

海洋细菌 *Catenovulum* sp. DP03 两个右旋糖酐酶差异分析

田小鹏^{1,2}, 邓甜^{1,2}, 董冬雪^{1,2}, 祖航天^{1,2}, 吕明生^{*1,2,3}, 王淑军^{1,2,3}

(1. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005; 3. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222005)

摘要: 右旋糖酐酶是一类能够专一性水解右旋糖酐 α -(1,6) 糖苷键的糖苷水解酶, 在食品工业以及龋齿的防治方面都有着重要的应用, 其主要来源于微生物。提取海洋细菌 *Catenovulum* sp. DP03 的基因组并测序, 从中挖掘编码右旋糖酐酶的基因, 在大肠杆菌中进行异源表达, 并对重组右旋糖酐酶性质进行比较分析。海洋细菌 *Catenovulum* sp. DP03 中含有两个编码右旋糖酐酶的基因 *GL002870* 与 *GL002872*, 其大小分别为 2 511 bp 和 2 805 bp; 编码的蛋白质 Cadex2870 与 Cadex2872 的 3D 结构与 AoDex 的结构相似, AoDex 的催化区域 Q418-D440 分别对应 Cadex2870 的 Q431-D453 以及 Cadex2872 的 Q425-D447。Cadex2870 与 Cadex2872 的比酶活分别 16.2 U/mg 和 4 U/mg, 最适催化温度分别为 45 °C 与 30 °C, 最适催化 pH 分别为 7 和 8; Cadex2870 水解右旋糖酐的产物为异麦芽七糖、异麦芽五糖、异麦芽四糖以及少量异麦芽糖; Cadex2872 水解右旋糖酐的产物为异麦芽七糖、异麦芽五糖以及异麦芽四糖。证实海洋细菌 *Catenovulum* sp. DP03 中含有两个编码右旋糖酐酶的基因, 这两个右旋糖酐酶的蛋白质结构以及酶学性质均有差异。

关键词: *Catenovulum* sp. DP03; 右旋糖酐酶; 克隆表达

中图分类号: TS 202 文章编号: 1673-1689(2021)10-0072-10 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.10.010

Differential Analysis of Two Dextranases from Marine Bacterium *Catenovulum* sp. DP03

TIAN Xiaopeng^{1,2}, DENG Tian^{1,2}, DONG Dongxue^{1,2}, ZU Hangtian^{1,2},
LYU Mingsheng^{*1,2,3}, WANG Shujun^{2,3}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 3. Co-innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Dextranase can specifically hydrolyze the α -(1,6) glycosidic bond in dextran, and it has important applications in food industrial production and prevention of dental caries. It is mainly derived from microorganisms. The marine bacterium *Catenovulum* sp. DP03 was screened and the

收稿日期: 2020-09-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172154); 国家“十三五”重点研发计划项目(2018YFC0311106); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX19_1014)。

* 通信作者: 吕明生(1963—), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物技术方面的研究。E-mail: mingshenglu@hotmail.com

complete genome sequence was determined. The dextranase genes were cloned and heterologous expressed in *Escherichia coli*. Then the properties of recombinant dextranases were compared and analyzed. There were two dextranases genes found in DP03, i.e., GL002870 and GL002872 which were 2 511 bp and 2 805 bp, respectively. The 3D structure of Cadex2870 and Cadex2872 were similar to that of AoDex. The catalytic regions Q418-D440 of AoDex corresponded to Q431-D453 of Cadex2870 and Q425-D447 of Cadex2872, respectively. The enzyme activities of Cadex2870 and Cadex2872 were 16.2 U/mg and 4.0 U/mg, respectively. The optimum catalytic temperatures for Cadex2870 and Cadex2872 were 45 °C and 30 °C respectively and the optimum catalytic pH values were 7 and 8, respectively. The products of Cadex 2870 hydrolyzed dextran were maltoheptaose, maltopentaose, maltotetraose and a small amount of maltose. And the hydrolysates of Cadex2872 were maltoheptaose, maltopentose and maltotetraose. The marine bacterium *Catenovulum* sp. DP03 contained two genes encoding dextranase. The two dextranases were different in the protein structure and enzymatic properties.

Keyword: *Catenovulum* sp. DP03, dextranase, cloning and expression

右旋糖酐是一种以 α -D-吡喃葡萄糖为单体,通过葡萄糖苷键链接而形成的多聚糖^[1]。它是由某些细菌如肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、荚膜醋酸菌(*Acetobacter capsulatum*)等发酵将蔗糖转化合成而得到的,主要以 α -1,6-糖苷键链接,除此之外,一些支链还包含了 α -1,3-糖苷键与 α -1,4-糖苷键^[2-3]。

右旋糖酐酶(EC3.2.1.11)是一类能够专一性降解右旋糖酐中 α -1,6-糖苷键的糖苷水解酶,存在于糖苷水解酶(GH)家族 49 家族和 66 家族中,并且这两个家族序列间没有同源性^[4-5]。一般根据催化位点不同将右旋糖酐酶分为内切型右旋糖酐酶(Endodextranase)以及外切型右旋糖酐酶(Exodextranase)^[1]。外切型右旋糖酐酶主要切割右旋糖酐链的非还原端的 α -1,6-糖苷键,产生葡萄糖。内切型右旋糖酐酶主要从右旋糖酐的内部切割 α -1,6-糖苷键,产生葡萄糖、异麦芽糖以及一系列低聚异麦芽糖^[1,6]。目前所报道的右旋糖酐酶主要为内切型右旋糖酐酶。绝大多数内切型右旋糖酐酶只有在具有多个连贯的 α -1,6-糖苷键存在时才能发挥水解作用^[7]。

右旋糖酐酶在食品、化工以及医药等领域都有着非常广泛的应用^[8],且主要来源于微生物,其产生菌种类繁多,主要分为真菌类与细菌类^[9]。真菌所产生的右旋糖酐酶活性较高,稳定性较好,被广泛应用于工业生产中^[9]。但是,许多真菌如霉菌,除了少

数已经通过食药安全认证外,绝大多数的霉菌在发酵过程中还会伴随着复杂的次级代谢产物的产生,因而存在安全隐患,从而限制了它们的应用,尤其是在医药、食品等领域^[6,10]。相较于真菌,细菌的生长繁殖速度快,发酵时间短,产酶效率高。但是,来源于细菌的右旋糖酐酶普遍酶活较低,稳定性较差^[9]。已有一些研究者将目光转向了海洋细菌,海洋环境孕育着丰富的微生物资源,由于海洋环境的特殊性,来源于海洋微生物的右旋糖酐酶通常具有耐盐、耐碱、耐低温等特性,在工业生产中有很大的应用前景^[11-12]。

为了扩大海洋微生物右旋糖酐酶的应用价值,提高其利用率,作者以产右旋糖酐酶的海洋细菌 *Catenovulum* sp. DP03 为材料,完成了其全基因组测序,比较分析了来源于该菌株的两种右旋糖酐酶的性质及其水解右旋糖酐的产物,为海洋微生物的右旋糖酐酶的克隆表达与应用提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基

1)2216E 培养基 酵母粉 1 g/L,鱼粉蛋白胨 5 g/L,陈海水配制;pH 7.8;

2)LB 培养基 酵母粉 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,NaCl 5 g/L,蒸馏水配制;pH 7.4。

1.1.2 菌株与试剂

1) 菌株 *Catenovulum* sp. DP03 菌株: 作者所在实验室从海洋环境中筛选得到并保存^[13]; 大肠杆菌 DH5 α 与大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞: 购买自全式金生物科技有限公司; 大肠杆菌 pET29a: 作者所在实验室保存。

2) 试剂 DNA marker10000: 购自 Takara-宝日医生物技术(北京)有限公司; BCA 蛋白质质量浓度测定试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、高纯度质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒: 购自生工生物工程(上海)有限公司; Taq Plus DNA polymerase、限制性核酸内切酶 *Not* I 与 *Bgl* II: 购自 NEB(北京)有限公司; 其他试剂: 分析纯, 购自国药化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *Catenovulum* sp. DP03 基因组提取与全基因组测序 将保存于甘油管中的菌 *Catenovulum* sp. DP03 在 2216E 培养基中活化后, 使用细菌基因组提取试剂盒提取菌株的基因组, 经琼脂糖凝胶电泳检测后送至生工生物工程(上海)有限公司进行全基因组测序, 分析测序结果, 根据基因注释结果挖掘出其右旋糖酐酶基因序列及蛋白质序列, 并对该右旋糖酐酶的蛋白质进行生物信息学分析。

1.2.2 右旋糖酐酶基因克隆 根据右旋糖酐酶基因序列设计如下引物(表 1), 并使用 Taq Plus DNA polymerase 聚合酶连锁式反应(PCR)扩增目的基因; 使用琼脂糖凝胶检测并回收目的基因; 使用限制性核酸内切酶 *Not* I 与 *Bgl* II 同时酶切目的基因与 pET29a 质粒, 琼脂糖凝胶回收目的基因与 pET29a; 使用 Solution I 将目的基因与载体 pET29a 连接后转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 37 °C 过夜培养后挑选出阳性克隆, 送生工生物工程(上海)有限公司测序以验证克隆子的正确性。

表 1 引物

Table 1 Primers

引物名称	引物序列
2870F	GAAGATCTGGGCTGCTCAAGCAGCAGCTCGT
2870R	ATAAGAATGC'GGCCGCAATTTCGATTTTGTAAATTGATA
2872F	GAAGATCTGATGCTTTTATTAACCGGTTGTC
2872R	ATAAGAATGCGGCCGCATTACTTAACTCACCGGCTAT

1.2.3 重组右旋糖酐酶的表达 使用高纯度质粒提取试剂盒提取重组质粒, 取 1 μ L 重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 37 °C 过夜培养后挑单菌落于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 6~8 h, 使菌体 OD₆₀₀=0.6~0.8, 然后按 2% 接种体积分数接种于 100 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的新 LB 液体培养基中, 在 37 °C、180 r/min 培养 4~6 h, 使菌体 OD₆₀₀=0.6~0.8, 然后加入终浓度为 0.5 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, IPTG), 置于 18 °C、180 r/min 诱导表达 24 h 后, 离心收集细胞, 使用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS) 清洗细胞 3 次后加入 10 mL PBS 缓冲液悬浮细胞, 使用超声波细胞破碎仪破碎细胞壁, 得到重组右旋糖酐酶粗酶液。

1.2.4 重组右旋糖酐酶的纯化 根据重组右旋糖酐酶所带的 His 标签, 使用镍柱亲和层析的方法对粗酶液进行纯化, 分别使用含 20、50、70、100、150、200、250 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 咪唑, 使用 NaOH 溶液调节 pH 至 8, 并使用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌) 梯度洗脱, 并收集洗脱液, 然后使用 8 g/dL SDS-PAGE 电泳检测纯化效果, 并使用 BCA 蛋白质质量浓度测定试剂盒测定粗酶液及各洗脱液的蛋白质质量浓度, 同时使用 DNS 法测定其右旋糖酐酶活力。

1.2.5 右旋糖酐酶活力测定 使用 DNS 法测定右旋糖酐酶活力, 方法如下: 在一定的温度与 pH 条件下, 将 20 μ L 酶液与 180 μ L 质量分数 3% 右旋糖酐 T70 反应一定时间后, 在反应体系中加入 200 μ L DNS 终止反应, 沸水浴 5 min, 加入 3 mL 蒸馏水进行稀释, 取 200 μ L 于 96 孔板中, 使用酶标仪读取 540 nm 处的吸光值, 测定其还原糖生成量(以不同质量浓度葡萄糖做标准曲线)。以先加入 DNS 终止反应后再加入酶液作为对照组, 其他与实验组相同。酶活力单位定义(U)为上述反应条件下, 每分钟释放 1 μ mol 葡萄糖所需的酶量^[14]。

1.2.6 重组右旋糖酐酶最适催化温度及 pH 以 3% 右旋糖酐 T70(pH 7) 为底物, 分别在 20、25、30、35、40、45、50 °C 下测定重组右旋糖酐酶活力, 并计算其酶活力。然后分别配制 50 mmol/L 不同 pH(乙酸-乙酸钠, pH 4.0~5.0; 磷酸盐, pH 6.0~7.5; Tris-HCl, pH 8.0~9.0; 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液: pH 10) 的缓冲液, 然后用不同缓冲液配制 3% 右旋糖酐 T70

为底物, 分别在最适温度下测定右旋糖酐酶活力, 并计算其酶活力。所有试验均设 3 个平行。

1.2.7 重组右旋糖酐酶水解右旋糖酐产物分析
将重组右旋糖酐酶 Cadex2870 和 Cadex2872 与 3% 右旋糖酐 T70 (pH 7) 分别在 45 ℃ 和 30 ℃ 下反应 0.5、2、6、24 h, 沸水浴 1 min 灭活, 然后 1 000 r/min 离心 1 min, 取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤。首先, 各取 0.5 μL 反应液进行薄层层析(TLC)分析该右旋糖酐酶水解右旋糖酐 T70 产物, 展开剂为: 5 mL 正丙醇、2 mL 乙酸乙酯、8 mL 乙腈、1 mL 乙酸、4.5 mL 去离子水; 显色剂为: 0.2 g 地衣酚、10 mL 浓硫酸、80 mL 无水乙醇、10 mL 去离子水; 85 ℃ 下显色 5 min。其次, 使用高效液相色谱(HPLC)分析 2 h 与 6 h 的产物, 以葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖以及麦芽七糖标准品为对照。色谱条件: 色谱柱为 Waters sugar-Pak1 (300 mm×6.5 mm), 流动相为去离子水, 流速为 0.4 mL/min, 柱温为 75 ℃, 进样量为 20 μL。使用 Empower GPC 软件进行数据采集和处理, 计算各产物的峰面积。

2 实验结果

2.1 *Catenovulum* sp. DP03 全基因组测序分析

通过 Illumina Hiseq4000 平台测序, *Catenovulum* sp. DP03 基因组基本信息见表 2。基于测序数据组装得到样品 DP03 基因组大小为 4 417 646 bp, GC 含量 40.95%, 共 231 个拼接, 451 个重叠群。基因组组分分析后发现, 样品 DP03 的基因组含有 3 801 个基因, 总长度为 3 881 685 bp, 平均长度 1 021 bp, 占基因组全长的 88.50%。基因组串联重复序列共 144 个, 总长度为 16 943 bp, 占基因组全长的 0.3863%。小卫星序列 76 个, 微卫星序列 27 个, tRNA 60 个, rRNA 2 个。

经碳水化合物酶专门数据库 (Carbohydrate-Active enZymes Database, CAZy) 数据库分析, *Catenovulum* sp. DP03 基因组中含有糖苷水解酶 131 个, 占比 42.1%, 包括 α-木聚糖酶、α-葡糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、聚半乳糖醛酸酶、β-半乳糖苷酶、蔗糖磷酸化酶、1,4-α-葡聚糖分支酶 GlgB、淀粉蔗糖酶、α-淀粉酶、果聚糖酶以及右旋糖酐酶等。糖苷转移酶 57 个, 糖水化合物脂酶 51 个, 碳水化合物结合模块 45 个, 多糖裂解酶 14 个, 以及辅助模块的酶 13 个, 见图 1。

表 2 *Catenovulum* sp. DP03 基因组信息统计

Table 2 Information of *Catenovulum* sp. DP03 DNA

类目	数量
基因组大小/bp	4 417 646
GC 含量/%	40.95
拼接	231
重叠群	451
基因/个	3 801
基因总长/bp	3 881 685
基因总长比例/%	88.5
串联重复序列	144
串联重复序列总长/bp	16 943
串联重复序列比例/%	0.386 3
tRNA	60
rRNA	2
小卫星序列	76
微卫星序列	27

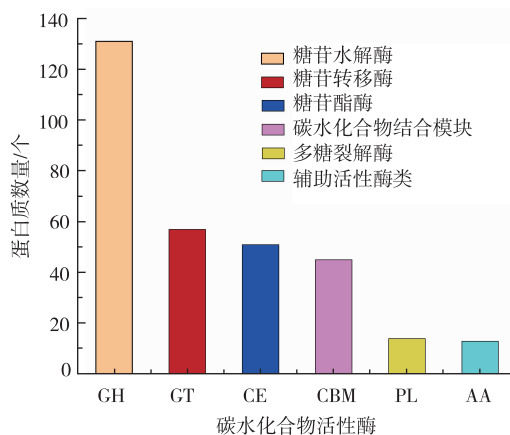


图 1 *Catenovulum* sp. DP03 基因功能注释 CAZy 图

Fig. 1 Gene function annotation by CAZy of *Catenovulum* sp. DP03

2.2 右旋糖酐酶蛋白质序列生物信息学分析

根据基因组注释结果, *Catenovulum* sp. DP03 中含有两个右旋糖酐酶基因, 基因编号分别为 GL002870 与 GL002872 (对应编码的蛋白质分别称为 Cadex2870 与 Cadex2872)。如表 3 所示, GL002870 基因大小为 2 511 bp, GL002872 基因大小为 2 805 bp, 分别编码 836 个氨基酸与 935 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量大小分别为 92 100 与 103 200, 等电点分别为 pI 4.43 与 pI 4.33, 酸性氨基酸残基总数分别为 104 与 106, 碱性氨基酸残基总数分别为 52 与 46, 疏水性总平均值 (GRAVYA) 分别为 -0.416 与 -0.377, 所以这两种蛋白质均为酸性、

亲水性蛋白质。根据 SOPMA 对其二级结构进行预测,在 Cadex2870 的二级结构中,9.45%为 α 螺旋结构 (Alpha helix,h),32.30%为扩展长链 (Extended strand,e),6.82%为 β 转角结构 (Beta turn,t),51.44%为无规则卷曲结构;在 Cadex2872 的二级结构中,8.02%为 α 螺旋结构,32.73%为扩展长链,6.20%为 β 转角结构,53.05%为无规则卷曲结构。Cadex2870 与 Cadex2872 都属于糖苷水解酶 GH49 家族。Cadex2870 与 Cadex2872 的蛋白质序列与已报道的右旋糖酐酶蛋白质序列相似度比较低。在构建的系统发育树中,Cadex2870 与 Cadex2872 聚为一支,然后与 *Cellvibrio* sp. KY-YJ-3 (WP 151055493.1)聚为一支,Cadex2870 和 Cadex2872 序列与其序列相似性分别为 49.6%和 47.9%,见图 2。

表 3 Cadex2870 与 Cadex2872 生物信息学分析
Table 3 Bioinformatics analysis of Cadex2870 and Cadex2872

项目	GL002870	GL002872
氨基酸大小	836 AA	935 AA
相对分子质量大小	92 100	103 200
糖苷水解酶家族	GH49	GH49
等电点	4.43	4.33
酸性氨基酸残基 (Asp+Glu)	104	106
碱性氨基酸残基 (Arg+Lys)	52	46
疏水性平均值 (GRAVY)	-0.416	-0.377
α -螺旋结构 (Alpha helix,h)	9.45%	8.02%
扩展长链 (Extended strand,e)	32.30%	32.73%
β -转角结构 (Beta turn,t)	6.82%	6.20%
无规则卷曲结构 (Random coil,c)	51.44%	53.05%

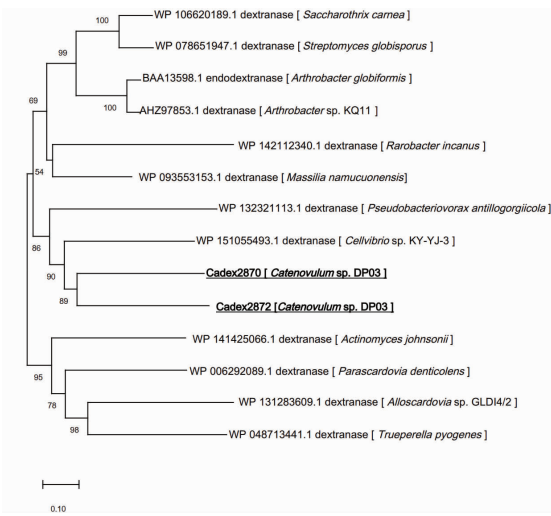


图 2 Cadex2870 与 Cadex2872 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of Cadex2870 and Cadex2872

使用 SWISS-MODEL 以 AoDex (*Arthrobacter oxidans* KQ11) 为模板进行三维同源建模, Cadex2870 与 Cadex2872 的整体结构与 AoDex 的结构整体相似,其相似性分别为 54.53%与 53.66%,但是在一些片层与环区中仍存在一些差异,见图 3,其氨基酸序列比对结果见图 4。

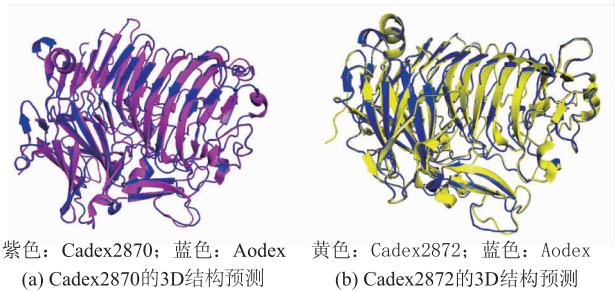


图 3 右旋糖酐酶 Cadex2870 和 Cadex2872 同源建模与 AoDex 的结构比较

Fig. 3 Comparison between AoDex and Cadex2870 / Cadex2872

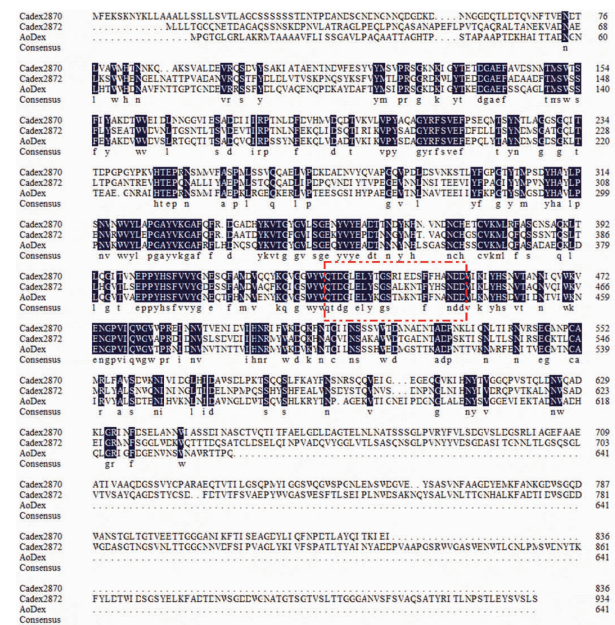


图 4 Cadex2870、Cadex2872 与 AoDex 氨基酸序列比对
Fig. 4 Sequences blast of Cadex2870, Cadex2872 and AoDex amino

2.3 重组右旋糖酐酶的纯化

根据重组右旋糖酐酶所带的 His 标签,经镍柱亲和层析纯化后,测其不同梯度洗脱液中的蛋白质浓度与右旋糖酐酶活力,并进行 8 g/dL 的 SDS-PAGE 电泳检测,结果见图 5。其相对分子质量大小

与经氨基酸序列推测出的相对分子质量大小一致。在镍柱纯化过程中,低浓度咪唑(20~70 mmol/L)能洗脱出非特异性结合蛋白质;而目的蛋白质需要高浓度的咪唑(150~250 mmol/L)才能被洗脱下来。重

组右旋糖酐酶 Cadex2870 与 Cadex2872 经镍柱纯化之后分别被纯化了 20.5 倍与 9.7 倍,得率分别为 76.7%与 62.8%,纯化之后右旋糖酐酶活力分别为 16.2 U/mg 与 4.0 U/mg,见表 4。

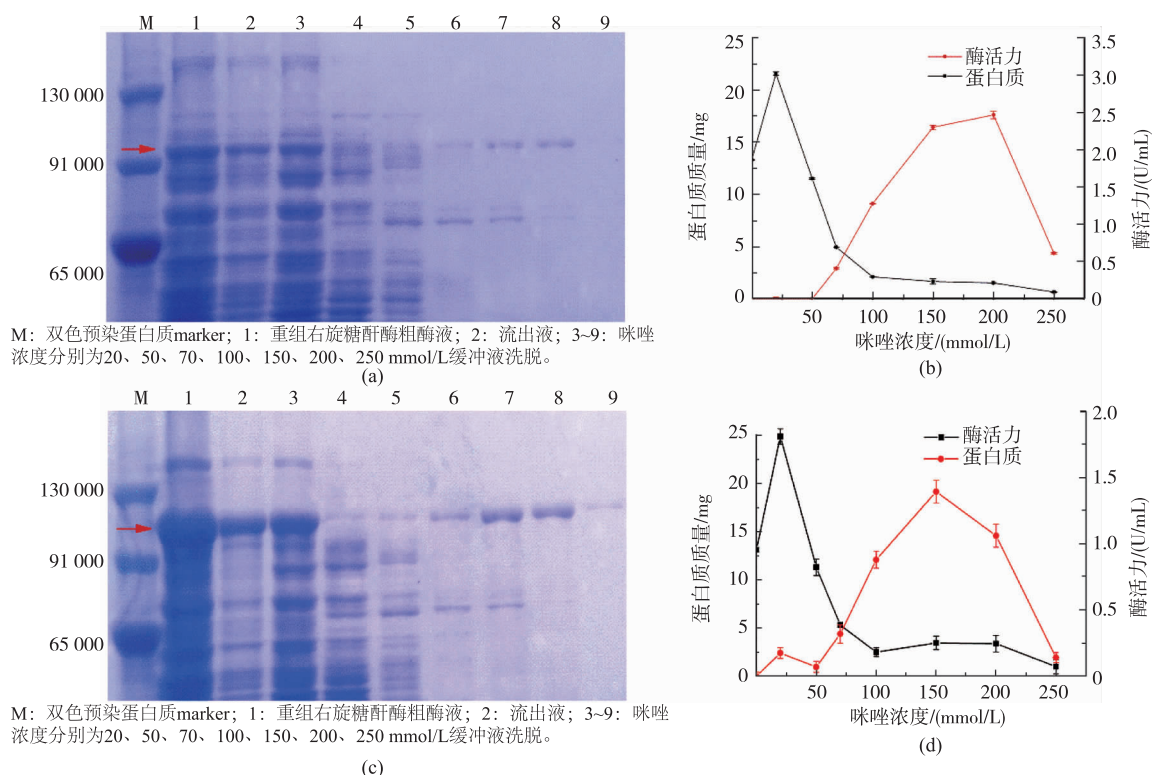


图 5 重组右旋糖酐酶 Cadex2870(a)和 Cadex2872(c)经镍柱纯化的电泳图以及不同浓度咪唑洗脱与蛋白质浓度和酶活力 Cadex2870(b)和 Cadex2872(d)的关系

Fig. 5 Purification of the recombinant dextranase Cadex2870 (a) and Cadex2872 (c) by Ni-column and the relationship between concentration of imidazole with protein and activity of dextranase Cadex2870 (b) and Cadex2872 (d)

表 4 重组右旋糖酐酶的纯化

Table 4 Purification of recombinant dextranase

右旋糖酐酶	纯化方式	蛋白质质量/mg	酶活/(U/mL)	比酶活/(U/mg)	纯化倍数	得率/%
Cadex2870	粗酶液	40.5	32.1	0.8	1.0	100.0
	镍柱纯化	1.5	24.6	16.2	20.5	76.7
Cadex2872	粗酶液	53.5	22.2	0.4	1.0	100.0
	镍柱纯化	3.5	13.9	4.0	9.7	62.8

2.4 温度及 pH 对重组右旋糖酐酶活性的影响

如图 6(a)所示, Cadex2870 的最适催化温度为 45 ℃, Cadex2872 的最适催化温度为 30 ℃, 在 35~50 ℃范围内, Cadex2870 的活性要高于 Cadex2872 的活性; 在 20~30 ℃范围内, Cadex2872 的活性高于 Cadex2870 的活性。如图 6(b)所示, Cadex2870 与

Cadex2872 的最适催化 pH 分别为 8 和 7, 并且在 pH 6~9 范围内都具有良好的催化效率, 而 Cadex2872 催化范围相比于 Cadex2870 的催化范围较广, 并且在较酸/碱性条件下催化效率要高于 Cadex2870。

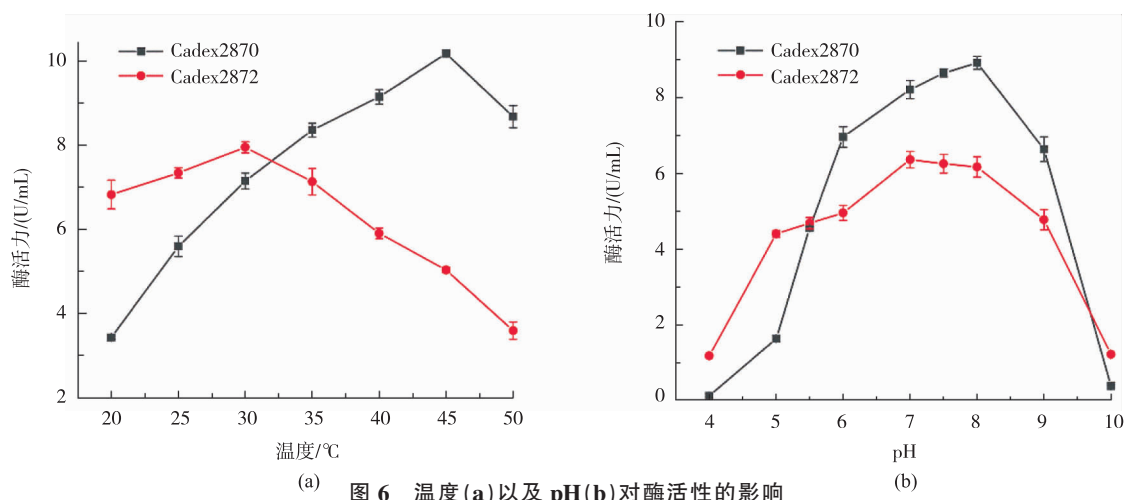
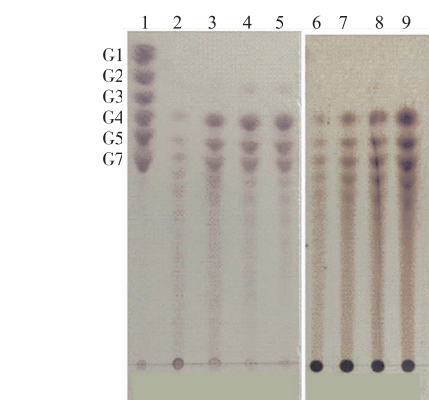


Fig. 6 Effect of temperature(a) and pH(b) on dextranase

2.5 重组右旋糖酐酶水解右旋糖酐产物分析

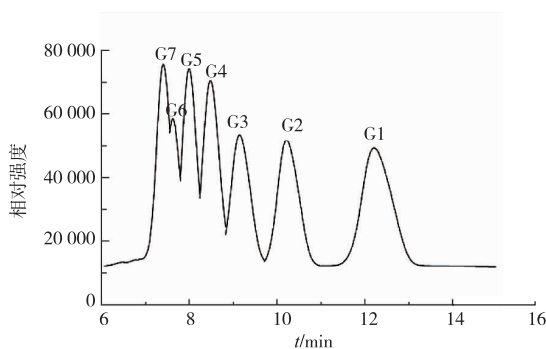
如图 7 和表 5 所示, 重组右旋糖酐酶 Cadex2870 与 Cadex2872 水解右旋糖酐 T70 的产物主要为异麦芽七糖、异麦芽五糖以及异麦芽四糖,

其中, 当水解时间延长时, Cadex2870 水解右旋糖酐的产物还伴随有少量的异麦芽糖产生, 并且异麦芽四糖的量要高于其他寡糖的量。

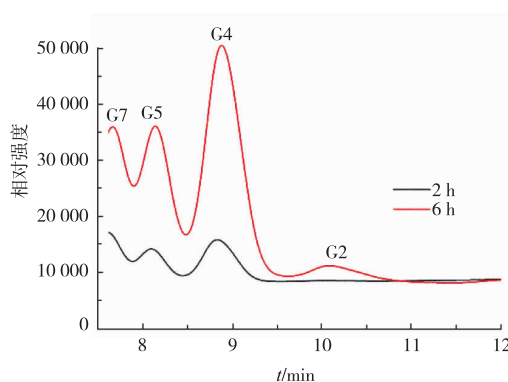


1: 标准品 (G1~G7: 葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖。); 2~5: Cadex2870 与右旋糖酐 T70 分别反应 0.5、2、6、24 h; 6~9: Cadex2872 与右旋糖酐 T70 分别反应 0.5、2、6、24 h。

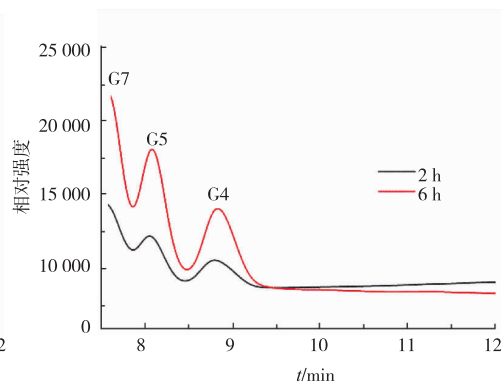
(a) TLC 分析



(b) 标准品 HPLC 分析



(c) Cadex2870 与右旋糖酐 T70 分别反应 2 h 与 6 h



(d) Cadex2872 与右旋糖酐 T70 分别反应 2 h 与 6 h

图 7 重组右旋糖酐酶水解右旋糖酐 T70 产物分析

Fig. 7 Products analysis of recombinant dextranases hydrolyzed dextran T70

表 5 重组右旋糖酐酶水解右旋糖酐 T70 产物质量分数
Table 5 Content of sugar in hydrolysates after enzymatic hydrolysis of dextran by recombinant dextranase

右旋糖酐酶	水解时间/h	水解产物质量分数/%			
		G7	G5	G4	G2
Cadex2870	2	7.6	5.4	8.2	0
	6	14.3	17.4	30.6	3.7
Cadex2872	2	7.6	4.9	3.7	0
	6	11.1	9.1	7.2	0

3 讨论

对海洋细菌 *Catenovulum* sp. DP03 的全基因组进行了测序,从其基因组中挖掘到两个右旋糖酐酶基因。目前,已有少数的右旋糖酐酶的蛋白质晶体结构已被成功解析,并上传至 Protein Data Bank (PDB)数据库中,包括来源于 *Streptococcus mutans* 的右旋糖酐酶 SmDex^[15]、*Thermoanaerobacter pseudethanolicus* 的右旋糖酐酶 TpDex^[16]、*Penicillium minioluteum* 的右旋糖酐酶 Dex49A^[4]以及海洋细菌 *Arthrobacter oxydans* KQ11 的右旋糖酐酶 AoDex^[17]。以海洋细菌 *A. oxydans* KQ11 的右旋糖酐酶 AoDex 为模板进行三维同源建模,Cadex2870 与 Cadex2872 的整体结构与 AoDex 的结构整体相似,在其 N 端与 C 端各有一个结构域,AoDex 的催化区域为 Q418-D440,分别对应 Cadex2870 的 Q431-D453 以及 Cadex2872 的 Q425-D447,且在催化位点处具有高度保守性;AoDex 中的 Asp439 与 Asp420 分别为催化酸和碱,分别对应 Cadex2870 的 Asp433 和 Asp452,以及 Cadex2872 的 Asp427 和 Asp446 (图 4,红色虚线方框内)。

Cadex2870 的最适催化温度为 45 ℃, Cadex2872 的最适催化温度为 30 ℃,在低温下, Cadex2872 催化效率更高,这与一些冷适应性酶性质相似,例如冷适应的 β -卡拉胶酶、冷适应的 β -葡萄糖苷酶以及冷适应的 β -淀粉酶等等,他们在低温下具有更高的活性^[18-20]。Cadex2870 与 Cadex2872 的最适催化 pH 分别为 8 和 7,并且在 pH 6~9 范围内都具有良好的催化效率,而 Cadex2872 催化范围相比于 Cadex2870 的催化范围较广,并且在较酸/碱性条件下催化效率要高于 Cadex2870。陆源微生物所产的右旋糖酐酶绝大多数最适催化温度都在 45~65 ℃,最适催化 pH 在 5.0~6.5,并且在低温条件下催化效

率较低^[21-24]。该两种重组右旋糖酐酶在较低温度下具有更高的活性,并且 pH 作用范围广,因此,该酶在工业应用中具有更高的价值。例如,在低温或者室温条件下的生产过程中,无须加热或者冷却,从而降低生产的成本;还可通过温和的热处理使酶失活,从而快速终止反应^[25]。另外,该酶的最适作用温度与 pH 条件接近人的口腔环境,将该酶作为口腔牙菌斑的防治药物具有潜在价值。并且越来越多的证据表明,碱的产生在 pH 稳态中起着重要作用,pH 稳态可能调节龋病的发生和发展^[26-27]。因此,该右旋糖酐酶在用于开发新的海洋药物来治疗这种情况具有重要意义。

Cadex2870 与 Cadex2872 水解右旋糖酐 T70 的产物主要为异麦芽七糖、异麦芽五糖以及异麦芽四糖,当水解时间延长时,Cadex2870 水解右旋糖酐的产物还伴随有少量的异麦芽糖产生,该两种重组右旋糖酐酶与目前所报道的绝大多数右旋糖酐酶的性质相似,他们催化水解右旋糖酐主要产生异麦芽寡糖,而葡萄糖的含量很低或者没有,这类右旋糖酐酶被鉴定为内切型右旋糖酐酶,他们从右旋糖酐的内部水解 α -1,6-糖苷键^[28-32]。目前所报道的右旋糖酐酶绝大多数都属于内切型右旋糖酐酶,其能够水解右旋糖酐产生异麦芽寡糖,具有很好的应用价值。异麦芽寡糖不会被人体和动物消化吸收,但是能够被肠道的有益微生物双歧杆菌所利用,促使双歧杆菌增殖,但肠道内其他有害微生物如大肠杆菌、金色葡萄球菌则不能利用此糖,从而抑制了肠道有害微生物的生长,使肠道内微生态向良性循环调整。如维持肠道正常细菌群平衡,抑制病原菌与腐败菌生长,维持肠道正常功能;降低胆固醇水平,防治高血压;增强人体免疫功能;双歧杆菌还具有抗肿瘤活性^[33-35]。异麦芽寡糖还具有甜度低、难以被胃酶消化,不会改变血液中胰岛素水平,也不会增加血糖等特点,所以糖尿病患者可放心食用^[33,36]。除此之外,异麦芽寡糖不会被口腔链球菌利用,因而能够防止龋齿^[32-33]。因此,利用该两种重组右旋糖酐酶水解右旋糖酐产生一系列异麦芽寡糖,在生产益生元等功能性食品方面具有很好的前景。

4 结语

从海洋细菌 *Catenovulum* sp. DP03 的全基因组中挖掘出两个右旋糖酐酶基因,其中 GL002870 基

因大小为 2 511 bp, 编码 836 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量大小为 92 100, 等电点为 pI 4.43; GL002872 基因大小为 2 805 bp, 编码 935 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量大小为 103 200, 等电点为 pI 4.33, 都属于酸性、亲水性蛋白质。在 Cadex2870 的二级结构中, 9.45% 为 α 螺旋结构, 32.30% 为扩展长链, 6.82% 为 β 转角结构, 51.44% 为无规则卷曲结构; 在 Cadex2872 的二级结构中, 8.02% 为 α 螺旋结构, 32.73% 为扩展长链, 6.20% 为 β 转角结构, 53.05% 为无规则卷曲结构。Cadex2870 与 Cadex2872 都属于糖苷水解酶 GH49 家族, 在系统发育树中, Cadex2870 与 Cadex2872 聚为一支, 然后与 *Cellvibrio* sp. KY-YJ-3 聚为一支。Cadex2870 与 Cadex2872 的 3D 结构与 AoDex 的结构整体相似,

其相似性分别为 54.53% 与 53.66%, AoDex 的催化区域为 Q418-D440, 分别对应 Cadex2870 的 Q431-D453 以及 Cadex2870 的 Q425-D447, 且在催化位点处具有高度保守性。将 Cadex2870 与 Cadex2872 基因克隆表达后, 得到纯化的 Cadex2870 的酶活力为 16.2 U/mg, Cadex2872 的酶活力为 4 U/mg, 分别被纯化了 20.5 与 9.7 倍, 得率分别为 76.7% 与 62.8%。Cadex2870 与 Cadex2872 的最适催化温度分别为 45 $^{\circ}\text{C}$ 与 30 $^{\circ}\text{C}$, 最适催化 pH 分别为 7 和 8; Cadex2870 水解右旋糖酐的产物为异麦芽七糖、异麦芽五糖、异麦芽四糖以及少量异麦芽糖; Cadex2872 水解右旋糖酐的产物为异麦芽七糖、异麦芽五糖以及异麦芽四糖, 所以, 这两种右旋糖酐酶均属于内切型右旋糖酐酶。

参考文献:

- [1] KHALIKOVA E, SUSI P, KORPELA T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications[J]. **Microbiology & Molecular Biology Reviews**, 2005, 69(2): 306-325.
- [2] 常国炜, 梁达奉, 张九花, 等. 发酵耦合酶解高效制备右旋糖酐工艺研究[J]. 广西科学, 2014, 21(6): 619-623.
- [3] 邹青松, 浦媛媛, 王晓, 等. 酶法合成右旋糖酐及过程调控研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(12): 100-104.
- [4] LARSSON A M, ANDERSSON R, STAHLBERG J, et al. Dextranase from *Penicillium minioluteum*: reaction course, crystal structure, and product complex[J]. **Structure**, 2003, 11(9): 1111-1121.
- [5] KIM Y M, KISO Y, MURAKI T, et al. Novel dextranase catalyzing cycloisomaltooligosaccharide formation and identification of catalytic amino acids and their functions using chemical rescue approach[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2012, 287(24): 19927-19935.
- [6] 张宇琪. 右旋糖酐酶研究进展[J]. 生物工程学报, 2015, 31(5): 634-647.
- [7] WALKER G J, PULKOWNIK A. Action of α -1,6-glucan glucohydrolase on oligosaccharides derived from dextran[J]. **Carbohydrate Research**, 1974, 36(1): 53-66.
- [8] 常国炜, 黄曾慰, 黎志德, 等. 右旋糖酐酶开发及应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2019, 35(6): 196-204.
- [9] 王蕾, 张洪斌, 张宇琪. 一株产耐热右旋糖酐酶真菌的筛选、鉴定及其酶学性质[J]. 微生物学报, 2016, 56(5): 880-890.
- [10] 吴敏, 张宇馨, 胡雪芹, 等. 棘孢青霉右旋糖酐酶基因克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 食品科学, 2016, 56(18): 73-80.
- [11] JIAO Y L, WANG S J, LV M S, et al. Characterization of a marine-derived dextranase and its application to the prevention of dental caries[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2013, 41(1): 17-26.
- [12] WANG D L, Lu M S, WANG S J, et al. Purification and characterization of a novel marine *Arthrobacter oxydans* KQ11 dextranase[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2014, 106: 71-76.
- [13] WANG Q, ZHANG H, ZHANG Y. Screening, identification and characterization of thermotolerant dextranase from a fungus[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2016, 56(5): 880-890.
- [14] 李卫娟. 可降解牙菌斑生物膜氧化节杆菌右旋糖苷酶的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [15] SUZUKI N, KIM Y M, FUJIMOTO Z, et al. Structural elucidation of dextran degradation mechanism by *Streptococcus mutans* dextranase belonging to glycoside hydrolase family 66[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2012, 287(24): 19916-19926.
- [16] NOBUHIRO S, NAOMI K, ZUI F, et al. Crystal structure of thermophilic dextranase from *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* [J]. **Journal of Biochemistry** 2016, 159(3): 331-339.
- [17] REN W, LIU L, GU L, et al. Crystal structure of GH49 dextranase from *Arthrobacter oxydans* KQ11: the identification of catalytic

- base and the improvement of thermostability using semi-rational design based on B-factors[J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 2019, 67(15): 4355 - 4366.
- [18] MING S L, FANG Y W, LI H, et al. Isolation of a novel cold-adapted amylase-producing bacterium and study of its enzyme production conditions[J]. **Annals of Microbiology**, 2010, 60(3): 557-563.
- [19] LI S, HAO J, SUM M. Cloning and characterization of a new cold-adapted and thermo-tolerant ι -carrageenase from marine bacterium *Flavobacterium* sp. YS-80-122[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017, 102: 1059-1065.
- [20] CRESPIE E, ZANPHORLIN L M, SOUZA F H M, et al. A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1 β -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015, 82: 375-380.
- [21] KOSARIC N, YU K, ZAJIC J E, et al. Dextranase production from *Penicillium funiculosum*[J]. **Biotechnology & Bioengineering**, 2010, 15(4): 729-741.
- [22] GALVEZ M A, LOPEZ MUNGUIN A. Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 1991, 36(3): 327-331.
- [23] FRANK H, ROLF D, GERHARD G. Isolation of a new *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain (FH1) producing a thermostable dextranase[J]. **Journal of General & Applied Microbiology**, 2001, 47(4): 187-192.
- [24] YANG L, ZHOU N, TIAN Y. Characterization and application of dextranase produced by *Chaetomium globosum* mutant through combined application of atmospheric and room temperature plasma and ethyl methyl sulfone[J]. **Process Biochemistry**, 2019, 85: 116-124.
- [25] 莫意平, 娄永江, 吴祖芳. 海洋微生物低温酶特性及其在食品工业中的应用[J]. **食品研究与开发**, 2004, 25(4): 105-107.
- [26] MAJEED A, GROBLER S, MOOLA M. The pH of various tooth-whitening products on the South African market[J]. **Tydskrif Van Die Suid Afrikaanse Tandheelkundige Vereniging**, 2011, 66(6): 278-281.
- [27] HUANG X, ZHANG K, DENG M, et al. Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria[J]. **Archives of Oral Biology**, 2017, 82: 256-262.
- [28] TSURU D, HIRAOKA N, FUKUMOTO J. Studies on mold dextranases. IV. Substrate specificity of *Aspergillus carneus* dextranase[J]. **Journal of Biochemistry**, 1972, 71(4): 653-660.
- [29] SUGIURAC M, ITO A. Studies on Dextranase. III. Action patterns of dextranase from *Penicillium funiculosum* on substrate and inhibition on hydrolysis reaction by substrate analogues[J]. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 1974, 22(7): 1593-1599.
- [30] MUNKELC F, WEFERS D. Fine structures of different dextrans assessed by isolation and characterization of endo-dextranase liberated isomalto-oligosaccharides[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2019, 215: 296-306.
- [31] HUANG S X, HOU D Z, QI P X, et al. Enzymatic synthesis of non-digestible oligosaccharide catalyzed by dextranase and dextranase from maltose acceptor reaction[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2020, 523(3): 651-657.
- [32] LIU H F, REN W, LYU M S, et al. Characterization of an alkaline GH49 dextranase from marine bacterium *Arthrobacter oxydans* KQ11 and its application in the preparation of isomalto-oligosaccharide[J]. **Marine Drugs**, 2019, 17(8): 479.
- [33] 王良东. 低聚异麦芽糖性质、功能、生产和应用[J]. **粮食与油脂**, 2008, 144(4): 43-47.
- [34] SORNDECH W, NAKORN K N, TONGTA S, et al. Isomalto-oligosaccharides: Recent insights in production technology and their use for food and medical applications[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2018, 95: 135-142.
- [35] SUBHAN F B, HASHEMI Z, ARCHUNDIA H M C, et al. Ingestion of isomalto-oligosaccharides stimulates insulin and incretin hormone secretion in healthy adults[J]. **Journal of Functional Foods**, 2020, 65: 103730.
- [36] WU Y, PAN L, SHANG Q H, et al. Effects of isomalto-oligosaccharides as potential prebiotics on performance, immune function and gut microbiota in weaned pigs[J]. **Animal Feed Science and Technology**, 2017, 230: 126-135.