*Penicillium aculeatum*)。通过 SDS-PAGE 测得棘孢青霉右旋糖酐酶的分子量为 66 kDa 左右。酶促反应的最适温度为 35℃, 最适 pH 为 5.0, 酶在 pH 4.0-7.0 和 50℃ 以下稳定。酶的最适底物浓度为 3%, 酶催化水解右旋糖酐的主产物为异麦芽糖, 确定该酶为内切右旋糖酐酶, 并且只对连续的  $\alpha$ -1,6 葡萄糖苷键起作用。酶的  $K_m$  值为  $3.55 \times 10^{-5}$  mol/L,  $V_{max} = 4.29 \times 10^{-2}$  mol(葡萄糖)/min·L。 $Cu^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  对酶活有较强的促进作用, 低浓度的  $Cu^{2+}$  使酶活力提高到 134.7%,  $Mn^{2+}$  对酶催化活力抑制作用较强。【结论】筛选得到一株新的右旋糖酐酶的产生菌 F1001, 产生的右旋糖酐酶活性高、稳定性较好。为该酶进行催化反应和工业应用提供了重要参数。

**关键词:** 右旋糖酐酶, 棘孢青霉, 分离纯化, 酶学性质

**中图分类号:** Q814      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 04-0495-09

右旋糖酐(dextran)是若干葡萄糖脱水形成的聚合物,主要由葡萄糖  $\alpha$ -1,6 糖苷键连接而成,由肠模状明串菌株 (*Leuconostoc mesenteroides*) 产生的右旋糖酐蔗糖酶 (dextransucrase; E. C. 2. 4. 1. 5) 合成的右旋糖酐含有 95% 的  $\alpha$ -1,6, 同时含有少量其它糖苷键的分支结构<sup>[1]</sup>。因其具有安全、无毒等多种优点,已被广泛应用于医药、工业、食品等多个领域<sup>[2-4]</sup>。分子量 70 kDa 左右的右旋糖酐是目前公认的优良血浆代用品之一,有增加血容量的作用,临床主要用于治疗失血性休克<sup>[5]</sup>。目前国内多采用右旋糖酐蔗糖酶合成高分子右旋糖酐,再利用盐酸水解得到不同分子量的右旋糖酐,由于生产的右旋

糖酐含有大量的氯化物严重影响了右旋糖酐的质量和品质,在临床使用过程中常出现过敏反应。如果采用右旋糖酐酶催化水解高分子右旋糖酐,就能减少氯化物对产品质量的影响,得到高品质的右旋糖酐,酶催化降解反应条件温和、能耗低,从而实现了中、小分子量多糖生产工艺的绿色、环保、低碳的目标。

右旋糖酐酶 (dextransucrase,  $\alpha$ -1, 6-D-glucan-6-glucanohydrolase; E. C. 3. 2. 1. 11) 能够催化水解右旋糖酐中的  $\alpha$ -1,6 糖苷键,并释放出异麦芽糖。右旋糖酐酶是一种诱导酶,主要的诱导物有:右旋糖酐,改良的底物酮基右旋糖等<sup>[6]</sup>。右旋糖酐酶可以用

**基金项目:** 安徽省长三角科技联合攻关项目 (10140702001); 合肥工业大学大学生创新性实验计划项目 (CXSY10067)

**作者简介:** 张洪斌 (1970-), 男, 安徽桐城人, 博士, 副教授, 研究方向为生物制药与酶工程。Tel/Fax: +86-551-2901968; E-mail: zhb5678@163.com

**收稿日期:** 2010-12-15; **修回日期:** 2011-01-20

于龋齿的防治<sup>[7]</sup>,可以用于催化水解高分子右旋糖酐合成血浆替代品,在制糖工业<sup>[8]</sup>中,可以增加糖的回收率,降低黏度。可以增强药物的化学稳定性、生物利用度<sup>[9]</sup>。本实验室在对右旋糖酐蔗糖酶进行深入研究的基础上<sup>[10-12]</sup>,对右旋糖酐酶的制备及其酶学性质进行研究。通过对右旋糖酐酶产生菌的筛选,得到一株产高活性右旋糖酐酶的菌株 F1001,经鉴定为棘孢青霉(*Penicillium aculeatum*)。该右旋糖酐酶产生菌目前国内未见相关报道,并对其产生的右旋糖酐酶进行了分离纯化及酶学性质研究,为其应用于工业生产药用级右旋糖酐打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要仪器及试剂:**蛋白质分子量标准(大连 TaKaRa 公司); Dextran T2000, Sepharose 6B (Pharmacia);右旋糖酐 70 kDa、右旋糖酐 40 kDa、右旋糖酐 20 kDa(六安华源制药集团);其它常用试剂均为分析纯。SPX-150B 生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);WFZ800-D3B 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);HC-3018R 高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);ZHWHY-2102 恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司);光学显微镜为 COIC XSZ-G。

**1.1.2 土样来源:**采自四川成都、安徽合肥、安徽阜阳的土壤样品 40 个。

**1.1.3 培养基:**(1)PDA 培养基;(2)用于右旋糖酐酶产生菌的筛选培养基:(w/v) 1.5% dextran T2000,0.3% NaNO<sub>3</sub>,0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O,0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05% KCl;(3)发酵培养基:(w/v) 1.0% dextran 70 kDa,0.3% 蛋白胨,0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O,0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,0.05% KCl,0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O。

### 1.2 右旋糖酐酶产生菌的筛选

稀释土样 10<sup>-3</sup> - 10<sup>-5</sup> 倍,制成土壤混悬液,将其涂布到 PDA 培养基上,28℃ 恒温倒置培养 7 d 左右,筛选出土壤中的真菌,将真菌转接到右旋糖酐酶产生菌的筛选培养基上,28℃ 恒温倒置培养 5 d,将能够生长的菌株用于发酵培养,再利用打孔法检测发酵液能否降解 Dextran T2000,筛选出能够产生较大透明圈的菌株。

### 1.3 菌株的鉴定

观察菌落的形态特征,参照真菌鉴定手册<sup>[13]</sup>及中国真菌志<sup>[14]</sup>,再对菌株进行 ITS rDNA 鉴定,将菌株的发酵液经过滤获得菌丝,提取真菌基因组的总 DNA,再将其送往上海生工生物技术有限公司进行 ITS rDNA 测序后,将获得的目的 DNA 片段的序列输入 GenBank,利用在线 Blast 程序与 NCBI 数据库中的所有序列进行比较分析。并利用 MEGA4.1 的 Neighbor-Joining 软件进行系统发育树构建。

### 1.4 酶活力测定及蛋白含量测定

**右旋糖酐酶的活力测定:**将 4 mL 0.02 mol/L pH 5.0 的醋酸盐缓冲液配制的 3% 右旋糖酐 70 kDa 溶液置于 35℃ 保温 10 min,再加入适当稀释的酶液 1 mL 保温 1 h 后,利用 3,5 二硝基水杨酸(DNS)法测定生成的还原糖<sup>[15]</sup>。以在上述条件下每分钟产生 1 μmol 还原糖(葡萄糖当量)所需要的酶量为一个酶活力单位(U)。

**蛋白含量的测定:**利用牛血清蛋白为标准,采用 Bradford 法<sup>[16]</sup>测定蛋白含量。

### 1.5 右旋糖酐酶的分离纯化

**1.5.1 粗酶液的制备:**将右旋糖酐酶产生菌株接种到装有 80 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中,置于 28℃、200 r/min 恒温培养 7 d,发酵液经 6000 × g,4℃ 离心 15 min,去除菌体,得到粗酶液。

**1.5.2 硫酸铵分级沉降:**将固体硫酸铵研细加入发酵液中,调至不同的饱和度(10% - 90%),待加入的硫酸铵全部溶解后,4℃ 静置过夜,经 8000 × g 离心 20 min 后分离沉淀与上清液,取沉淀加入 0.02 mol/L pH 5.0 醋酸盐缓冲液溶解,再进行酶活和蛋白含量测定,确定最优沉降比例。

**1.5.3 Sepharose 6B 凝胶过滤层析:**经硫酸铵分级沉降后的沉淀用 0.02 mol/L pH 5.0 醋酸盐缓冲液溶解,过夜透析,蒸发浓缩。再加样到已用 0.02 mol/L pH 5.0 醋酸盐缓冲液平衡的 Sepharose 6B 凝胶过滤柱(1.0 cm × 30 cm),用 0.02 mol/L pH 5.0 醋酸盐缓冲液洗脱,流速 12 mL/h,收集洗脱液后经过酶活和蛋白含量测定,再进行 SDS-PAGE 检测。

### 1.6 SDS-PAGE 分析

具体步骤参照[17],用于分析蛋白质的分子量,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 6%,染色液用考马斯亮蓝 R-250。

## 1.7 右旋糖酐酶学性质

**1.7.1 酶的最适反应温度及热稳定性:**在 0.02 mol/L pH 5.0 醋酸盐缓冲液中,酶分别在 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃ 不同温度下按酶活力测定法测定酶活,考察酶的最适反应温度,以酶活最高者为 100%,计算相对活力。酶液在 0.02 mol/L pH 5.0 醋酸盐缓冲液中于不同温度(15℃ - 70℃)保温 1 h 后,在最适温度下测定其相应的剩余酶活力,考察酶的温度稳定性。并将酶在 4℃、35℃ 保藏,跟踪检测保藏过程中酶活的变化。用于酶学性质研究的待试酶样品均为右旋糖酐酶粗酶液经纯化后的酶,再经适当稀释酶活力达 68 U/mL(最适条件下测得)。

**1.7.2 酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性:**酶分别在不同 pH(4 - 9)的 0.02 mol/L 醋酸盐缓冲液和酶的最适反应温度条件下按酶活力测定法测定酶活,研究酶促反应的最适 pH,以酶活最高者为 100%,计算相对活力。将酶液分别置于不同 pH(4 - 9)的 0.02 mol/L 醋酸盐缓冲溶液体系中于 4℃ 放置 1 h 后,在调至最适 pH 条件下测定其对应的剩余酶活力,研究酶的 pH 稳定性。

**1.7.3 动力学常数  $K_m$  及  $V_{max}$  的测定:**将酶液与不同浓度的右旋糖酐 70 kDa 底物作用,测定酶的反应初速度,用 Lineweaver—Burk 双倒数作图法求出以右旋糖酐 70 kDa 的酶的  $K_m$  值及  $V_{max}$ 。

**1.7.4 金属离子和其它试剂对酶活力的影响:**在 0.02 mol/L pH 5.0 醋酸盐缓冲液中分别加入各种金属离子和试剂,致使金属离子和试剂的终浓度为 0.001 mol/L,按标准方法测定酶活力,以未加入金属离子和试剂的酶液为对照 100%,计算相对活力。观察金属离子和试剂对酶活力的影响。

**1.7.5 酶的底物专一性和酶解产物分析:**用 0.02 mol/L pH 5.0 醋酸盐缓冲液将各种底物配成 3% 的溶液,并且用 0.02 mol/L pH 5.0 醋酸盐缓冲液将右旋糖酐 70 kDa 分别配成 1%、3%、6%、7%、9% 的溶液。在标准条件下测定酶活力,在反应过程中不停的搅拌,以酶活力最高者为 100%,研究酶的底物专一性。同时研究酶催化水解右旋糖酐 70 kDa 的最适底物浓度。将酶液与 0.02 mol/L pH 5.0 醋酸盐缓冲液配制的 3% 右旋糖酐 70 kDa 底物在 35℃ 下保温不同时间(30 min、60 min、120 min),再

煮沸 5 min 灭活,用硅胶薄层色谱(TLC)法分析酶水解产物。

## 2 结果

### 2.1 对土样的筛选结果及菌株鉴定

对不同地区 40 份土样进行筛选得到的真菌 F1001 能够降解右旋糖酐产生较大透明圈,经发酵培养,测定发酵液在最适条件下酶的活力高达 75 U/mL。菌株在 PDA 培养基上 28℃ 恒温培养 3 d 后肉眼可看到清晰的菌丝体,孢子培养 7 d 菌落直径为 40 mm,分生孢子面为青绿色,反面略带黄色,菌落外缘绒状,中部有凹沟和皱裂。在显微镜下观察,菌丝成束,帚枝双轮对称型。分生孢子球形,直径为 3.5  $\mu\text{m}$  - 4.5  $\mu\text{m}$ ,具有小棘。孢子梗壁光滑,直径为 2.5  $\mu\text{m}$  - 4.5  $\mu\text{m}$ ,小梗披针形。菌落在发酵培养基上 28℃ 恒温培养 7 d,直径为 15 mm - 22 mm。菌落中部有明显的凹沟和皱裂,分生孢子面为黄色至黄绿色,反面为浅黄色。利用 ITS rDNA 特异引物对菌株进行 PCR 扩增得到 524 bp 的目的 DNA 片段,将得到的序列提交到 GenBank 上,获得 GenBank 登陆号为 HQ647326,利用 Blast 软件与 GenBank 中的相关序列进行同源性比较,结果显示菌株 F1001 的 524 bp 的目的 DNA 序列与青霉属的棘孢青霉(*Penicillium aculeatum*)和疣孢青霉(*Penicillium verruculosum*)同源性高达 99%。利用 MEGA4.1 的 Neighbor-Joining 软件进行系统发育树构建,结果如图 1,遗传距离显示菌株 F1001 与棘孢青霉遗传距离最近。根据形态特征和 ITS 序列分析结果,参照文献[13]和[14],确定菌株 F1001 为棘孢青霉。

### 2.2 右旋糖酐酶的分离纯化

右旋糖酐酶在硫酸铵为 35% - 65% 的饱和度条件下沉淀下来,以 200 mL 发酵液开始,右旋糖酐酶从粗酶液到最后纯化产物共纯化了 7.884 倍,回收率为 13.2%,纯化后酶比活力高达 20608 U/mg,右旋糖酐酶的分离纯化结果如表 1 所示。图 2 为纯化过程中 Sepharose 6B 凝胶过滤层析的色谱图,右旋糖酐酶在 19 管到 23 管被洗脱下来。纯化的结果进行了 SDS-PAGE 分析,电泳结果见图 3,SDS-PAGE 显示该酶的分子量为 66 kDa 左右。

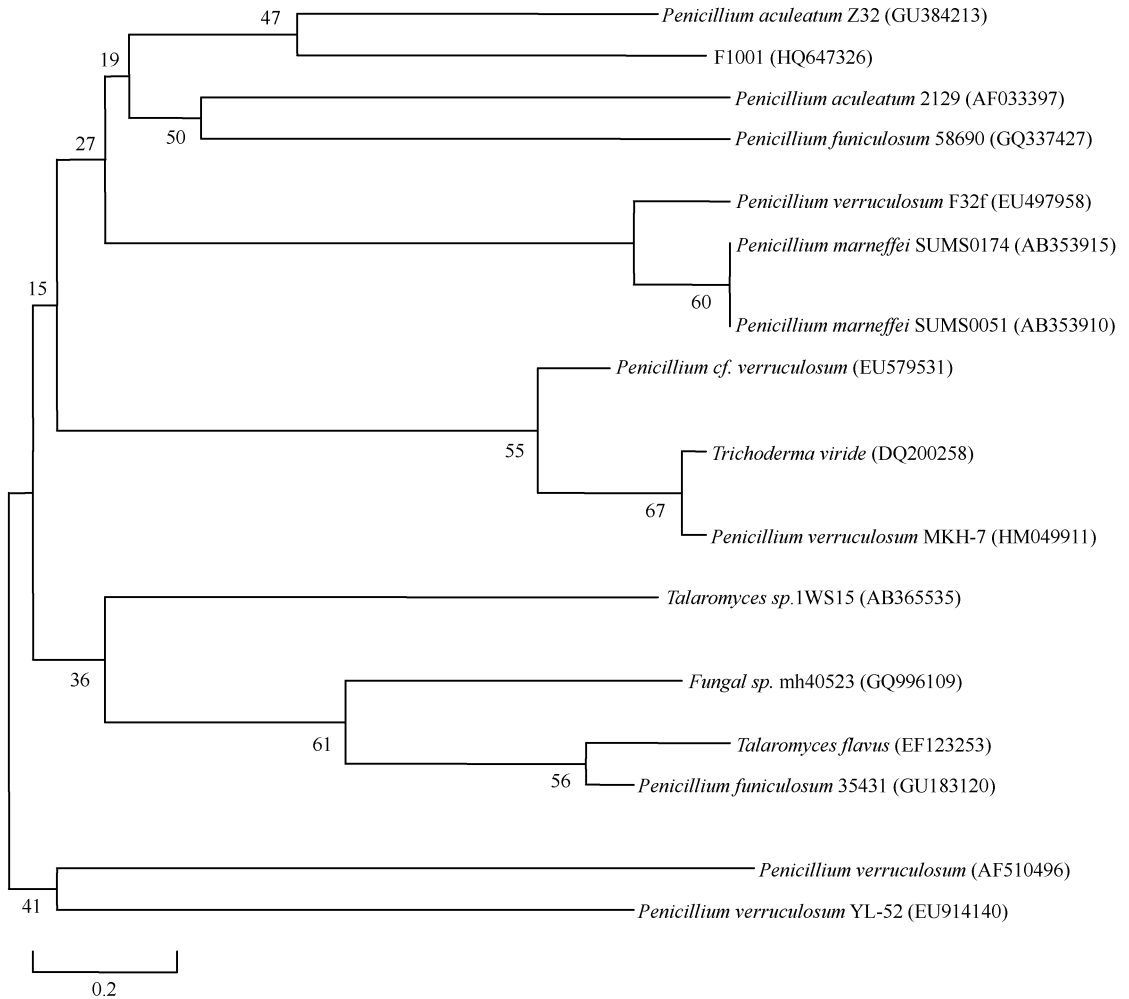


图1 菌株 F1001 的基于 ITS rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain F1001 and reference *Penicillium* species. Evolutionary distances showed in the figure were calculated by MEGA4.1; 0.2 substitution per nucleotide. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

## 2.3 酶学性质研究结果

**2.3.1 酶的最适温度及热稳定性:**右旋糖酐酶在不同温度下测定的酶活结果见图 4-A,该酶的最适反应温度为 35℃ 左右,在 30℃ 到 40℃ 之间右旋糖酐酶都具有较高的酶活力。酶在 45℃ 保温 1 h 后剩余活力为原来的 95.67%,当温度达到 55℃ 以上保温 1 h 后酶几乎全部失活,表明该酶对热较敏感(图 4-B),将酶置于 4℃、35℃ 保藏并取样测量酶的剩余酶活力,结果见表 2,酶在 4℃ 下保藏 3 d 剩余活力为 94.90%,18 d 后剩余活力仍有原来的 49.70%,说明酶在 4℃ 低温下热稳定性好;35℃ 保温 2 d 活力剩

88.9%,10 d 后剩余活力仍然有 50.6%,说明该酶在 35℃ 热稳定较好。

**2.3.2 酶的最适反应 pH 值及 pH 稳定性:**pH 对右旋糖酐酶活力影响的实验结果见图 5A,结果表明该酶催化反应的最适 pH 值为 5.0,在 pH 4.0 - 5.5 之间活力较好,当反应 pH 升到 6.0 以上,酶活下降比较快。酶的 pH 稳定性实验结果(图 5B)表明该酶在 pH 值为 4.0 - 7.0 的条件下稳定性相对较好,酶在 pH 8.0 的条件下保存 1 h 后酶活力仍保留原来的 64.93%,在 pH 8.0 以上随着 pH 值升高酶活逐渐下降,直至 pH 9.0 时酶基本全部失活。

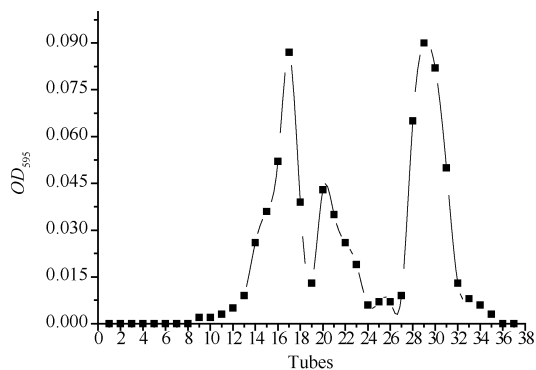


图2 Sepharose 6B 凝胶过滤层析

Fig.2 Gel filtration chromatography of dextranase using Sepharose 6B. Dextranase from the 35% - 65% ammonium sulfate fraction was dissolved in 0.02 mol/L acetate buffer (pH 5.0) and dialyzed against the same buffer. Then the mixture was loaded onto a 1.0 cm i. d. × 30 cm Sepharose 6B column, and proteins were eluted from the column with 0.02 mol/L acetate buffer (pH 5.0), at a flow rate of 12 mL/h. The fractions containing substantial dextranase activity were collected.

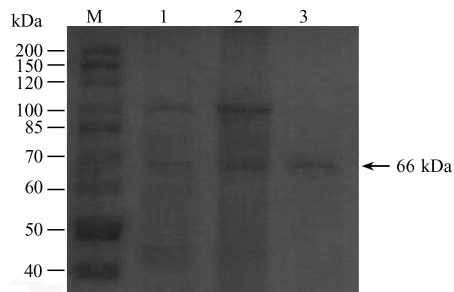


图3 右旋糖酐酶的 SDS-PAGE

Fig.3 Analysis of dextranase by SDS-PAGE. Fractions possessing dextranase activity were pooled and subjected to 12% polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, the gel was stained by Coomassie blue. Lane M: protein marker; Lane 1: Culture broth; Lane 2: Ammonium sulfate precipitation; Lane 3: purified dextranase.

2.3.3 动力学常数  $K_m$  及  $V_{max}$  的测定: 分别以 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%、1.0% 的右旋糖酐 70kDa 为底物, 测定底物反应的初速度,

表1 右旋糖酐酶的纯化

Table 1 Purification of dextranase

Purification step	Total protein/mg	Total activity/U	Specific activity/(U/mg)	Purification/fold	Yield/%
Crude extract	4.75	12419	2614	1	100
Ammonium sulfate precipitation	1.3	9856	7581	2.900	79.36
Sepharose 6B Chromatography	0.08	1640	20608	7.884	13.2

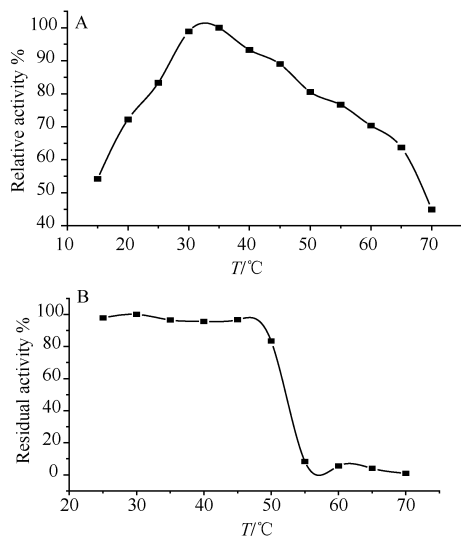


图4 温度对右旋糖酐酶活的影响

Fig.4 Effect of temperature on the activity and stability of dextranase. A: enzyme activity; B: thermal stability.

分别反应 3 min 钟后, 测得相应的酶活力值 ( $OD_{540}$ ) 为 0.625、0.740、0.865、0.967、1.012、1.050、1.085, 再采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 求得  $K_m$  值为  $3.55 \times 10^{-5}$  mol/L,  $V_{max} = 4.28 \times 10^{-2}$  mol (葡萄

糖)/min·L。

表2 温度、时间对右旋糖酐酶活稳定性的影响

Table 2 Effect of temperature and time on the stability of dextranase

$T/^\circ\text{C}$	Time	Relative stability/%	$T/^\circ\text{C}$	Time	Relative stability/%
4	Control	100	35	Control	100
	1 day	97.8		3 h	98.3
	3 day	94.9		1 day	93.5
	8 day	81.7		2 day	88.9
	11 day	72.9		7 day	67.68
15 day	61.3	10 day		50.6	
18 day	49.7	13 day		31.3	

2.3.4 金属离子和其它试剂对酶活力的影响: 金属离子和其他试剂对酶活力的影响实验结果见表 3, 其中  $\text{Cu}^{2+}$  对酶活有较强的促进作用, 使酶活力提高到 134.7%。 $\text{Zn}^{2+}$  对酶活也有促进作用, 相对于  $\text{Cu}^{2+}$  促进作用较弱。实验中所选用其它离子和试剂对酶催化活力均有不同程度的抑制作用,  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  有较弱的抑制作用,  $\text{Mn}^{2+}$  对酶催化活力抑制作用较强, 抑制了 50% 左右的活力。SDS、Tris、Urea、EDTA 对酶活力抑制都较弱。

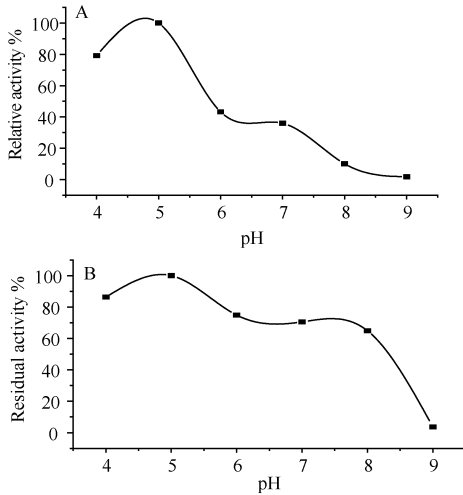


图5 pH对右旋糖酐酶活力及稳定性的影响

Fig.5 Effect of pH on the activity and stability of dextranase. A: enzyme activity; B: pH stability.

表3 金属离子和其他试剂对酶活力的影响

Table 3 Effect of some compounds and metal ions on the activity of dextranase

Compounds and ion	Concentration/(mol/L)	Relative activity/%
Control	—	100
Cu <sup>2+</sup>	0.001	134.7
Mn <sup>2+</sup>	0.001	50.9
Ca <sup>2+</sup>	0.001	84.72
Mg <sup>2+</sup>	0.001	82.64
Al <sup>3+</sup>	0.001	79.25
Zn <sup>2+</sup>	0.001	116.6
Fe <sup>2+</sup>	0.001	92.45
Co <sup>2+</sup>	0.001	85.66
Tris	0.001	99.1
SDS	0.001	89.62
Urea	0.001	92.83
EDTA	0.001	86.65

**2.3.5 酶的底物专一性:**右旋糖酐酶对不同糖类底物作用的结果如表4,结果显示右旋糖酐酶只作用于右旋糖酐中连续的 $\alpha$ -1,6糖苷键,对可溶性淀粉中的不连续 $\alpha$ -1,6糖苷键不起作用,同时对 $\alpha$ -1,4、 $\beta$ -1,4、 $\beta$ -1,3、 $\beta$ -1,2等糖苷键均无催化作用。实验表明酶作用于右旋糖酐70 kDa的最适底物浓度为3%,随着底物浓度的升高酶的活力降低。右旋糖酐酶对葡聚糖凝胶的作用随着Sephadex的交联度增大活力下降。对葡聚糖凝胶的衍生物均不起作用。

**2.3.6 酶解产物的分析:**酶解产物的硅胶薄层色谱分析结果如图6,由图可以看出作用30 min时,只有异麦芽糖和异麦芽三糖,并且异麦芽三糖的斑点最

表4 右旋糖酐酶对不同糖类底物的作用

Table 4 Action of dextranase on various carbohydrates

Substrates	Main linkages	Relative activity/%
Dextran T2000	$\alpha$ -1,6	72.48
Concentration (w/v)		
Dextran 70 kDa 1%		81.62
Dextran 70 kDa 3%		100.00
Dextran 70 kDa 6%	$\alpha$ -1,6	79.84
Dextran 70 kDa 7%		67.44
Dextran 70 kDa 9%		44.49
Dextran 40 kDa	$\alpha$ -1,6	87.81
Dextran 20 kDa	$\alpha$ -1,6	78.51
Sephadex G-150	$\alpha$ -1,6	69.90
Sephadex G-100	$\alpha$ -1,6	55.59
Sephadex G-50	$\alpha$ -1,6	21.72
Sephadex G-15	$\alpha$ -1,6	3.83
CM-Sephadex	$\alpha$ -1,6	0
DEAE-Sephadex	$\alpha$ -1,6	0
Sepharose 6B	$\beta$ -1,4	0
Agarose	$\beta$ -1,4	0
$\beta$ -Cyclodextrin	$\alpha$ -1,4	0
Soluble starch	$\alpha$ -1,4 a-1,6	0
Cellulose	$\alpha$ -1,4	0
Chitosan	$\beta$ -1,4	0
Sucrose	$\beta$ -1,2	0
Maltose	$\alpha$ -1,4	0
Lactose	$\alpha$ -1,4	0
Laminarin	$\beta$ -1,3	0

大,随着反应时间的增加,作用120 min以后,异麦芽三糖斑点减小,异麦芽糖斑点增大。最终异麦芽糖为主要产物,由此可见该酶水解右旋糖酐时并不是产生葡萄糖,说明此酶为内切右旋糖酐酶。

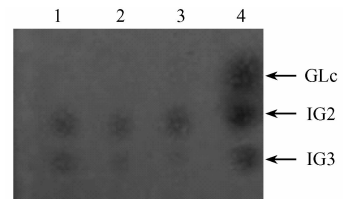


图6 右旋糖酐酶酶解产物的薄层析图谱

Fig.6 Analysis of dextranase hydrolysis product by thin layer chromatography (TLC). The enzyme was incubated at 35°C in 0.02 mol/L acetate buffer (pH 5.0) for different time (30 min, 60 min, 120 min) with 3% (w/v) dextran 70kDa. The reaction products were analyzed by TLC using n-butanol/acetic acid/H<sub>2</sub>O in a volume ratio of 2/1/1 (v/v/v). Enzymatic products: lane1, 30 min; lane2, 60 min; lane3, 120 min; lane4, Standard: Glucose (GLC); Isomaltose (IG2); Isomaltotriose (IG3).

### 3 讨论

右旋糖酐酶是一类具有差异的水解酶,按其作用方式分为内切右旋糖酐酶(endodextranase  $\alpha$ -1,6-glucan 6-glucanohydrolase; EC 3.2.1.11; 也被称作右旋糖酐酶)和外切右旋糖酐酶(exodextranase, glucan 1,6- $\alpha$ -glycosidase; EC 3.2.1.70; 也被称作右旋糖酐葡萄糖苷酶)。内切右旋糖酐酶水解右旋糖酐中的 $\alpha$ -1,6葡萄糖苷键,使其分子量变小,释放出异麦芽糖,并且大多数的内切右旋糖酐酶在催化时需要有多数个连通的 $\alpha$ -1,6葡萄糖苷键存在才能发挥作用。外切右旋糖酐酶,从还原端水解右旋糖酐中的 $\alpha$ -1,6葡萄糖苷键,并释放出葡萄糖。目前能作为右旋糖酐酶产生菌的微生物有很多种,国内外已经有报道的比如青霉菌、双歧杆菌、链球菌、放线菌等,内切右旋糖酐酶的产生菌比较多,最常见的有青霉菌<sup>[18]</sup>。从已经报道的研究结果来看,目前的研究当中,右旋糖酐酶产生菌最有研究价值的是青霉、拟青霉<sup>[19-20]</sup>。

国内外已报道了不同来源的右旋糖酐酶的分离纯化及酶学性质研究,但是有关棘孢青霉右旋糖酐酶的报道较少。本文基于真菌的基础之上,从中筛选得到一株高产右旋糖酐酶的产生菌 F1001,该右旋糖酐酶在最适条件下酶活力高达 75 U/mL,目前文献报道的由野生菌株产生的右旋糖酐酶酶活力高达 41.8 U/mL<sup>[19]</sup>,因此菌株 F1001 产生的右旋糖酐酶具有较高的酶活性。该菌株 F1001 经鉴定为棘孢青霉(*Penicillium aculeatum*),并对右旋糖酐酶进行了分离纯化及酶学性质研究。纯化后酶的比活力高达 20608 U/mg,该值远高于 D. K. Das 等<sup>[21]</sup>报道的 *Penicillium lilacinum* 右旋糖酐酶的比活力 3893.1 U/mg,然而却低于 E. Khalikova 等<sup>[22]</sup>报道的 *Paenibacillus illinoisensis* 右旋糖酐酶的比活力 78500 U/mg。纯化得到的右旋糖酐酶分子量为 66 kDa 左右,与 F. A Erhardt 等<sup>[23]</sup>报道的棘孢青霉产生的右旋糖酐酶不同,他所研究的棘孢青霉能够产生两种右旋糖酐酶,分子量分别为 59 kDa 和 80 kDa。与 Y. M Kim 等<sup>[24]</sup>报道的 *Thermotoga lettingae* TMO 右旋糖酐酶的分子量(64 kDa)接近。根据文献报道,目前右旋糖酐酶分子量一般在 40-80 kDa 之间,最小的为 D. K Das 等<sup>[21]</sup>报道的淡紫青霉(*Penicillium lilacinum*)右旋糖酐酶(分子量

为 26.5 kDa),最大的为 C. V. A Wynter 等<sup>[25]</sup>报道的 *Anaerobic thermophilic bacterium*, Rt364 产的右旋糖酐酶(分子量大约为 140 kDa)。该酶以右旋糖酐 70 为底物,最终水解产物以异麦芽糖为主,属于内切右旋糖酐酶,与孙晋武等<sup>[26]</sup>报道的黄柄白曲霉(*Aspergillus flavipcs*)和焦曲霉(*Aspergillus ustus*)相似。该酶的最适温度和 pH 分别为 35℃ 和 5.0。酶的最适 pH 与大多文献报道的真菌的右旋糖酐酶最适 pH 在 4.5-6.5 相似<sup>[27-28]</sup>。Cu<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 对酶活有较强的促进作用,其中低浓度的 Cu<sup>2+</sup> 使酶活力提高到 134.7%,这种特性在目前报道的右旋糖酐酶中较少。Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> 有较弱的抑制作用,Mn<sup>2+</sup> 对酶催化活力抑制作用较强,抑制了 50% 左右的活力。右旋糖酐酶作用于不同的糖苷键: $\alpha$ -1,6- $\alpha$ -1,4- $\beta$ -1,4- $\beta$ -1,3- $\beta$ -1,2。结果表明右旋糖酐酶只专一的水解葡聚糖中的 $\alpha$ -1,6糖苷键,这与目前大多数文献报道的右旋糖酐酶的底物专一性一致<sup>[19,29]</sup>,并且只能催化有多数个连通的 $\alpha$ -1,6葡萄糖苷键存在葡聚糖<sup>[30]</sup>,对于在分枝点处有 $\alpha$ -1,6糖苷键的可溶性淀粉不起作用。对交联葡聚糖凝胶的作用,随着葡聚糖的交联度越高而越弱,这与 M Pleszczynska 等<sup>[31]</sup>报道的特异青霉(*Penicillium notatum*)右旋糖酐酶相似。

本研究从土壤中筛选得到了一株新的产高活性右旋糖酐酶的菌株,并对右旋糖酐酶进行了分离纯化及酶学性质研究,结果表明该酶在温度稳定性、pH 稳定性等方面都比较好,并且酶活性能高于目前文献报道水平。为酶应用于工业化催化水解高分子右旋糖酐制备药用级中、小分子右旋糖酐提供了基础数据,从而实现中、小分子量多糖生产工艺的绿色、环保、低碳的目标。

### 参考文献

- [1] Kim D, Robyt JF, Lee SY. Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextranase. *Carbohydrate Research*, 2003, 338(1): 1183-1189.
- [2] 李良铸,李明晔. 最新生化药物制备技术. 北京:中国医药科技出版社, 2003: 299-301.
- [3] Yoshida H, Fujita K, Kudo K. Fabrication of Hard Dextran DEAE: Adsorption Equilibria of BSA. *Adsorption*, 1999, 5(1): 63-71.

- [ 4 ] Nikolić GS, Cakić M, Mitić Ž, Ilić L. Deconvoluted Fourier-transform LNT-IR study of coordination copper ( II ) compounds with dextran derivatives. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 2008, 34 ( 5 ) : 322-328.
- [ 5 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2010 版. 北京:化学工业出版社,2000;111-115.
- [ 6 ] 程秀兰,孙晋武,杨敬,陈竞,张树政. 淡紫拟青霉右旋糖酐酶的形成条件. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 1992, 132(5):334-339.
- [ 7 ] Staat RH, Schachtele CF. Characterization of a Dextranase Produced by an Oral Strain of Actinomyces israelii. *Injection and Immunity*, 1975, 12(3):556-563.
- [ 8 ] Cuddihy JA, Rauh JS, Mendez F. Dextranase in Sugar Production: Factory Experience. *A Subsidiary of Associated Chemicals and Services*, 1999, 21(7):21-25.
- [ 9 ] 陈发明,吴只芬,金岩,吴红,杜岩,王国芳,聂鑫. 釉基质蛋白控释微球的研制及其生物学性能的初步研究. *华西口腔医学杂志 (West China Journal of Stomatology)*, 2005, 23(6):529-533.
- [ 10 ] 张洪斌,朱春宝,胡又佳,朱宝泉,王雅洁. 右旋糖酐蔗糖酶工程菌株的构建及其培养条件的研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(4):492-497.
- [ 11 ] 王雅洁,张洪斌,胡雪芹,朱春宝,胡又佳. 重组大肠杆菌右旋糖酐蔗糖酶的纯化及其性质研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(9):1266-1269
- [ 12 ] Zhang HB, Hu YJ, Zhu CB. Cloning, sequencing and expression of a dextranase gene ( dexYG ) from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(8):1441-1446.
- [ 13 ] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海:上海科学技术出版社, 1979;501-512.
- [ 14 ] 孔华忠. 中国真菌志. 北京:科学出版社,2007:197-199.
- [ 15 ] Eggleston G, Monge A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. *Process Biochemistry*, 2005, 40:1881-1894.
- [ 16 ] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-254.
- [ 17 ] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆试验指南. 黄培堂,等译. 第三版. 北京:科学出版社,2002.
- [ 18 ] Bailey RW, Clarke RTJ. A Bacterial Dextranase. *Biochemistry*, 1959, 72(9):49-54.
- [ 19 ] Abdel-Naby MA, Ismail AMS, Abdel-Fattah AM, Abdel-Fattah AF. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. *Process Biochemistry*, 1999, 34(9):391-398
- [ 20 ] Baakza A, Vala AK, Dave BP, Dube HC. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 311(9):1-9.
- [ 21 ] Das DK, Dutta SK. Purification, biochemical characterization and mode of action of an extracellular endo-dextranase from the culture filtrate of *Penicillium lilacinum*. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1996, 28:107-113.
- [ 22 ] Khalikova E, Susi P, Usanov N, Korpela T. Purification and properties of extracellular dextranase from a *Bacillus* sp. *Journal of Chromatography B*, 2003, 796:315-326.
- [ 23 ] Erhardt FA, Stammen S, Jordening HJ. Production, characterization and (co-) immobilization of dextranase from *Penicillium aculeatum*. *Biotechnology Letters*, 2008, 30:1069-1073.
- [ 24 ] Kim YM, Kim D. Characterization of novel thermostable dextranase from *Thermotoga lettingae* TMO. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85:581-587.
- [ 25 ] Wyntera CVA, Chang M, Jersey JD, Patel B, Inkerman PA, Hamilton S. Isolation and characterization of a thermostable dextranase. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20:242-247.
- [ 26 ] 孙晋武,程秀兰,严自正,朱梅芳,张树政. 右旋糖酐酶产生菌的筛选及其酶学性质的比较研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 1988, 28(1):45-55.
- [ 27 ] Galvez-Mariscal A, Lopez-Munguia A. Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 36:327-331.
- [ 28 ] Szczodrak J, Pleszczynska M, Fiedurek J. *Penicillium notatum* 1 a new source of dextranase. *Journal of Industrial Microbiology*, 1994, 13:315-320.
- [ 29 ] Larsson AM, Andersson R, Stahlberg J, Kenne L, Jones TA. Dextranase from *Penicillium minioluteum*: Reaction Course, Crystal Structure, and Product. *Complex. Structure*, 2003, 11:1111-1121.
- [ 30 ] Walker GJ, Palkownik A. Action of  $\alpha$ -1, 6-glucoan glucohydrolase on oligosaccharides derived from dextran. *Carbohydrate Research*, 1974, 36:53-66.
- [ 31 ] Pleszczynska M, Rogalski J, Szczodrak J. Purification and some properties of an extracellular dextranase from



# Purification, characterization of an extracellular dextranase from an isolated *Penicillium* sp.

Hongbin Zhang<sup>\*</sup>, Dingtao Wu, Lijun Huang, Xueqin Hu, Xu Wang

Department of Pharmaceutical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

**Abstract:** [ **Objective** ] To obtain new fungi producing dextranase, we screened and identified a strain F1001 showing high dextranase activities. We provided a new strain with dextranase activity for producing clinical dextran. [ **Methods** ] Morphological and ITS rDNA sequences homology analysis were performed to identify the strain F1001. The enzyme was purified to electrophoretic homogeneity by the steps of ammonium sulfate precipitation and Sepharose 6B column chromatography. We studied the catalytic properties and the mechanism of the dextranase, and activities of dextranase were measured with dextran 70 kDa as the substrate. [ **Results** ] The isolated strain F1001 was identified as *Penicillium aculeatum* precisely by ITS rDNA sequences homology analysis. Its molecular mass was estimated to be about 66 kDa by SDS-PAGE. The optimal reaction temperature was 35°C, and the optimum pH was 5.0, it was stable in the condition of pH 4.0 - 7.0 and under the temperature of 50°C. The optimum substrate concentration was 3% (w/v). The final dextranase hydrolysis product was isomaltose, which proved that the enzyme was endodextranase and only had activity with dextran joined mainly by continual  $\alpha$ ,1-6 glucosidic linkages. The  $K_m$  for dextranase was calculated to be  $3.55 \times 10^{-5}$  mol/L, and the  $V_{max}$  was  $4.29 \times 10^{-2}$  mol (Glu)/min · L. The enzyme activity was enhanced by  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ , and the low concentration of  $Cu^{2+}$  could improve the dextranase activity to 134.7%. However, the enzyme was strongly inhibited by  $Mn^{2+}$ . [ **Conclusion** ] We isolated a new strain F1001 producing high dextranase activity and the enzyme was stable. These results may provide an important basis for industrial applications.

**Keywords:** dextranase, *Penicillium aculeatum*, purification, enzyme property

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Yangtze River Science and Technology Joint Research Projects (10140702001) and by the National Innovative Experimental Design of Hefei University of Technology (CXSY10067)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel/Fax: +86-551-2901968; E-mail: zhb5678@163.com

Received: 15 December 2010/Revised: 20 January 2011