

# $\alpha$ -葡聚糖酶及其在国内制糖工业中的应用研究进展\*

## Research of $\alpha$ -Dextranase and Its Application in Domestic Sugar Industry

梁达奉<sup>1,2\*\*</sup>, 马步<sup>1</sup>, 柳颖<sup>2</sup>, 梁逸<sup>1</sup>, 曾练强<sup>2</sup>, 黄曾慰<sup>2</sup>, 黄玉南<sup>2</sup>, 林荣珍<sup>1</sup>

LIANG Da-feng<sup>1,2</sup>, MA Bu<sup>1</sup>, LIU Ying<sup>2</sup>, LIANG Yi<sup>1</sup>, ZENG Lian-qiang<sup>2</sup>, HUANG Zeng-wei<sup>2</sup>, HUANG Yu-nan<sup>2</sup>, LIN Rong-zhen<sup>1</sup>

(1. 广西农垦糖业集团股份有限公司, 广西糖业研发中心, 广西南宁 530002; 2. 广州甘蔗糖业研究所, 广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室, 广东广州 510316)

(1. Guangxi State Farms Sugar Industrial Group Company Limited, Guangxi Sugarcane Industry R&D Center, Nanning, Guangxi, 530002, China; 2. Guangdong Key Lab of Sugarcane Improvement & Biorefinery, Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou, Guangdong, 510316, China)

**摘要:**制糖工艺过程出现的葡聚糖主要为 $\alpha$ -葡聚糖,它的存在会使糖汁糖分损失,糖液粘度增大,糖液过滤性降低,晶体伸长,这不但增加精炼成本,同时也严重影响产品品质。糖浆澄清仅能除去约20%的 $\alpha$ -葡聚糖,而利用 $\alpha$ -葡聚糖酶水解 $\alpha$ -葡聚糖是一种理想的方法。本文综述 $\alpha$ -葡聚糖酶及其在国内制炼糖厂的应用研究进展,并对该研究领域进行展望。基因工程技术和蛋白质定向进化技术在提高 $\alpha$ -葡聚糖酶酶活、热稳定性、增强底物特异性等方面发挥着重要作用,将成为今后的研究热点。

**关键词:** $\alpha$ -葡聚糖酶  $\alpha$ -葡聚糖 制糖 研究 应用

**中图分类号:**TS244 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2014)06-0606-04

**Abstract:** $\alpha$ -Dextran is one of the glucans which causes marked harmful impact on sugar production. The presence of dextran in sugar juice will lead to severe sugar loss, increased viscosity of the sugar flow, reduced filter syrup, elongated crystals, expensive yield loss, and declined quality of sugar. Syrup clarification could only remove about 20% of the  $\alpha$ -dextran. Use dextranase to hydrolyze  $\alpha$ -dextran is an ideal method. This paper reviewed the developments status of  $\alpha$ -dextranase and its application research in domestic sugar industry, and prospected the future picture of this field. Gene engineering and protein directed evolution techniques will play an important role in improving  $\alpha$ -dextranase activity, thermal stability and substrate specificity, and become the research hotspot in the future.

**Key words:**dextranase, dextran, sugar production, research, application

收稿日期:2014-10-15

修回日期:2014-11-17

作者简介:梁达奉(1964-),男,博士,教授级高级工程师,八桂学者,主要从事制糖生物技术研究。

\* 八桂学者建设工程专项经费项目和现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-20-4-5)资助。

\*\* 通讯作者。

葡聚糖是以葡萄糖为单体的聚合物总称,制糖工艺过程出现的葡聚糖主要为高分子粘性多糖: $\alpha$ -葡聚糖,又名右旋糖酐,由 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖单体构成,可由细菌发酵蔗糖产生<sup>[1]</sup>。 $\alpha$ -葡聚糖的产生从甘蔗田间就已经开始,甘蔗的品种、砍运、存放时间及其工艺过程等都会对 $\alpha$ -葡聚糖的形成产生影响<sup>[2]</sup>。 $\alpha$ -葡聚糖会引起蔗汁糖分损失,明显增大糖液的粘度,降低糖液的过滤性,使蔗糖结晶时生成异常形态的晶体,

这不但增加精炼成本,同时也严重影响糖的品质。鉴于 $\alpha$ -葡聚糖的严重危害,近年来各国制定了多项严格的标准,以控制原糖中 $\alpha$ -葡聚糖的含量。目前国际标准要求,原糖中所含 $\alpha$ -葡聚糖量的应低于250 ppm,对于精糖要求最高值不能大于20 ppm。如何应对 $\alpha$ -葡聚糖的危害已经成为国内外制糖业者和科研人员共同关注的课题。

传统制糖工艺过程糖浆在蒸发浓缩时部分形成悬浮物,将其澄清可除去约20%的 $\alpha$ -葡聚糖。而原糖中 $\alpha$ -葡聚糖80%存在于晶体内部,通过蜜洗也无法将其去除,对炼糖不利。去除 $\alpha$ -葡聚糖的方法还包裹透析分离法、超滤法、反渗透法等,在美国的糖厂有一些试用,其缺点是技术成本较高,所以并没有得到广泛的推广。

$\alpha$ -葡聚糖酶( $\alpha$ -D-1,6-glucan-6-glucanohydrolase; EC 3.2.1.11)能够随机水解 $\alpha$ -葡聚糖中的 $\alpha$ -1,6-糖苷键<sup>[3]</sup>,将 $\alpha$ -葡聚糖酶应用于蔗汁澄清, $\alpha$ -葡聚糖去除率超过90%,而应用于炼糖生产时,原糖糖浆中 $\alpha$ -葡聚糖去除率可达95%。 $\alpha$ -葡聚糖酶特异性水解 $\alpha$ -葡聚糖的能力使其在制糖工艺中显示出广阔的应用前景。

## 1 $\alpha$ -葡聚糖酶的研究

1969年,Tilbury首先提出在制糖过程使用 $\alpha$ -葡聚糖酶,随后Phizer Chemicals公司生产了Glucanase D-1,并将其应用于混合汁中水解高浓度 $\alpha$ -葡聚糖。1972年,Inkerman等在澳大利亚的糖厂应用 $\alpha$ -葡聚糖酶。1986年,Miles Laboratories公司从培养的毛壳菌(*Chaetomium* sp.)中分离得到 $\alpha$ -葡聚糖酶并投放市场。1995~1999年,古巴研究人员利用毕赤酵母异源表达来源于青霉的 $\alpha$ -葡聚糖酶Herbertec-Dextranase,并取得较好结果<sup>[4,5]</sup>。随后,Sankyo公司将源自毛壳菌(*Chaetomium gracile*)的 $\alpha$ -葡聚糖酶应用于澳大利亚糖厂。NOVO公司也推出来源于薄青霉(*Penicillium lilacinum*)的 $\alpha$ -葡聚糖酶DN25L和DN50L。在温度50~60℃和pH值5.0~6.0的蔗汁中加入该酶,能够使 $\alpha$ -葡聚糖有效分解,但是该酶没有得到美国FDA的GRAS认证。2001年, Frank等<sup>[6]</sup>从嗜热细菌热解糖热厌氧杆菌*T. thermosaccharolyticum*中分离得到耐热型的 $\alpha$ -葡聚糖酶,其最适反应温度为65~70℃,最适pH值5.5。该酶也适合用于制糖业,但是并未见报道。2002年,NOVO公司又推出来源于毛壳菌(*Chaetomium erraticum*)的 $\alpha$ -葡聚糖酶Dextranase Plus L。此酶能够耐85℃高温,最适pH值为3~7,广西科学 2014年12月 第21卷第6期

适宜在蔗汁和糖浆中分解 $\alpha$ -葡聚糖。在国内,广西轻工工业科学技术研究院曾使用国外生产的 $\alpha$ -葡聚糖酶分解 $\alpha$ -葡聚糖,且在部分糖厂进行过小试,但未见试验结果报道。

目前商品化的 $\alpha$ -葡聚糖酶主要通过青霉属(*Penicillium*)和毛壳属(*Chaetomium*)等真菌的培养物得到。而利用基因工程菌生产外源蛋白也有好的发展前景,研究大多集中在甲醇诱导型毕赤酵母工程菌产外源 $\alpha$ -葡聚糖酶;Roca等<sup>[7]</sup>通过5 L发酵罐培养获得了接近3000 U/mL的酶活;Chen等<sup>[8]</sup>通过5 L发酵罐培养获得了83.9 U/mL的酶活;Kang等<sup>[9]</sup>通过10 L发酵罐获得了134 U/mL的酶活。虽然 $\alpha$ -葡聚糖酶是一种高效、安全的绿色产品,在国内外有着广泛的市场需求,但目前国内还没有自主生产的商品化 $\alpha$ -葡聚糖酶。

### 1.1 组成型 $\alpha$ -葡聚糖酶工程菌的构建及表达研究

梁达奉等<sup>[10]</sup>克隆了朱黄青霉(*Penicillium minioluteum* HI-4)的 $\alpha$ -葡聚糖酶基因 $dex$ ,构建组成型表达载体pGAPZ $\alpha$ A- $dex$ ;还以毕赤酵母KM71H为受体菌,构建了组成型表达 $\alpha$ -葡聚糖酶的毕赤酵母工程菌KM71H/pGAPZ $\alpha$ A- $dex$ 。他们的研究结果显示,摇瓶发酵120 h, $\alpha$ -葡聚糖酶酶活达到60.4 U/mL。且该菌种培养方法简单,遗传特性稳定,在发酵过程中无需诱导,避免了甲醇的使用,这不但提高了安全性,还降低了成本,为大规模工业生产 $\alpha$ -葡聚糖酶打下基础。

### 1.2 酶学性质及其稳定性研究

黎志德等<sup>[11]</sup>研究了KM71H/pGAPZ $\alpha$ A- $dex$ 所产 $\alpha$ -葡聚糖酶的酶学性质。结果表明, $\alpha$ -葡聚糖酶的最适反应温度为50℃,最适反应pH值为5.0;酶的储存稳定性较好,pH值在4.5~5.0时 $\alpha$ -葡聚糖酶较稳定,4℃保存,半衰期约为35 d。他们发现:采用葡萄糖作保护剂可以最大限度减少酶活损失,以蔗糖作为保护剂时,在室温下酶活基本没有损失; $\alpha$ -葡聚糖酶在pH值5.5时,温度4~25℃保存150 h,相对酶活仍有90%以上;但是当贮存温度超过30℃,酶活在较短时间明显下降,且温度越高,酶活下降速度越快; $\alpha$ -葡聚糖酶在pH值4~6,4℃下保存一周,相对酶活仍有80%以上; $\alpha$ -葡聚糖酶液中添加甘油浓度达到30%时,室温下保存56d,相对酶活仍有80%以上。

### 1.3 分离纯化研究

黎志德等<sup>[12]</sup>研究了 $\alpha$ -葡聚糖酶在PEG-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>双水相体系中的分配行为,并从中寻找该双水相体系中分离纯化的最佳工艺条件。他

们以两相比、酶活、蛋白浓度、比活力以及萃取率为参数进行比较,探讨使用不同分子量的 PEG、不同的 PEG 浓度以及不同  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度下对酶分配行为的影响。发现,  $\alpha$ -葡聚糖酶在质量分数 13% 的 PEG4000 以及 13% 的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  双水相系统中,可以获得较高的比活力(2364.97 U/mg)以及萃取率(99.94%)。

#### 1.4 制糖生产中添加 $\alpha$ -葡聚糖酶的工艺条件研究

岑成福等<sup>[13]</sup>通过响应曲面法优化建立回归模型,得到  $\alpha$ -葡聚糖酶催化水解蔗汁中  $\alpha$ -葡聚糖的最佳反应条件:酶剂量 0.05 U/mL 蔗汁、pH 值 5.3、反应时间 15 min、反应温度 51℃。在该条件下使用  $\alpha$ -葡聚糖酶可将蔗汁中含量为 800~900 ppm 的  $\alpha$ -葡聚糖完全去除。

## 2 $\alpha$ -葡聚糖酶在制糖工业的应用研究

### 2.1 在甘蔗制糖工业的应用

在广东某糖厂压榨车间,蚁细苗等<sup>[14]</sup>添加  $\alpha$ -葡聚糖酶后测定蔗汁及糖浆中  $\alpha$ -葡聚糖的含量,发现加酶后中和汁中  $\alpha$ -葡聚糖减少约 78.9%,粗糖浆中  $\alpha$ -葡聚糖减少约 64.4%。在广西某糖厂的加酶试验结果表明,混合汁中  $\alpha$ -葡聚糖减少约 70.2%,中和汁中  $\alpha$ -葡聚糖减少 54.0%。抽查加酶前后每天两个编号白砂糖样品,发现加酶后白砂糖中  $\alpha$ -葡聚糖的清除率达到 95%,说明加入  $\alpha$ -葡聚糖酶能有效清除白砂糖中的  $\alpha$ -葡聚糖,提高糖产品品质。

### 2.2 在原糖炼糖工业过程的应用

马步等<sup>[15]</sup>在原糖炼糖企业的研究中发现,在煮糖过程加入  $\alpha$ -葡聚糖酶有利于糖浆过滤。加酶后压滤机的平均处理时间延长了 5.3%,说明过滤流量降至需要卸泥的时间延长了,而且每台机器的处理量也增大了,日总处理量增加了 7.6%。这可能是因为加酶后大部分  $\alpha$ -葡聚糖在溶糖箱被降解,稀汁黏度下降,令过滤更加顺畅;也可能是因为  $\alpha$ -葡聚糖被降解后改变了滤泥的结构,令滤层阻力减少,增加了压滤机处理量。

在煮糖过程加入  $\alpha$ -葡聚糖酶有利于煮炼收回。本实验所在精炼糖厂采用了七系煮糖法(煮糖罐编号分别为 R1、R2、R3、R4、A、B、C。原糖溶解澄清后进入 R1 煮糖罐,罐里的糖浆称为 R1 糖浆,煮出来的糖膏称为 R1 糖膏,分蜜后得出的糖为 R1 糖,蜜为 R1 蜜,R1 蜜用作 R2 的糖浆,如此类推)。结果显示,加酶后 R1 糖浆的简纯度较加酶前上升了 0.08%,这可能是因为原糖糖浆中的  $\alpha$ -葡聚糖被降解后,原糖糖浆黏度下降,部分含杂质的胶体体系被破坏,从而令

过滤和脱色过程中清净效率提高,使 R1 糖浆简纯度提高。R3、R4、A、B 和 C 糖浆的简纯度均比加酶前下降,且 A、B 和 C 糖浆的下降幅度较大,这可能是由于前面两系煮糖的结晶率提高,高纯度物料前移,加酶后糖浆的  $\alpha$ -葡聚糖含量明显降低,从而降低了物料的粘度,加速了蔗糖的结晶速率,令糖浆的纯度降低,从而提高了煮炼收回。

理论上, $\alpha$ -葡聚糖的存在增加糖浆的粘度,影响蔗糖吸收、结晶速度,延长煮糖时间, $\alpha$ -葡聚糖的除去可缩短煮糖时间。试验结果表明,加酶后 R1、R2 糖浆纯度提高,R1、R2 糖的煮糖时间缩短,R3 糖浆以后的煮糖时间也有相同规律,说明加入  $\alpha$ -葡聚糖酶还有利于缩短煮糖时间。

## 3 展望

$\alpha$ -葡聚糖酶在糖厂的应用结果表明, $\alpha$ -葡聚糖酶能有效降解蔗汁(或原糖糖浆)中的  $\alpha$ -葡聚糖,提高清净效果,提高过滤效率,提高加热与蒸发过程的传热效率,增强煮糖物料循环流动性,改善分蜜效果,降低废蜜重力纯度,提高煮炼收回;使用  $\alpha$ -葡聚糖酶后,白砂糖中  $\alpha$ -葡聚糖含量降至无法检出,质量和适用性显著提高。目前,解决  $\alpha$ -葡聚糖危害的最佳方法是利用  $\alpha$ -葡聚糖酶在制糖工艺过程直接去除  $\alpha$ -葡聚糖。该方法不仅效果好,而且安全环保,但是其不足在于酶活性不高,且生产成本较高。基因工程技术和蛋白质定向进化技术将在提高  $\alpha$ -葡聚糖酶酶活、提高热稳定性、增强底物特异性等方面发挥重要作用,成为今后的研究热点。

#### 参考文献:

- [1] Imrie F K E, Tilbury R H. Polysaccharides in sugar cane and its products[J]. Sugar Technology Reviews, 1972(1):291-361.
- [2] 梁达奉,曾练强,郭亭,等. 葡聚糖对制糖工业的影响及对策[J]. 甘蔗糖业,2008(3):28-33.  
Liang D F, Zeng L Q, Guo T, et al. Influence of dextran to sugar industry and their counter-measures[J]. Sugar-cane and Canesugar, 2008(3):28-33.
- [3] Rodriaguez Jimenez E. The dextranase along sugar-making industry[J]. Biotechnology Application, 2005(22):20-27.
- [4] Eggleston G, Monge A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases[J]. Process Biochemistry, 2005(40):1881-1894.
- [5] Eggleston G, Monge A, Montes B, et al. Application of dextranases in sugarcane factory: Overcoming practical problems[J]. Sugar Technology, 2009, 11(2):135-141.

- [6] Hoster F, Daniel R, Gottschalk G. Isolation of a new *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain (FH1) producing a thermostable dextranase[J]. J Gen Appl Microbiol, 2001, 47(4):187-192.
- [7] Roca H, Garcia B, Rodriguez E, et al. Cloning of the *Penicillium minioluteum* gene encoding dextranase and its expression in *Pichia pastoris* [J]. Yeast, 1996, 12(12):1187-1200.
- [8] Chen L, Zhou X, Fan W, et al. Expression, purification and characterization of a recombinant *Lipomyces starkeyi* dextranase in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expr Purif, 2008, 58(1):87-93.
- [9] Kang H K, Park J Y, Ahn J S, et al. Cloning of a gene encoding dextranase from *Lipomyces starkeyi* and its expression in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Microbiology Biotechnology, 2009, 19(2):172-177.
- [10] 梁达奉, 黄曾慰, 曾练强, 等.  $\alpha$ -葡聚糖酶在毕赤酵母中的组成型表达[J]. 华南理工大学学报:自然科学版, 2012(5):96-100.
- Liang D F, Huang Z W, Zeng L Q, et al. Constitutive expression of dextranase in *Pichia pastoris* [J]. Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition, 2012(5):96-100.
- [11] 黎志德, 曾练强, 蚁细苗, 等.  $\alpha$ -葡聚糖酶的保存稳定性研究[J]. 广西蔗糖, 2013(4):31-34, 18.
- Li Z D, Zeng L Q, Yi X M, et al. The stability of dextranase[J]. Guangxi Sugarcane & Canesugar, 2013(4):31-34, 18.
- [12] 黎志德, 蚁细苗, 黄思鸿, 等. 聚乙二醇-硫酸铵双水相体系萃取  $\alpha$ -葡聚糖酶[J]. 甘蔗糖业, 2013(1):38-42.
- Li Z D, Yi X M, Huang S H, et al. Extraction of dextranase by PEG /  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aqueous two-phase systems[J]. Sugarcane and Canesugar, 2013(1):38-42.
- [13] 岑成福, 蚁细苗, 梁达奉, 等. 酶解除去蔗汁中的右旋糖酐[J]. 甘蔗糖业, 2013(6):12-18.
- Cen C F, Yi X M, Liang D F, et al. Apply dextranase to hydrolyze dextrans in sugarcane juice [J]. Sugarcane and Canesugar, 2013(6):12-18.
- [14] 蚁细苗, 柳颖, 林荣珍, 等. 免疫比浊法定量测定制糖过程中的葡聚糖[J]. 广西蔗糖, 2013(4):35-40.
- Yi X M, Liu Y, Lin R Z, et al. Determination of dextran in sugar-process by immune turbidimetric assay[J]. Guangxi Sugar, 2013(4):35-40.
- [15] 马步, 常国伟, 蚁细苗, 等.  $\alpha$ -葡聚糖酶在原糖精炼生产中的应用研究[J]. 广西糖业, 2014(3):18-21.
- Ma B, Chang G W, Yi X M, et al. Study of dextranase application in sugar refining[J]. Guangxi Sugar Industry, 2014(3):18-21.

(责任编辑:尹 闯)