

右旋糖酐酶酶学性质研究

问清江,慕娟,孙晓宇,丁浩
(陕西省微生物研究所,陕西 西安 710043)

摘要:右旋糖酐酶专一性水解右旋糖酐中的 α -1,6 糖苷键,使右旋糖酐高效水解为一定分子量的右旋糖酐用于医药等领域。右旋糖酐酶酶学性质研究表明,酶作用的最适 pH 和温度分别为 pH 5.0 和 55℃,最适底物浓度为 2%右旋糖酐;在 50℃ 以下相对稳定;在 pH 2.2~9.6 范围内相对稳定,具有良好的酸碱稳定性;酶对底物的亲和力随底物分子量的增加而增强; Mn^{2+} 具有显著的激活作用, Cu^{2+} 对酶具有较强抑制作用。
关键词:右旋糖酐酶;右旋糖酐;酶学性质

右旋糖酐酶(Dextranase,EC 3.2.1.11)属于糖苷水解酶,专一性裂解右旋糖酐(Dextran)分子中的 α -1,6 葡萄糖苷键,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、葡萄糖及少量的多聚糖。右旋糖酐酶可用于医药工业和食品工业,防治龋齿,酶解高分子右旋糖酐制造血浆代用品,在甘蔗制糖业中处理微生物发酵产生的大分子右旋糖酐而降低黏度增蔗糖产率^[1~3]。右旋糖酐(Dextran)是主要由葡萄糖 α -1,6 糖苷键连接而成的葡聚糖。是世界上第一个工业化生产的微生物多糖,也是美国 FDA 批准的第一种可用于食品和药品的微生物胞外多糖。由肠膜状明串珠菌(*Leuconstoc mesenteriodes*)产生的右旋糖酐蔗糖酶合成的右旋糖酐含有 95% 的 α -(1,6)糖苷键,同时含有少量其它糖苷键的分支结构^[4]。右旋糖酐具有安全、无毒等多种优点,被广泛应用于医药、食品等多个领域。临床上应用的常有 3 种规格产品:右旋糖酐 70、右旋糖酐 40、右旋糖酐 20,是目前公认的优良血浆代用品之一。具有增加血容量、改善微循环、防止弥散性血管内凝血的作用,主要用于治疗失血性休克^[5]。药用右旋糖酐传统生产工艺是盐酸水解高分子右旋糖酐得到不同分子量的右旋糖酐,水解效率低,而且引入氯离子产生大量的氯化物严重影响了右旋糖酐产品质量,容易产生不良反应。采用右旋糖酐酶水解右旋糖酐,专一性提高水解效率,水解条件温和,减少氯化物对产品品质的不良影响。对右旋糖酐酶进行酶学性质研究,为右旋糖酐的酶水解前期探究和技术储备。

1 材料和方法

- 1.1 材料
- 1.1.1 右旋糖酐酶(宁夏夏盛实业集团有限公司)。
- 1.1.2 右旋糖酐(自制)。
- 1.1.3 试剂 葡萄糖, Sigma 公司产品;3, 一二硝基水杨酸(DNS), 化学纯;其他试剂为市售分析纯。
- 1.1.4 仪器 752 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);HH-4A 电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司)。
- 1.2 方法
- 1.2.1 右旋糖酐酶的最适反应温度 适当稀释酶液,分别在 40、45、50、55、60、65℃ 反应温度下测定右旋糖酐酶活力,绘制最适温度曲线确定最适反应温度。
- 1.2.2 右旋糖酐酶的最适反应 pH 分别用 pH 3.0、3.6、4.0、4.6、5.0、5.6、6.0 缓冲液适当稀释酶液,并在相对应不同 pH 值条件下进行酶促反应,测定右旋糖酐酶活力,绘制最适 pH 曲线确定最适反应 pH。
- 1.2.3 右旋糖酐酶的最适反应底物浓度 分别在右旋糖酐浓度 0.2%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、3.0% 条件下进行酶促反应,测定右旋糖酐酶活力,绘制底物浓度曲线确定最适反应底物低浓度。
- 1.2.4 右旋糖酐酶的热稳定性 酶液分别在 45、50、55、60、65℃ 下放置 1 h,每隔 10 min 取样

收稿日期:2018-12-10 修回日期:2019-01-30
基金项目:2017 年陕西省社发项目(2017SF-315)。
第一作者简介:问清江(1966-),男,湖北沙市人。副研究员,主要从事微生物在医药、食品、农业及环保领域的应用研究。
通信作者:慕娟。

测定其残余活力,绘制右旋糖酐酶热稳定性曲线。

1.2.5 右旋糖酐酶的酸碱稳定性 分别用 pH2.2、3.0、5.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、9.6、10.0 的缓冲液适当稀释酶液,4℃放置 24 h,测定其残余酶活,绘制右旋糖酐酶酸碱稳定性曲线。

1.2.6 金属离子对右旋糖酐酶活力的影响 在适当稀释的酶液中分别加入 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} ,使酶促反应体系中金属离子浓度为 $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,测定右旋糖酐酶活力。

1.2.7 右旋糖酐酶底物特异性 分别以重均分子量 T-10、T-40、T-70、T-500、T-1000、T-10000 的右旋糖酐为底物进行酶促反应,测定右旋糖酐酶活力。

1.2.8 右旋糖酐酶活力的测定 采用 DNS 法测定右旋糖酐酶活力。配制 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖标准溶液,分别量取 0.3、0.35、0.4、0.45、0.5 mL 果糖标准溶液,用蒸馏水补齐 1 mL,再加入 2 mL DNS,沸水浴 2 min,流水冷却后加蒸馏水至 10 mL,在 540 nm 测定光吸收值,绘制葡萄糖标准曲线,得出回归方程用于葡萄糖和右旋糖酐酶活力测定。将酶液用一定 pH 值的缓冲液适当稀释后,取 0.5 mL 的酶液加入到 0.5 mL 1% 的右旋糖酐溶液中,50℃准确反应 10 min,加入 2 mL DNS 终止反应,沸水浴 2 min 显色,然后流水冷却至室温,定容至 10 mL;空白对照,0.5 mL 1% 的右旋糖酐溶液 50℃准确反应 10 min,先后加入 2 mL DNS 和 0.5 mL 的酶液,沸水浴 2 min 显色,然后流水冷却至室温,定容至 10 mL。以蒸馏水为对照测定 540 nm 的吸光值,样品和空白对照的吸光值之差根据回归方程得出反应液中的葡萄糖量,从而确定酶活。酶活力单位定义:在上述条件下,每分钟催化右旋糖酐产生 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 葡萄糖所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位 (IU)。

2 结果与分析

2.1 右旋糖酐酶的最适反应温度

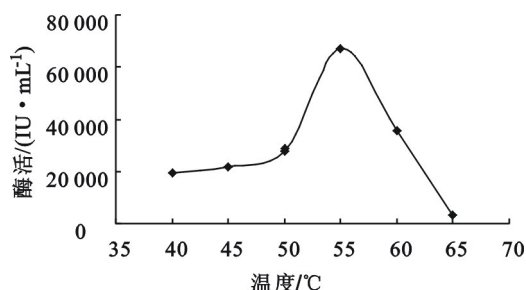


图 1 温度对右旋糖酐酶反应的影响

在 40、45、50、55、60、65℃不同温度条件下进行酶促反应,检测右旋糖酐酶活力,结果见图 1。从图 1 可以看出,随着温度的升高,由于反应速率的提高,右旋糖酐酶活力呈现增加趋势,55℃时酶活力最高;随后右旋糖酐酶活力出现降低趋势,与酶的热稳定性有关。该右旋糖酐酶的最适反应温度为 55℃。

2.2 右旋糖酐酶的最适反应 pH

在 pH 3.0、3.6、4.0、4.6、5.0、5.6、6.0 不同 pH 条件下进行酶促反应,检测右旋糖酐酶活力,结果见图 5。随着 pH 值的升高,右旋糖酐酶活力呈现增加趋势,pH 5.0 时酶活力最高;随后右旋糖酐酶活力出现降低趋势。该右旋糖酐蔗糖酶的最适反应温度为 pH 5.0。

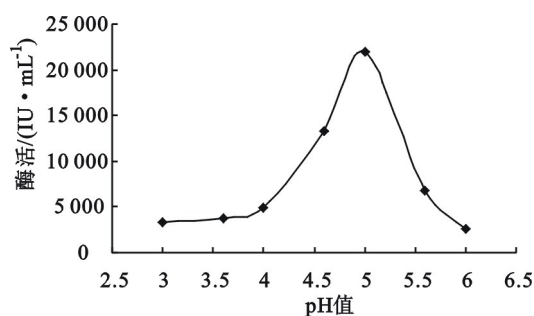


图 2 pH 对右旋糖酐酶反应的影响

2.3 右旋糖酐酶的最适反应底物浓度

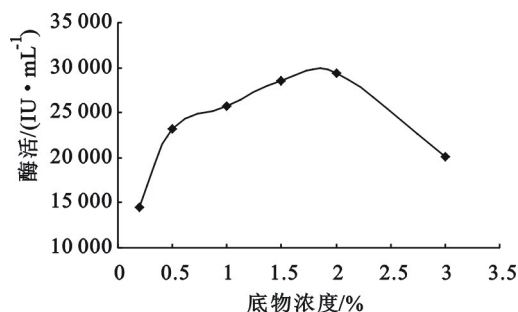


图 3 底物浓度对右旋糖酐酶作用的影响

以不同浓度的右旋糖酐为底物进行右旋糖酐酶的酶促反应,结果见图 3。随着右旋糖酐浓度的增加,右旋糖酐酶的活力增加,当右旋糖酐的浓度为 2% 时,酶的活力最高,随后底物浓度继续增加,而酶的活力降低。所以右旋糖酐酶水解右旋糖酐的最适底物浓度为 2%。

2.4 右旋糖酐酶的热稳定性

酶液分别在 45、50、55、60、65℃下放置 1h,每隔 10 min 取样测定其残余活力,未经处理酶活力为 100%,不同温度条件下,相对酶活随时间变化

见图 4。45℃和 50℃条件下,1h 右旋糖酐酶活力损失不大,相对酶活分别为 98%和 93%;55℃时,1 h 右旋糖酐酶相对酶活下降到 76%;60℃时,30 min 时酶活力急剧下降到 45%,1 h 右旋糖酐酶相对酶活下降到 29%;65℃时,20 min 时酶活力急剧下降到 27%。该右旋糖酐酶在 50℃以下相对稳定。

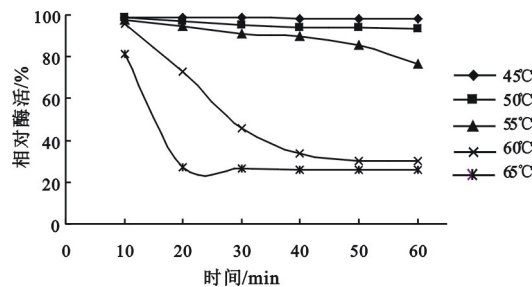


图 4 右旋糖酐酶的热稳定性

2.5 右旋糖酐酶的酸碱稳定性

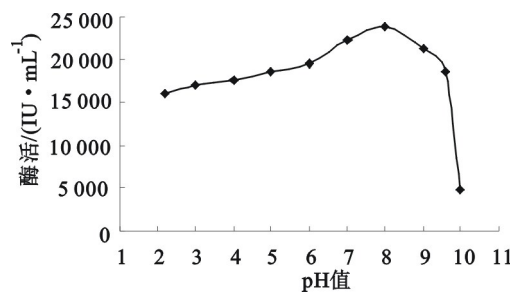


图 5 右旋糖酐酶的酸碱稳定性

将右旋糖酐酶液用不同 pH 缓冲液适当稀释,4℃放置 24 h,测定其残余酶活力,结果见图 5。酶液于 pH8.0 处理 24 h,检测出的酶活力最高,残余酶活 92%;pH 2.2 残余酶活 64%以上;pH 9.6 残余酶活 74%以上,之后右旋糖酐酶活力急速下降,pH 10.0 残余酶活仅剩 19%。结果说明,右旋糖酐酶在 pH 2.2~9.6 范围内相对稳定,具有较好的酸碱稳定性,在右旋糖酐酶的应用中具有相对宽泛的 pH 范围。

2.6 右旋糖酐酶底物特异性

以不同分子量的右旋糖酐作为底物进行右旋糖酐酶的酶促反应,结果见图 6。随着分子量的增大,右旋糖酐酶活力增加,也就是酶的亲和力随底物分子量的增加而增强。T-10 最小,T-40 和 T-70 相近,随后继续增大,T-10 000 亲和力最大,大大高于 T-1 000。右旋糖酐分子量的增大,单个葡聚糖分子的空间体积会上升,与酶蛋白分子结合的几率会增加,同时单个底物分子可进行切割的位点相应增加也会提高酶促反应的效率。这样有利于右旋糖酐酶降解制备低分子量的

右旋糖酐产品。

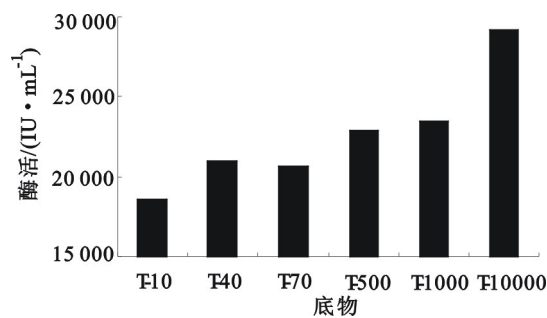


图 6 右旋糖酐酶底物特异性

2.7 金属离子对右旋糖酐蔗糖酶活力的影响

不同金属离子对右旋糖酐酶活性影响见表 1,对该酶具有激活作用金属离子是 Mn^{2+} 和 Ca^{2+} , Mn^{2+} 具有显著的激活作用, Ca^{2+} 有微弱的激活作用; Ba^{2+} 和 Mg^{2+} 基本不影响该右旋糖酐酶的作用;具有抑制性的离子顺序为 $Cu^{2+} > Fe^{3+} > Zn^{2+}$, Cu^{2+} 抑制作用最强,对该右旋糖酐酶的抑制力接近 40%。

表 1 金属离子对右旋糖酐酶活力的影响

金属离子	相对酶活/%
对照	100
Mn^{2+}	120.21
Ba^{2+}	100.04
Mg^{2+}	96.29
Ca^{2+}	105.55
Zn^{2+}	79.84
Cu^{2+}	61.00
Fe^{3+}	79.06

3 讨论

右旋糖酐酶是专一性地降解右旋糖酐中的 1,6—糖苷键,可以将肠膜状明串珠菌发酵产生的高分子右旋糖酐酶解为一定分子量分布的右旋糖酐,用于医药等行业。从温度对右旋糖酐酶作用影响曲线(图 1)可以看出,反应的最适温度为 55℃,在 55℃测出的酶活力远远高于其他温度,说明该右旋糖酐酶在 55℃反应速率最高;酶的热稳定性显示,50℃以下比较稳定,55℃就有明显的活力损失。因此在该右旋糖酐酶用于水解右旋糖酐的温度选择是时,既要考虑酶的最适反应温度,也要考虑它的耐热性。该右旋糖酐酶作用的最适 pH 为 pH 5.0,酶的酸碱稳定性研究表明:在 pH2.2~9.6 范围内相对稳定,具有良好的酸碱稳定性,在右旋糖酐酶的应用中具有宽泛的 pH