



# 一株产耐热右旋糖酐酶真菌的筛选、鉴定及其酶学性质

王蔷<sup>1,2</sup>, 张洪斌<sup>1\*</sup>, 张宇琪<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 合肥工业大学医学工程学院, 安徽 合肥 230009

<sup>2</sup> 安徽医学高等专科学校药理学系, 安徽 合肥 230601

**摘要:** 【目的】从土壤中筛选得到1株产耐热右旋糖酐酶的真菌。【方法】采用营养缺陷型培养基, 结合稀释涂布法和平板透明圈法分离筛选出产耐热右旋糖酐酶的菌株。通过观察菌落形态、菌体形态和培养特征, 结合ITS rDNA序列分析对菌株进行鉴定。研究菌株所产右旋糖酐酶的酶学性质。【结果】通过筛选得到1株产耐热右旋糖酐酶的菌株DG001, 经鉴定为淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)。菌株DG001所产右旋糖酐酶的最佳催化条件为55 °C, pH 5.0; 最适底物为5% Dextran T70。酶在60 °C以下和pH 4.0–7.0之间稳定。urea、Mn<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>对酶活均有促进作用, 低浓度的Mn<sup>2+</sup>和urea可使酶活分别提高到116.91%和110.14%, 而Cu<sup>2+</sup>则对其有强烈抑制作用。该酶水解右旋糖酐T2000的产物主要是异麦芽糖和异麦芽三糖, 被确定为内切右旋糖酐酶。酶对底物的亲和性随底物分子量的增加而增强。【结论】成功筛选获得1株产耐热右旋糖酐酶的菌株DG001, 所产酶在较宽温度范围内具有较高活力, 热稳定性好。该酶在制糖工业及不同分子量右旋糖酐的制备中具有很好的应用前景。

**关键词:** 耐热右旋糖酐酶, 淡紫拟青霉, 筛选, 鉴定, 酶学性质

右旋糖酐(Dextran)又名葡聚糖, 是一种具有右旋特性的多聚糖, 它是由葡萄糖基以 $\alpha$ -1,6糖苷键连接形成的大分子聚合物<sup>[1]</sup>。因为右旋糖酐分子中含有少量诸如 $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3或 $\alpha$ -1,4等其他糖苷键链接的分支结构<sup>[2]</sup>而呈现出显著的多样性, 主要表现在它的物理化学性质方面, 如溶解性和粘度等<sup>[3]</sup>。尽管右旋糖酐在生物医药、食品工业和石油工业等生物技术领域拥有广泛的应用前景, 但是它在制糖生产中却会引起诸多的负面影

响<sup>[4]</sup>, 例如影响糖分的回收, 蔗汁的澄清、蒸发和结晶速率, 以及糖产品的适用性等。糖厂处理右旋糖酐的方法有很多, 主要分为物理法和化学法, 物理法由于其技术要求比较高, 很难得到推广<sup>[5]</sup>, 而目前被广泛应用的化学方法则会使糖产品中残留化学试剂, 可能对人体造成危害, 也不是理想的方法。美国、日本、南非、澳大利亚和印度在20世纪60年代就已经开始研究在白糖生产中使用酶<sup>[6]</sup>, 通过酶制剂来去除糖液中的多

基金项目: 国家自然科学基金(81573399); 安徽省级质量工程项目(2015jxtd050); 安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2016A378)

\*通信作者。Tel: +86-551-62901968; E-mail: zhb5678@163.com

收稿日期: 2015-08-28; 修回日期: 2015-10-18; 网络出版日期: 2015-10-29

糖以提高糖产品的质量和产量,并取得了一定的效果。右旋糖酐酶就属于这类酶制剂,它是目前制糖工业中公认的消除右旋糖酐的最佳方法。

右旋糖酐酶(Dextranase, Dex)是一类能够催化水解右旋糖酐的生物催化剂。它能专一性水解 $\alpha$ -1,6糖苷键,使右旋糖酐分子降解为小分子的右旋糖酐、异麦芽糖、异麦芽三糖、葡萄糖以及极少量的多聚糖等<sup>[7]</sup>。右旋糖酐酶可由自然界中的微生物产生,目前已知的产酶真菌有青霉菌、酵母菌、曲霉菌、镰刀霉菌、细丽毛壳和申克孢子丝菌等,产酶细菌有链球菌、拟杆菌和假单胞菌等<sup>[8]</sup>。其产酶是需要诱导物的,诱导物的浓度、分子大小,以及分支情况对诱导微生物的产酶能力均有影响,最常见的诱导物是右旋糖酐、改良的底物酮基右旋糖酐<sup>[9]</sup>,此外还有异麦芽寡糖、异麦芽棕榈酸单脂和二胎等。右旋糖酐酶的应用非常广泛,它可以应用于啤酒酿造、药用右旋糖酐生产、龋齿防治和益生元(功能性异麦芽低聚糖)的制造等方面<sup>[10-13]</sup>。在制糖工业中,右旋糖酐酶可以降解右旋糖酐,用来防止制糖原料中“蔗饭”的产生,还可以消除制糖生产过程中因右旋糖酐的高粘性而带来的诸如影响糖分回收、限制糖产品适用性、损坏制糖设备等危害,而且效果显著,不会引入新的杂质,是非常绿色环保的方法。因为制糖工艺需要的温度较高,这就需要右旋糖酐酶具有较好的耐热性和热稳定性。本研究利用营养缺陷型培养基,从土壤中筛选到产耐热右旋糖酐酶的菌株,并对其酶学性质进行研究,为制糖生产工艺和蔗糖品质的提升提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 土样来源:** 10份土样主要采自安徽、江苏和广东等地的农田、果园、草地和森林等环境的植物根系土壤、腐殖质等。

**1.1.2 培养基:** (1) 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)(W/V): 20%马铃薯, 2%葡萄糖, 2%琼脂, 自然PH; (2) 筛选培养基(W/V): 1% 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, 0.05% KCl, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; (3) 基础发酵培养基(W/V): 1.5% Dextran, 0.5% Peptone, 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。

**1.1.3 主要仪器和试剂:** DNP-9082电热恒温培养箱(上海三发科学仪器有限公司); ZWY-100H恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司); XSP-C203光学显微镜(重庆光电); UV-1100紫外可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司); KDC-160HR高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司); 其他常用仪器。右旋糖酐T70、T40、T20(安徽六安华源药业); 右旋糖酐T2000(Pharmacia); 薄层层析硅胶板(青岛海洋化工厂分厂)。

### 1.2 耐热右旋糖酐酶产生菌的筛选

**1.2.1 产酶菌株的初筛:** 10倍梯度稀释法制备10<sup>-2</sup>-10<sup>-5</sup>的土壤悬液,分别涂布于筛选培养基上,分别倒置于30 °C和45 °C恒温培养箱培养4-6 d,筛选出能生长的菌株,转接至PDA培养基纯化至少3次,再采用快速透明圈筛选法<sup>[14]</sup>,观察菌落周围是否产生透明圈,能产生透明圈的即为产右旋糖酐酶菌株。

**1.2.2 产耐热酶菌株的复筛:** 将初筛的菌株进行发酵培养,发酵液经4 °C、8000 r/min离心10 min,去除菌体,上清液经无菌过滤(规格:  $\phi$  25 mm,孔径0.22  $\mu$ m的纤维素酯微孔滤膜),通过打孔法检测无菌发酵液分别在50、60、70 °C条件下能否产生透明圈,筛选出在高温下能够产生较大透明圈的菌株。

### 1.3 菌株的分类鉴定

**1.3.1 形态学鉴定:** 跟踪观察菌株在PDA培养基

上和发酵培养基中的菌落生长特征, 通过插片法观察显微镜下的菌体形态特征, 参考中国真菌志<sup>[15]</sup>鉴定菌株的种属。

**1.3.2 分子生物学鉴定:** 提取菌株基因组DNA送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行ITS rDNA测序, 将测得的序列输入GenBank, 利用BLAST程序与NCBI库中已知菌序列进行比较分析, 利用MEGA 4.1软件对菌株进行系统进化分析, 利用Neighbor-Joining法构建系统发育树<sup>[16]</sup>。

#### 1.4 右旋糖酐酶活力的测定

依据张洪斌<sup>[17]</sup>等使用的右旋糖酐酶的活力测定方法测定, 利用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法<sup>[18]</sup>测定酶反应生成的还原糖量, 并计算出酶活力。在最适反应条件下每小时产生1 mg还原糖(葡萄糖)所需要的酶量为一个酶活力单位(U)。

#### 1.5 右旋糖酐酶酶学性质研究

**1.5.1 最适反应温度及热稳定性:** 将经0.02 mol/L pH 5.0醋酸盐缓冲液适当稀释的酶液与3%的底物溶液混匀, 分别置于15–85 °C (5 °C为一个梯度)的温度条件下反应, 测定酶活力, 以活力最高者为100%, 考察酶的最适反应温度。将酶液置于25–70 °C (5 °C为一个梯度)条件下保温1 h后立即冰浴, 在最适反应温度下测定剩余酶活力; 同时, 将酶液分别存放于4 °C和55 °C下保藏, 每隔一定时间取样, 跟踪检测保藏过程中酶活力的变化, 考察酶的热稳定性。

**1.5.2 最适反应pH及pH稳定性:** 将酶液分别与0.02 mol/L、pH为4.0–9.0 (0.5为一个梯度)的缓冲溶液配制的浓度为3%的底物溶液反应, 以活力最高者为100%, 考察酶的最适反应pH。将酶液置于pH为4.0–9.0 (0.5为一个梯度)的缓冲溶液体系中, 4 °C下保存1h, 在最适反应pH下测定剩余酶活力, 考察酶的pH稳定性。

**1.5.3 金属离子及试剂对酶活力的影响:** 在0.02 mol/L pH 5.0的醋酸盐缓冲溶液中分别加入不同的

金属离子和试剂, 其最终浓度为0.001 mol/L, 在最适反应条件下反应后测定酶活力, 以未加金属离子和试剂的酶反应体系为100%标准对照, 计算相对酶活力, 考察不同金属离子及试剂对酶活的影响。

**1.5.4 动力学常数  $K_m$ 及  $V_{max}$ 的测定:** 将酶液分别与0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%和1.0%浓度的右旋糖酐T2000、T70和T40底物溶液反应6 min, 通过测定酶活力计算酶的反应初速度, 通过米氏方程的双倒数形式(Lineweaver-Burk plot)计算酶的 $K_m$ 及 $V_{max}$ 。

**1.5.5 酶解反应产物分析:** 将酶液与右旋糖酐T2000溶液在最适反应条件下反应, 分别于反应0.5、1.0、2.0和5.0 h时取样后立即沸水浴中终止反应, 采用TLC法分析反应液中的产物。空白对照为等比例灭活酶液与底物的混合物, 标准对照为同浓度的葡萄糖、异麦芽糖和异麦芽三糖标品溶液, 展开剂为: 正丁醇:乙酸:水=2:1:1(V/V/V), 显色剂为4 mL苯胺、4 g二苯胺、2 mL盐酸和20 mL 85%磷酸溶于200 mL丙酮中。

**1.5.6 酶的底物专一性及最适底物浓度:** 用0.02 mol/L pH 5.0的缓冲溶液将右旋糖酐T70分别配置成1%、3%、5%、7%和9%的底物溶液, 同时将不同糖类配置成5%的溶液, 在最适反应条件下反应后测定酶活力, 以酶活最高者为100%, 考察酶的底物专一性和最适底物浓度。

## 2 结果和分析

### 2.1 土样的筛选结果

对来自不同地区的10份土壤样品进行筛选, 在30 °C的培养温度下筛选得到1株真菌DG001, 经快速透明圈筛选法鉴定, 菌株DG001的菌落周围可产生明显的透明圈(图1-A)。经发酵培养, 其发酵上清液分别在50、60、70 °C条件下均能产生较大透明圈, 且60 °C以上形成的透明圈明显大于

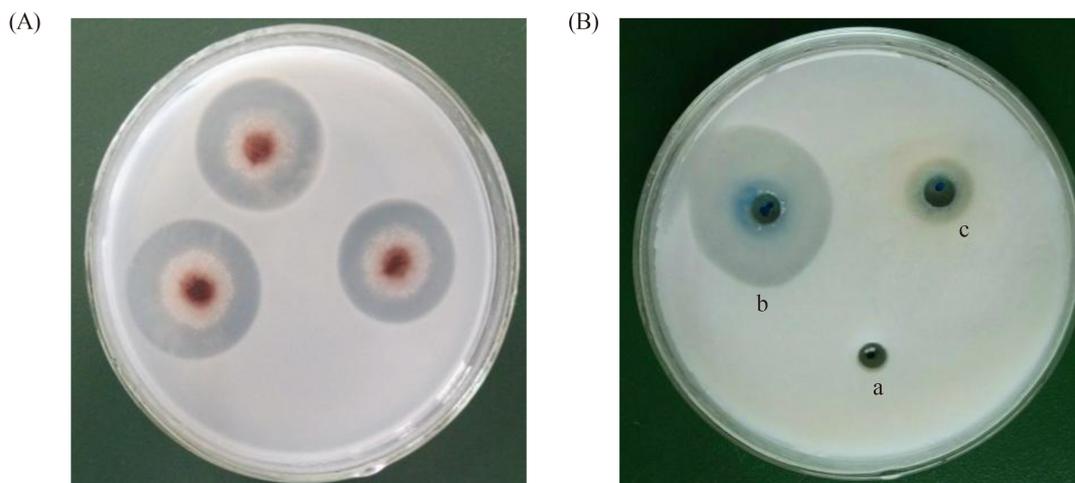


图 1. 透明圈法鉴定结果

Figure 1. The identification results of the transparent circle method. A: the transparent circle produced by strain DG001; B: enzyme activity at 60 °C. a: sterile water; b: DG001 dextranase; c: commercial dextranase.

商业右旋糖酐酶(图1-B)。通过DNS法测定该活性菌株发酵液在50 °C下与分子量为2000 kDa右旋糖酐溶液反应生成的还原糖量, 计算出其酶活力为85.4 U/mL。其活力比目前国内报道的野生黄绿青霉D5所产右旋糖酐酶在此温度下的酶活力(43.39 U/mL)要高近1倍<sup>[9]</sup>, 也比野生棘孢青霉所产右旋糖酐酶在最适条件下的酶活力(75 U/mL)要高<sup>[7]</sup>。

## 2.2 菌株的鉴定结果

30 °C下恒温培养菌株DG001, 跟踪观察其在PDA培养基上的生长情况。培养3 d时培养基上长出质地疏松的白色菌落, 外观似绒毛状, 背面为白色; 第4-5天开始菌落颜色变成肉粉色, 表面形成肉色细颗粒, 并随着时间延长而逐渐变深, 7 d后菌落中部隆起, 较为致密, 呈粉状、紫灰色。锥形瓶发酵培养3 d后, 发酵培养基中形成菌丝球, 瓶壁上形成少量白色生物膜, 培养基浑浊、呈乳白色, 培养7 d后瓶壁上形成一圈颜色较深的生物膜, 培养基颜色变深。在普通光学显微镜下观察, 菌丝有横隔, 分生孢子为单细胞, 呈椭圆形、链状, 直径为2-4 μm, 从气生菌丝处生出分生孢子梗, 其末端膨大, 孢梗上具有瓶颈状、不

规则的分支, 瓶梗基部较宽。通过对菌株进行ITS rDNA测序, 得到270 bp的目的DNA片段, 将该序列提交至GenBank上, 获得GenBank登陆号为KP941770。利用BLAST程序与NCBI库中已知菌序列进行同源性比较分析, 结果显示菌株DG001的270 bp的目的DNA片段与拟青霉属的淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)的同源性高达100%。利用MEGA 4.1软件将相似度在98%以上的已知菌与菌株进行聚类分析, 通过Neighbor-Joining法构建系统发育树, 结果见图2, 比较遗传距离, 菌株DG001与数据库中GenBank登录号为KJ862077.1、AB480689.1和KC478538.1在一个分支上, 表明它们的遗传距离最近。通过以上分析, 参照文献[15], 菌株DG001与淡紫拟青霉的培养特征和形态特征相符, 且其目的DNA序列与数据库中淡紫拟青霉相应序列的同源性高, 由此鉴定菌株DG001为淡紫拟青霉。

## 2.3 酶学性质的研究结果

**2.3.1 最适反应温度及热稳定性:** 测定右旋糖酐酶在不同温度下的酶活力, 其趋势见图3-A。图中显示该酶在45-60 °C之间的酶活力均在90%以

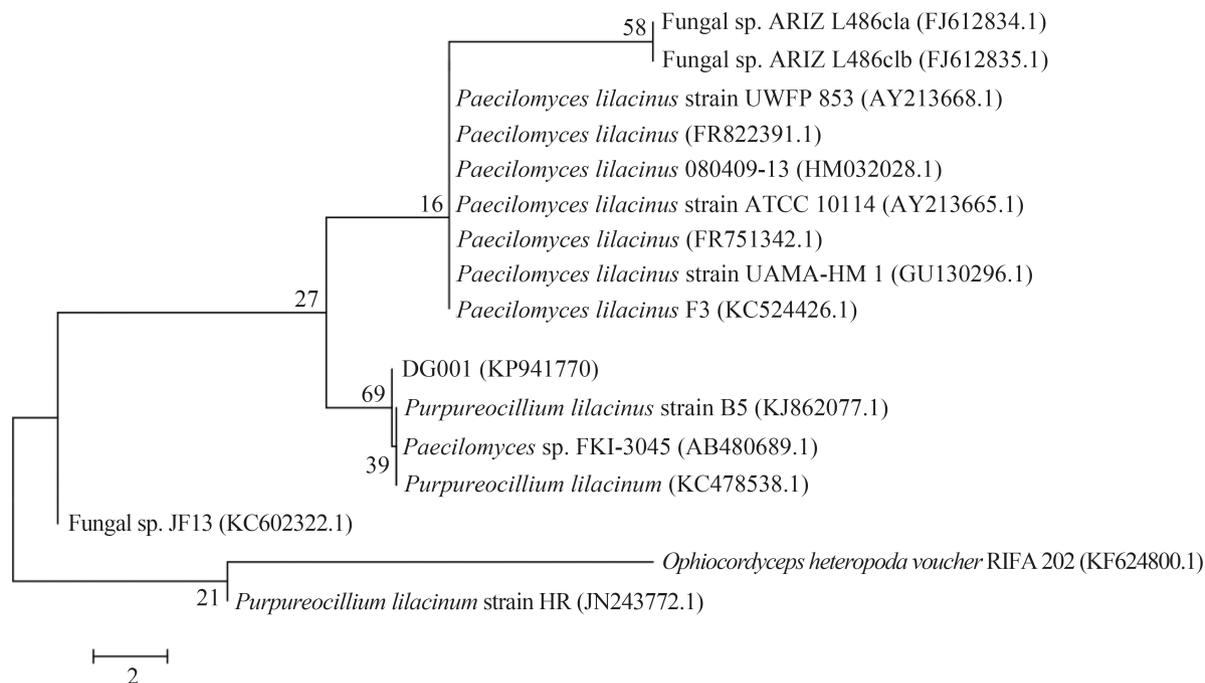


图 2. 菌株DG001的基于ITS rDNA序列同源性构建的系统发育树

Figure 2. Strain DG001 ITS rDNA sequence homology-based phylogenetic tree. The evolutionary distances were calculated by MEGA 4.1 software. Bar, 2 substitution per nucleotide. The figures for each branch point is the percentage supported by bootstrap. The numbers in parentheses represent the GenBank sequence accession number.

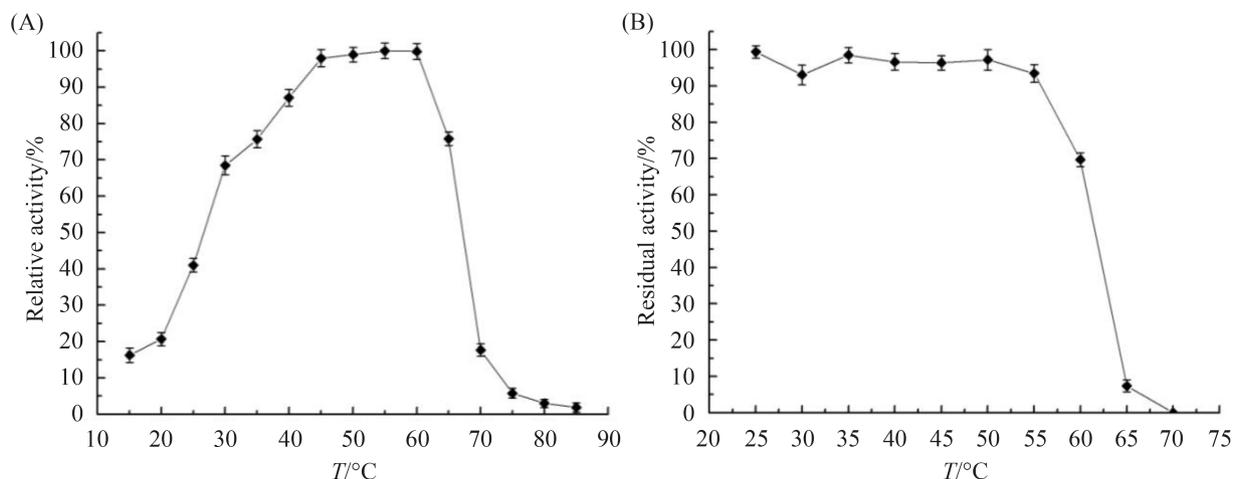


图 3. 温度对酶活力及酶稳定性的影响

Figure 3. Effect of temperature on the activity and stability of dextranase. A: dextranase activity; B: thermal stability.

上, 其最适反应温度为55 °C。图3-B显示了该酶在不同温度下保存1 h后的剩余酶活力, 酶在25–55 °C保温1 h后剩余酶活力均在93%以上, 当温度在65 °C以上保温1 h后, 该酶基本失去酶活

力, 表明该酶的热稳定性较好。将酶分别保藏于4 °C和55 °C下, 定时取样测量剩余酶活力, 其结果见表1, 该酶在4 °C下保藏28 d后剩余酶活力为89.8%, 可见该酶在低温4 °C下热稳定很好; 酶在

表 1. 温度、时间对酶活力稳定性的影响

Table 1. Effect of temperature and time on the stability of dextranase activity

$T/^\circ\text{C}$	$t/\text{d}$	Relative activity/%	$T/^\circ\text{C}$	Time	Relative activity/%
4	Control	100	55	Control	100
	1	99.10±0.33		2 h	99.60±0.21
	4	97.60±0.24		1 d	99.30±0.27
	7	95.20±0.22		2 d	86.10±0.19
	12	94.30±0.31		3 d	74.20±0.23
	18	93.50±0.28		5 d	61.80±0.45
	28	89.80±0.45		6 d	34.80±0.38

55 °C下保藏2 d剩余酶活力为86.1%，5 d后剩余活力仍然有61.8%，说明该酶在55 °C的高温下热稳定性较好。

**2.3.2 最适反应pH及pH稳定性：**测得右旋糖酐酶在不同pH下的酶活力，见图4-A，图中显示该酶催化反应的pH值范围较窄，其最适反应pH值为

5.0，当pH在6.0以上或4.5以下时，酶活力下降较快。该酶在pH 4.0–9.0下保存1 h后的剩余酶活力见图4-B，该酶在pH 4.0–7.0的条件下保存1 h后剩余活力均在80%以上，可见该酶在此pH值范围内稳定性较好，而从pH 7.0开始酶活力迅速下降，直到pH 9.0时酶活力仅剩40.4%。

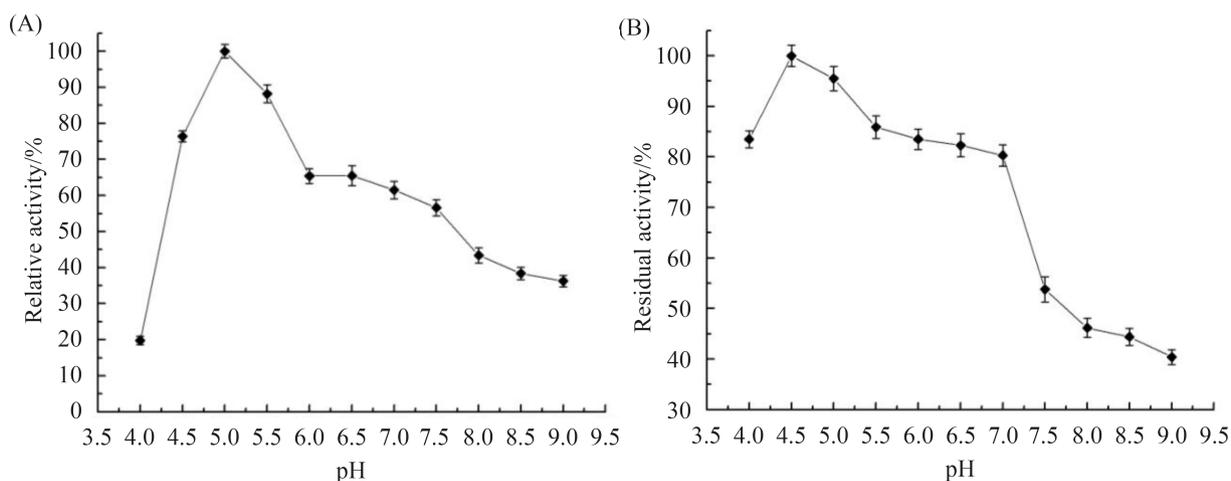


图 4. pH对酶活力及酶稳定性的影响

Figure 4. Effect of pH on the activity and stability of dextranase. A: dextranase activity; B: pH stability.

**2.3.3 金属离子及试剂对酶活力的影响：**测定右旋糖酐酶在7种金属离子及3种试剂的反应体系中的酶活力，结果见表2。表中数据显示，urea、 $\text{Mn}^{2+}$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 均对酶活力有促进作用，其中 $\text{Mn}^{2+}$ 的促进作用最强，可使酶活提高到116.91%。而其他金属离子及试剂对酶活均有着不同程度的抑制

作用，其中 $\text{Cu}^{2+}$ 的抑制作用最强烈，酶活力仅剩24.48%，tris和SDS的抑制作用次之， $\text{K}^+$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 的抑制作用则较弱。

**2.3.4 动力学常数 $K_m$ 及 $V_{max}$ 的测定：**将右旋糖酐酶分别与不同浓度的右旋糖酐T2000、T70和T40底物溶液反应6 min，计算酶的反应初速度，

绘制Lineweaver-Burk plot, 由此计算 $K_m$ 值和 $V_{max}$ 值, 见表3。表中数据表明, 该酶的 $K_m$ 值随右旋糖酐分子量的增加而减小, 这说明该酶对右旋

糖酐的亲合性随着右旋糖酐分子量的增加而增强, 这与吴定涛等<sup>[20]</sup>对哈茨木霉右旋糖酐酶的研究一致。

表 2. 金属离子和试剂对酶活力的影响

Table 2. Effect of metal ions and reagent on dextranase activity

Compounds and ion	Concentration/(mol/L)	Relative activity/%
Control	—	100
urea	0.001	110.14±0.14
tris	0.001	62.32±0.19
SDS	0.001	55.07±0.09
K <sup>+</sup>	0.001	82.29±0.15
Mn <sup>2+</sup>	0.001	116.91±0.29
Al <sup>3+</sup>	0.001	82.61±0.18
Cu <sup>2+</sup>	0.001	24.48±0.07
Fe <sup>2+</sup>	0.001	82.13±0.13
Ca <sup>2+</sup>	0.001	89.69±0.13
Mg <sup>2+</sup>	0.001	101.93±0.24

表 3. 酶的动力学参数

Table 3. Kinetic parameters of dextranase

Kinetic parameters	Dextran T2000	Dextran T70	Dextran T40
$K_m$ /(mol/L)	$3.54 \times 10^{-6}$	$1.05 \times 10^{-4}$	$5.05 \times 10^{-4}$
$V_{max}$ /[mol <sub>GLC</sub> /(L·min)]	$4.04 \times 10^{-2}$	$5.15 \times 10^{-2}$	$5.30 \times 10^{-2}$

**2.3.5 酶解反应产物的分析:** 用酶催化水解底物右旋糖酐T2000, 其薄层色谱分析结果见图5。该图表明, 当反应0.5 h时有异麦芽糖、异麦芽三糖和少量分子量大于三糖的物质生成; 随着反应时间的增加, 观察异麦芽糖、异麦芽三糖和分子量大于三糖物质的斑点, 异麦芽糖和异麦芽三糖生成量逐渐增加, 而分子量大于三糖的物质逐渐消失; 当反应2 h以后, 水解产物仅剩异麦芽糖和异麦芽三糖。观察点样处的斑点, 未被降解的大分子多糖随着反应时间的增长而逐渐变淡, 直至几乎完全水解。该酶的水解终产物主要是异麦芽糖和异麦芽三糖, 而并不产生葡萄糖, 由此判断该酶为内切右旋糖酐酶。

**2.3.6 酶的底物专一性及最适底物浓度:** 右旋糖酐酶与右旋糖酐T70、可溶性淀粉、 $\alpha$ -乳糖、 $\beta$ -环糊精、麦芽糖、琼脂糖、壳聚糖和蔗糖等底物作用的结果见表4。由表中数据可知, 该酶只能降解右旋糖酐中的 $\alpha$ -1,6糖苷键, 同时可以轻微作用于可溶性淀粉中的不连续 $\alpha$ -1,6糖苷键, 但是对 $\alpha$ -1,4、 $\beta$ -1,2和 $\beta$ -1,4等糖苷键没有降解能力, 这一性质类似于哈茨木霉右旋糖酐酶<sup>[20]</sup>。而该酶作用于右旋糖酐T70的最适底物浓度为5%。

### 3 讨论

由于制糖原料收获、存贮条件及生产工艺等

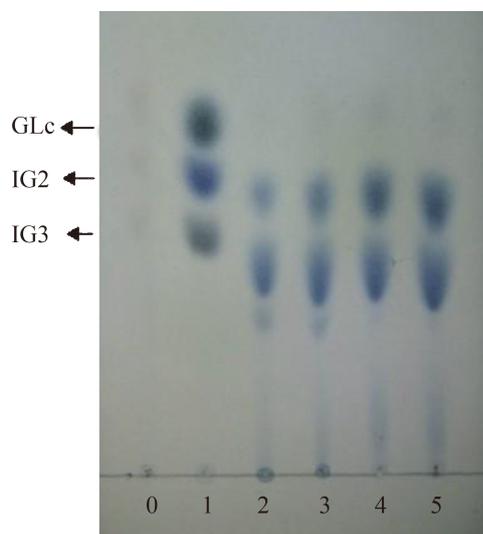


图 5. 酶解产物的薄层层析图谱

Figure 5. TLC pattern of hydrolysates. The dextran reacted at 55 °C, pH 5.0 conditions with dextran T2000 for different times (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 h). Lane 0: blank; lane 1: standard mixture (glucose, isomaltose and isomaltotriose); lane 2: 0.5 h; lane 3: 1.0 h; lane 4: 2.0 h; lane 5: 5.0 h.

原因, 在制糖生产中不可避免地受到右旋糖酐的危害, 故预防和消除右旋糖酐是制糖工艺的关键点。右旋糖酐酶是1种应用价值极高的生物制剂, 它具备安全、高效和环保等优点, 在食品、医药和化工等多种行业中有广泛的应用价值, 具有一定的社会和经济效益。总结国外的研究报道, 在制糖生产中使用右旋糖酐酶, 不仅能有效降解右旋糖酐, 还不会在糖产品中引入有害杂质, 因此近几年国内开始重视右旋糖酐酶的研究。根据右旋糖酐酶的作用位点可将酶分为内切右旋糖酐酶和外切右旋糖酐酶2种, 其中以内切方式水解右旋糖酐的Dex, 其作用的最适温度在20–60 °C之间, 最适pH在4–7之间, 属于保留型催化<sup>[2]</sup>。内切右旋糖酐酶产生菌比较多<sup>[8]</sup>, 常见的真菌有青霉菌和曲霉菌等, 细菌有芽孢杆菌和节杆菌等。而大多数真菌所产的右旋糖酐酶具有较好的稳定性, 应用价值比较高。

表 4. 酶对不同糖类底物的作用

Table 4. Action of dextranase on various carbohydrates

Substrates	Concentration	Main linkages	Relative activity%
Dextran T20	5%	$\alpha$ -1,6	74.67±0.84
Dextran T40	5%	$\alpha$ -1,6	81.14±0.49
Dextran T70	1%		63.70±0.61
	3%		91.64±0.57
	5%	$\alpha$ -1,6	100.00±0.41
	7%		98.75±0.64
	9%		98.04±0.53
Dextran T2000	5%	$\alpha$ -1,6	83.03±0.67
Soluble starch	5%	$\alpha$ -1,4 $\alpha$ -1,6	1.43±1.02
$\alpha$ -Lactose	5%	$\alpha$ -1,4	0
$\beta$ -Cyclodextrin	5%	$\alpha$ -1,4	0
Maltose	5%	$\alpha$ -1,4	0
Agarose	5%	$\beta$ -1,4	0
Chitosan	5%	$\beta$ -1,4	0
Sucrose	5%	$\beta$ -1,2	0

本文基于制糖生产工艺要求右旋糖酐酶需要具备较高耐热性和热稳定性的目标,利用营养缺陷型培养基,从土壤中筛选得到1株可产耐热右旋糖酐酶的活性菌株DG001,通过形态学观察,结合分子生物学鉴定结果,确定该菌株为淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)。目前,国内外已报道的右旋糖酐酶产生菌主要集中在真菌和细菌,少数是以节杆菌为主的放线菌,这些产生菌中以真菌的青霉菌数量为多<sup>[8]</sup>。而拟青霉菌也是较早被报道的来源菌之一,且多为淡紫拟青霉<sup>[9,21-22]</sup>。总结相关文献报道,此种菌来源的右旋糖酐酶具有较宽的反应温度范围和较好的热稳定性。本次筛选得到的菌株DG001也同样具有耐热性和热稳定性优势,且热稳定性更为优异。该淡紫拟青霉右旋糖酐酶在50 °C下对2000 kDa右旋糖酐的酶活力为85.4 U/mL,在野生菌株中属于产酶能力较好的。通过薄层色谱分析得知该酶催化水解右旋糖酐T2000的终产物主要是异麦芽糖和异麦芽三糖。结合底物专一性研究结果,该酶能降解连续的 $\alpha$ -1,6糖苷键,还可轻微降解可溶性淀粉中的不连续 $\alpha$ -1,6糖苷键,但不能降解 $\alpha$ -1,4、 $\beta$ -1,2和 $\beta$ -1,4等糖苷键,由此判断该酶为内切右旋糖酐酶,这与孙晋武等<sup>[22]</sup>报道的5株活性菌株所产酶,以及Suzuki等<sup>[23]</sup>报道的GH66家族的smDex的作用模式情况相似。该酶的最佳催化条件为55 °C, pH 5.0,与岑成福等<sup>[24]</sup>研究的右旋糖酐酶在除去蔗汁中右旋糖酐的最佳工艺条件相近,因此适合应用于制糖生产的压榨工段。该酶的热稳定好,特别是在4 °C下保存28 d仍能保持90%左右的酶活力,55 °C下的半衰期为5 d左右。有报道指出蔗汁中含有一些诸如钾、钙、镁的阳离子和氯化物、磷酸盐和硫酸盐的阴离子,会抑制右旋糖酐酶的活力<sup>[2]</sup>。经研究,低浓度的urea、 $Mn^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ 对酶活均有促进作用,其中 $Mn^{2+}$ 和urea可使酶活分别提高到116.91%和110.14%,这与吴定涛等<sup>[20]</sup>和Das等<sup>[21]</sup>研究的结果相反。而 $K^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Fe^{2+}$ 和 $Ca^{2+}$ 的抑制

作用较弱, $Cu^{2+}$ 则对该酶有强烈的抑制作用,能抑制将近76%的酶活力。该酶对底物右旋糖酐T2000、T70和T40的 $K_m$ 值分别为 $3.54 \times 10^{-6}$  L、 $1.05 \times 10^{-4}$ 和 $5.05 \times 10^{-4}$  mol/L,表明该酶对底物的亲和性随底物分子量的增加而增强<sup>[25]</sup>,这与本实验室近几年筛选得到的1株哈茨木霉<sup>[20]</sup>所产右旋糖酐酶相似,都具有优先降解大分子右旋糖酐的特性,该特性有利于中低分子量药用右旋糖酐的合成。

本研究成功获得1株可产耐热右旋糖酐酶的活性菌株,该酶在相对较宽的温度范围内具有较高的酶活力,且热稳定性较好,具有较高的应用研究价值。通过对该酶的酶学性质进行研究,为今后进一步研究酶在制糖工业中的应用提供了基础数据。下一步将对该酶的分离纯化及结构鉴定,以及发酵生产工艺进行探索研究。

## 参考文献

- [1] Khalikova E, Susi P, Korpela T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(2): 306-325.
- [2] Jiménez ER. Dextranase in sugar industry: a review. *Sugar Tech*, 2009, 11(2): 124-134.
- [3] Purushe S, Prakash D, Nawani NN, Dhakephalkar P, Kapadnis B. Biocatalytic potential of an alkalophilic and thermophilic dextranase as a remedial measure for dextran removal during sugar manufacture. *Bioresource Technology*, 2012, 115: 2-7.
- [4] Liang DF, Zeng LQ, Guo T, Yan MY, Yu L. Influence of dextran to sugar industry and their counter-measures. *Sugarcane and Canesugar*, 2008, (3): 28-33. (in Chinese)  
梁达奉, 曾练强, 郭亭, 严明奕, 余林. 葡聚糖对制糖工业的影响及对策(上). *甘蔗糖业*, 2008, (3): 28-33.
- [5] 贺湘.  $\alpha$ -葡聚糖酶在甘蔗制糖中的应用及其酶解体系特性研究. 华南理工大学硕士学位论文, 2012.
- [6] Huang JJ, Fan JH. The application of enzyme in cane juice clarification. *Sugarcane and Canesugar*, 2008, (2): 36-37, 47, 50. (in Chinese)  
黄俊杰, 范家恒. 酶在蔗汁澄清中的应用. *甘蔗糖业*, 2008, (2): 36-37, 47, 50.

- [7] 黎志德. 右旋糖酐酶纯化与表征. 广西大学硕士学位论文, 2013.
- [8] Zhang YQ, Zhang HB, Gan WW, Hu XQ. Research progress in dextranase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(5): 634-647. (in Chinese)  
张宇琪, 张洪斌, 甘微苇, 胡雪芹. 右旋糖酐酶研究进展. 生物工程学报, 2015, 31(5): 634-647.
- [9] Cheng XL, Sun JW, Yang J, Chen J, Zhang SZ. Conditions for dextranase formation by *Paecilomyces lilacinus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 1992, 32(5): 334-339. (in Chinese)  
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, 1992, 32(5): 334-339.
- [10] Yi FS. Application of glucosidase in beer brewing. *Liquor-Making Science & Technology*, 2006, (1): 82-83, 89. (in Chinese)  
易福生. 葡萄糖苷酶在啤酒酿造中的应用. 酿酒科技, 2006, (1): 82-83, 89.
- [11] Song DD, Zhang HB, Hu XQ, Guo JB. Enzymatic catalysis process to prepare dextran on purpose of replace acid hydrolytic. *Anhui Chemical Industry*, 2013, 39(5): 17-21. (in Chinese)  
宋丹丹, 张洪斌, 胡雪芹, 郭继彬. 酶解法替代酸解生产右旋糖酐的新工艺研究. 安徽化工, 2013, 39(5): 17-21.
- [12] Staat RH, Schachtele CF. Characterization of a dextranase produced by an oral strain of *Actinomyces israelii*. *Infection and Immunity*, 1975, 12(3): 556-563.
- [13] Ryu H, Jin XJ, Lee JH, Woo HJ, Kim YM, Kim GJ, Seo ES, Kang HK, Kim J, Cho DL, Kimura A, Kim D. Optimal expression and characterization of a fusion enzyme having dextranase and dextranase activities. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 47(5): 212-215.
- [14] Sun JW. Dextranase and its application. *Progress in Biotechnology*, 1986, (4): 26-32. (in Chinese)  
孙晋武. 右旋糖酐酶及其应用. 生物工程进展, 1986, (4): 26-32.
- [15] 梁宗琦. 中国真菌志(第43卷): 拟青霉属、棒束孢属、戴氏霉属. 北京: 科学出版社, 2013: 76-77.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [17] Zhang HB, Wu DT, Huang LJ, Hu XQ, Wang X. Purification, characterization of an extracellular dextranase from an isolated *Penicillium* sp.. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(4): 495-503. (in Chinese)  
张洪斌, 吴定涛, 黄丽君, 胡雪芹, 王旭. 一株产右旋糖酐酶青霉的分离及酶的纯化和性质. 微生物学报, 2011, 51(4): 495-503.
- [18] Eggleston G, Monge A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5): 1881-1894.
- [19] 岳晓婧. 右旋糖酐酶产生菌的筛选、鉴定及酶学性质研究. 安徽大学硕士学位论文, 2010.
- [20] Wu DT, Zhang HB, Huang LJ, Hu XQ. Purification and characterization of extracellular dextranase from a novel producer, *Hypocrea lixii* F1002, and its use in oligodextran production. *Process Biochemistry*, 2011, 46(10): 1942-1950.
- [21] Das DK, Dutta SK. Purification, biochemical characterization and mode of action of an extracellular endo-dextranase from the culture filtrate of *Penicillium lilacinum*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1996, 28(1): 107-113.
- [22] Sun JW, Cheng XL, Yan ZZ, Zhu MF, Zhang SZ. Screening of dextranase producing strains and comparison of their enzymatic properties. *Acta Microbiologica Sinica*, 1988, 28(1): 45-55. (in Chinese)  
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, 1988, 28(1): 45-55.
- [23] Suzuki N, Kim YM, Fujimoto Z, Momma M, Okuyama M, Mori H, Funane K, Kimura A. Structural elucidation of dextran degradation mechanism by *Streptococcus mutans* dextranase belonging to glycoside hydrolase family 66. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(24): 19916-19926.
- [24] Cen CF, Yi XM, Liang DF, Huang YN, Huang ZW, Huang HB, Lin RZ. Apply dextranase to hydrolyze dextrans in sugarcane juice. *Sugarcane and Canesugar*, 2013, (6): 12-18. (in Chinese)  
岑成福, 蚁细苗, 梁达奉, 黄玉南, 黄曾慰, 黄海波, 林荣珍. 酶解除去蔗汁中的右旋糖酐. 甘蔗糖业, 2013, (6): 12-18.
- [25] Tsuru D, Hiraoka N, Fukumoto J. Studies on mold dextranases. IV. Substrate specificity of *Aspergillus carneus* dextranase. *The Journal of Biochemistry*, 1972, 71(4): 653-660.

# Screening, identification and characterization of thermotolerant dextranase from a fungus

Qiang Wang<sup>1,2</sup>, Hongbin Zhang<sup>1\*</sup>, Yuqi Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Medical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, Anhui Province, China

<sup>2</sup> Department of Pharmacy, Anhui Medical College, Hefei 230601, Anhui Province, China

**Abstract:** [Objective] We attempted to obtain a fungus producing thermotolerant dextranase by screening samples from soil. [Methods] The fungus producing thermotolerant dextranase was isolated and screened by auxotrophic medium, combined with Pour Plate method and Flat Transparent Circle method. The strain was identified by its colony, cell morphology and cultural characteristics, as well as ITS rDNA sequence analysis. The dextranase produced by the strain was characterized. [Results] We obtained the strain DG001 producing thermotolerant dextranase, which was identified as *Paecilomyces lilacinus*. The optimum catalytic conditions for the dextranase were 55 °C, pH 5.0, and the optimum substrate concentration was 5% dextran T70. The dextranase was stable below 60 °C and between pH 4.0 and 7.0. Urea, Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> could increase enzyme activity, and the low concentration of Mn<sup>2+</sup> and Urea could increase enzyme activity to 116.91% and 110.14% respectively, whereas Cu<sup>2+</sup> had a strong inhibitory effect on the dextranase. The dextranase, identified as endo-dextranase, hydrolyzed dextran T2000 with main products as isomalt and isomaltotriose. The enzyme-substrate affinity increased with the increasing substrate molecular weight. [Conclusion] Strain DG001 producing thermotolerant dextranase was obtained through successful screening, bearing a high activity in a wide temperature range and a good thermal stability. This enzyme shows a promising prospect of application in sugar industry and in the preparation of different molecular weight dextran.

**Keywords:** thermotolerant dextranase, *Paecilomyces lilacinus*, screening, identification, characterization

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81573399) by the Anhui Provincial Quality Engineering Project (2015jxtd050), and by the Anhui University Natural Science Research Project Key Project (KJ2016A378)

\*Corresponding author. Tel: +86-551-62901968; E-mail: zhb5678@163.com

Received: 28 August 2015; Revised: 18 October 2015; Published online: 29 October 2015