

# 山梨醇对黑曲霉源 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶(r-Rha1) 热稳定性的影响

叶家影<sup>1</sup>, 孙江<sup>1</sup>, 李文静<sup>1</sup>, 倪辉<sup>\*1,2,3</sup>, 李利君<sup>1,2,3</sup>, 李清彪<sup>1,2,3</sup>

(1. 集美大学 海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 集美大学 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 集美大学 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 提高酶热稳定性是工业酶属性改造的重要目标。山梨醇作为广泛应用于提高酶稳定性的外源添加剂, 目前对其影响酶热稳定性的机制仍不明确。因此, 作者以黑曲霉源  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶(r-Rha1)为研究对象, 通过热失活动力学、圆二色谱和荧光光谱的谱学分析, 研究山梨醇对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性的影响机制。结果表明, 在 60~70 °C下, 加入山梨醇可改善  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的热稳定性; 在 60、65、70 °C条件下, 加入 1.2 mol/L 山梨醇可分别将半衰期提高 29、25、10 倍; 圆二色谱和荧光光谱结果表明山梨醇通过增强  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的表面疏水活性和结构刚性, 从而提高其热稳定性。通过探究山梨醇对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性的影响, 进一步证明山梨醇提高酶热稳定性的普遍适用性, 同时为后续  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的工业应用提供了参考。

**关键词:**  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶; 山梨醇; 热稳定性; 荧光光谱; 圆二色谱

中图分类号: Q 814.9 文章编号: 1673-1689(2022)10-0096-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.10.009

## Effect of Sorbitol on Thermal Stability of $\alpha$ -L-Rhamnosidase (r-Rha1) from *Aspergillus niger*

YE Jiaying<sup>1</sup>, SUN Jiang<sup>1</sup>, LI Wenjing<sup>1</sup>, NI Hui<sup>\*1,2,3</sup>, LI Lijun<sup>1,2,3</sup>, LI Qingbiao<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The thermal stability of enzyme is an important target of industrial enzyme property modification. As an exogenous additive widely used to improve enzyme stability, the mechanism of sorbitol affecting enzyme thermal stability is still unclear. Therefore, the authors focused on  $\alpha$ -L-rhamnosidase (r-Rha1) derived from *Aspergillus niger* and investigated the mechanism of sorbitol on the thermal stability of  $\alpha$ -L-rhamnosidase by thermal inactivation kinetics, circular dichroism and spectroscopic analysis of fluorescence mapping. Adding sorbitol improved the thermal stability of  $\alpha$ -L-rhamnosidase at 60~70 °C, and 1.2 mol/L sorbitol increased the half-life of  $\alpha$ -L-rhamnosidase 29-fold, 25-fold and 10-fold at 60, 65 °C and 70 °C, respectively. The results of

收稿日期: 2022-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(U1805235); 厦门市科技局项目(3502Z20203058); 福建省平和县现代农业产业园中央财政奖补资金项目(PH2020)。

\* 通信作者: 倪辉(1973—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品酶学与食品风味研究。E-mail: nihui@jmu.edu.cn

circular dichroism and fluorescence mapping plus indicated that sorbitol improved the thermal stability of  $\alpha$ -L-rhamnosidase by enhancing its surface hydrophobic activity and structural rigidity. The effect of sorbitol on the thermal stability of  $\alpha$ -L-rhamnosidase was investigated to further prove the general applicability of sorbitol in improving the thermal stability of the enzyme, while providing a reference for the subsequent industrial application of  $\alpha$ -L-rhamnosidase.

**Keywords:**  $\alpha$ -L-rhamnosidase, sorbitol, thermal stability, fluorescence chromatogram, circular dichroism spectrum

酶在提高生物催化效率的应用中发挥着重要作用,天然酶通常只能根据自身的需要进化相应的催化性能<sup>[1]</sup>。在工业上使用酶时,需要探索提高其对工业相关底物活性的方法,也应针对这些酶进行工业反应条件的优化。高热稳定性一直是生物催化剂在工业应用中的重要性能,也是限制酶工业化应用的重要因素<sup>[2]</sup>。酶热稳定性的强弱决定着酶的利用率、生产效率和生产成本<sup>[3]</sup>等。因此,提高热稳定性是改善工业用酶属性的重要目标。

催化过程中的热环境会加速酶蛋白的变性,为提高酶蛋白的热稳定性,可根据其序列、结构、功能及催化机理进行理性设计,以获得具有良好特性的突变体酶或重组酶<sup>[4-7]</sup>。在以往的研究中,作者所在团队通过 PoPMuSiC 算法和  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶表面赖氨酸-精氨酸突变提高了  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性<sup>[8-9]</sup>。多羟基化合物山梨醇价格低廉、储量丰富,是美国能源部提出的可持续平台化学品之一<sup>[10]</sup>,在食品、化妆品和医药工业中有广泛用途<sup>[11]</sup>。随着研究的深入,山梨醇也被广泛用作酶稳定剂<sup>[12]</sup>。山梨醇作为外源添加剂在提高酶的稳定性方面具有操作简单、成本低及生物降解性良好等优势<sup>[13]</sup>,Narayanan 等研究发现添加山梨醇可缓解酿酒酵母伴侣蛋白突变体的温度敏感性<sup>[14]</sup>,Mohammadi 等发现添加山梨醇可提高羧肽酶 A 的转变温度( $T_m$ )、活性和稳定性<sup>[15]</sup>。但目前对山梨醇影响黑曲霉源  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性机制仍不明确。

$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶是一种糖苷水解酶,主要作用于  $\alpha$ -1,2, $\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6 糖苷键,能有效水解大多数糖苷末端的带有鼠李糖基团的黄酮类化合物,如橙皮苷、斛皮苷、柚皮苷及人工底物对硝基苯基- $\alpha$ -L-鼠李糖苷(*p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnoside,*p*NPR)等。 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在食品行业有广泛应用,如柑橘果汁的脱苦与澄清<sup>[16-17]</sup>、饮料香气成分的改善<sup>[18]</sup>、

红酒风味的改善<sup>[19]</sup>等;此外,在医药行业和化合物的前体合成也有重要应用<sup>[20]</sup>。但已报道的大多数  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在较高温度下热稳定性差<sup>[21-23]</sup>,因而限制了其工业应用。已有研究表明,添加山梨醇可增强土曲霉源  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的热稳定性<sup>[24]</sup>。作者以黑曲霉源  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 r-Rha1 为对象,通过热失活动力学、圆二色谱和荧光光谱的谱学分析,探讨山梨醇对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性影响,并从分子构象及二级结构变化方面研究山梨醇对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的保护机理,促进人们对山梨醇与  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶相互作用的理解,同时为提高其他酶制剂产品稳定性提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 菌种** 含 pPIC9K-*rha* 重组质粒的毕赤酵母 SMD1168 由集美大学海洋食品与生物工程学院酶工程实验室保藏<sup>[25]</sup>。

**1.1.2 试剂** *p*NPR 与甲醇(GR):Sigma-Aldrich 公司产品;山梨醇(AR):阿拉丁上海有限公司产品;甘油、葡萄糖、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠:国药集团化学试剂有限公司产品;胰蛋白酶、酵母粉:广东环凯微生物科技有限公司产品;生物素、无氨基酸酵母氮源(yeast nitrogen base without amino acids, YNB):北京索莱宝生物公司产品。

酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD):20 g 胰蛋白酶、20 g 葡萄糖、10 g 酵母粉溶解于 1 L 去离子水中,调节 pH 至 6.0,高压灭菌。

缓冲甘油-复合培养基(buffered glycerol-complex medium, BMGY):20 g 胰蛋白酶、10 g 酵母粉溶解于 700 mL 去离子水中,高压灭菌,冷却后加入 100 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)、100 mL 10×

YNB、100 mL 甘油、2 mL 0.02 g/dL 生物素 B。

缓冲甲醇-复合培养基 (buffered methanol-complex medium, BMMY): 20 g 胰蛋白胨、10 g 酵母粉溶解于 700 mL 去离子水中, 高压灭菌, 冷却后加入 100 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0)、100 mL 10× YNB、100 mL 甲醇、2 mL 0.02 g/dL 生物素 B。

## 1.2 仪器与设备

DK-8D 数显恒温水浴锅: 常州国华电器有限公司产品; FE20 pH 计: 瑞士 Mettler Toledo 公司产品; Avanti J-26S XP 立式高速冷冻离心机: 美国 Beckman 公司产品; Infiniti M200 PRO 酶标仪: 奥地利 Tecan 公司产品; Sephacryl S-200 柱: 美国 Amersham Bioscience 公司产品; 圆二色谱仪: 英国 Applied Photophysics 公司产品; 荧光分光光度计: 美国 PerkinElmer 公司产品。

## 1.3 实验方法

**1.3.1  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶酶液的制备、分离和纯化** 参照刘小琴等的实验方法<sup>[26]</sup>, 将含 pPIC9K-rha 重组质粒的毕赤酵母 SMD1168 以 1% (体积分数) 接种量接入 30 mL YPD 培养基中。培养 14~16 h 后, 以 1% (体积分数) 接种量接入 100 mL BMGY 培养基中, 于 30 °C、180 r/min 条件下培养。当 OD<sub>600</sub> 为 2~5 时, 离心收集菌体, 转移至 100 mL BMMY 培养基中。培养期间每隔 24 h 添加体积分数为 0.5% 的甲醇, 作为碳源并诱导菌体表达。诱导表达 7 d 后, 4 °C、5 000 r/min 离心 15 min 取上清液, 即  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的粗酶液。将上清液进行超滤浓缩 (相对分子质量 50 000 微孔滤膜) 后, 上样至以 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 平衡的 Sephacryl S-200 柱中, 收集  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶组分, 于 4 °C 下保存备用。

**1.3.2 酶活力测定** 参照杨岩的实验方法<sup>[27]</sup>, 以 20 mmol/L pNPR 为底物测定  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶酶活性。在 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH 4.0) 中, 60 °C 条件下, 以每分钟释放 1  $\mu$ mol pNP 所需的酶量为 1 个酶活力单位。60  $\mu$ L pNPR 与 120  $\mu$ L 缓冲液在 60 °C 孵育 5 min 后, 加入 20  $\mu$ L 酶液, 继续在 60 °C 下反应 10 min, 加入 1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应, 于 410 nm 处测定释放的 pNP。

实验组为酶液与等体积山梨醇混合, 山梨醇终浓度分别为 0.6 mol/L 和 1.2 mol/L; 对照组为酶液与等体积去离子水混合。

**1.3.3 热稳定性与热失活分析** 作者所在实验室

前期研究发现, 浓度为 1.2 mol/L 的山梨醇是  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶活力增强的关键拐点, 也是其酶活力的最大峰值处<sup>[28]</sup>。为了研究山梨醇对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性的具体影响, 分别测定并绘制了添加 1.2 mol/L 山梨醇后  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的热稳定性曲线与热失活曲线的一级动力学模型。

**热稳定性曲线:** 以添加 1.2 mol/L 山梨醇的酶液为实验组, 于 60、65、70、75、80 °C 温育 10 min 后, 按照 1.3.2 方法测定残余酶活力, 以最高酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 并绘制热稳定性曲线。

**热失活曲线的一级动力学模型:** 根据热稳定性实验结果, 选取合适温度, 按照 1.3.2 方法测定酶液在不同温度下孵育不同时间的残余酶活力, 以  $\ln(A_t/A_0)$  作图 ( $A_t$  为残余酶活力  $\times 100$ ,  $A_0$  为最高酶活力), 并进行线性拟合, 绘制热失活曲线的一级动力学模型。得到的线性斜率即为该温度下的热失活常数 ( $K$ ), 由热失活常数可计算出该温度下的半衰期 ( $t_{1/2}$ )。

按照 1.3.2 方法测定残余酶活力, 以测得最高酶活力为 100%, 待残余酶活力降至 50% 以下, 停止测定。60 °C 下对照组每隔 2 h 取样测定残余酶活力, 实验组每隔 1 d 取样测定残余酶活力; 65 °C 下对照组每隔 10 min 取样测定残余酶活力, 实验组每隔 1 h 取样测定残余酶活力; 70 °C 下对照组每隔 2 min 取样测定残余酶活力, 实验组每隔 10 min 取样测定残余酶活力。

**1.3.4 圆二色谱分析** 将分别添加 0.6、1.2 mol/L 山梨醇的酶液在 70 °C 下温育 20 min 作为实验组 1 (0.6 mol/L)、实验组 2 (1.2 mol/L), 未添加山梨醇未温育为对照组, 蛋白质质量浓度为 0.13 mg/mL, 扫描范围为 185~260 nm, 扫描速率为 1 nm/s, 分辨率为 1 nm。分别记录山梨醇分别添加 1.2、0.6 mol/L 和未添加时的圆二色谱, 最后用 Dichrowed 分析二级结构, 并计算 4 个二级结构:  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲的相对含量。

**1.3.5 荧光光谱分析** 内源荧光分析: 蛋白质质量浓度为 0.04 mg/mL, 测量温度为 25 °C, 激发波长为 295 nm, 扫描速度为 100 nm/min, 激发和发射狭缝宽度均为 10 nm, 波长扫描范围为 300~500 nm。分别记录  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在不同温育时间及不同山梨醇添加量条件下的荧光光谱。

表面疏水活性分析: 8-苯胺-1-萘磺酸 (8-aniline-1-naphthalenesulfonic acid, ANS) 为荧光探

针,蛋白质质量浓度为0.2 mg/mL,测量温度为25℃,激发波长为375 nm,扫描速度为100 nm/min,激发和发射狭缝宽度均为10 nm,波长扫描范围为400~700 nm。分别记录 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在不同温育时间及不同山梨醇添加量条件下的表面疏水活性。

样品处理:将分别添加0.6、1.2 mol/L山梨醇的酶液在70℃下温育20 min作为实验组1(0.6 mol/L)、实验组2(1.2 mol/L),未添加山梨醇未温育为对照组,不添加山梨醇但温育为未添加组,对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶进行荧光扫描。

**1.3.6 数据处理** 每组实验设3个平行,取平均值,采用GraphPad Prism 8、Excel 2019、Dichrowed软件进行数据处理及相关图表绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 热稳定性曲线

酶的热稳定性易受到反应温度、反应体系及其他条件的影响。在作者所在团队前期的研究中发现黑曲霉源 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 r-Rha1 的最适温度为60℃<sup>[25]</sup>,分别在60、65、70、75、80℃下测定有无山梨醇条件下该酶的热稳定性曲线,结果如图1所示。在60℃和65℃下,实验组与对照组的相对酶活力无明显差别,在70℃下对照组的相对酶活力仅为13%,而实验组仍可保留98%的相对酶活力。由此可说明山梨醇可有效提高 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的热稳定性,这与Pazhang等发现添加山梨醇可提高胰蛋白酶稳定性<sup>[12]</sup>的研究结果一致。

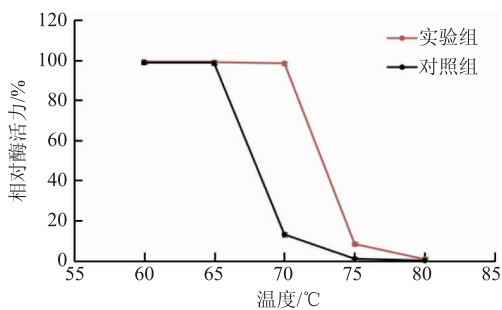


图1 热稳定性曲线

Fig. 1 Thermal stability curve

### 2.2 热失活曲线

酶的热失活是最重要的酶失活形式,热失活曲线反应的酶失活规律是控制与设计工业酶催化反应的必要条件。图2分别为60、65、70℃下的一级

热力学模型图。根据图2可计算出 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在不同条件下的热失活常数 $K$ 和半衰期 $t_{1/2}$ ,结果如表1所示。在60、65、70℃下未添加山梨醇的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的半衰期分别为8.08 h、46.52 min、4.34 min,由此可说明 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶对于温度十分敏感。山梨醇通过维持蛋白质构象而提高酶的热稳定性,延长半衰期,在60、65、70℃下实验组的半衰期分别是对照组的29、25、10倍。60℃下 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶本身已具有较好的热稳定性,65℃下对半衰期的提高效果不如60℃,这符合随着温度的升高酶蛋白半衰期逐步下降的基本规律,也表明山梨醇能有效提高 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的半衰期,这与Ge等发现添加山梨醇可延长曲霉源 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶半衰期的结果一致<sup>[24]</sup>。

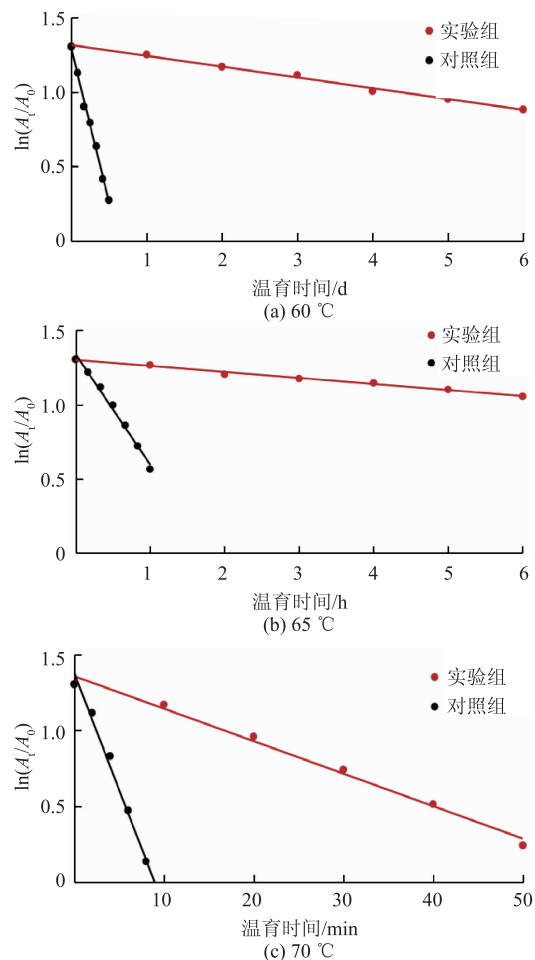


图2 热失活曲线的一级动力学模型

Fig. 2 One-level kinetic model of thermal deactivation curve

表 1 酶失活一级动力学模型参数

Table 1 Parameters of the first-level kinetic model for enzyme inactivation

温度/°C	对照组		实验组	
	$K/\text{min}^{-1}$	$t_{1/2}$	$K/\text{min}^{-1}$	$t_{1/2}$
60	0.085 8	8.08 h	0.071 2	9.73 d
65	0.014 9	46.52 min	0.000 6	19.25 h
70	0.159 6	4.34 min	0.022 0	43.77 min

### 2.3 圆二色谱分析

圆二色谱可反映蛋白质的二级结构变化<sup>[29]</sup>,结果如图 3、表 2 所示,实验组较对照组在 192 nm 处有较强的正吸收峰, $\alpha$ -螺旋相对含量增加, $\beta$ -折叠相对含量则相应降低,无规则卷曲相对含量变化小。 $\alpha$ -螺旋靠氢键维持稳定,具有一定的刚性,其比例的增加使  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的结构更加刚性。加入山梨醇可保护酶蛋白在变性过程中  $\alpha$ -螺旋不被破坏,使  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和  $\beta$ -转角维持合适比例和稳定的空间构象,从而提高  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的热稳定性。

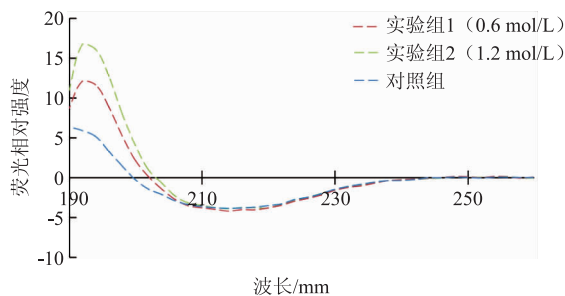


图 3 圆二色谱图

Fig. 3 Circular dichroism spectrum

表 2 二级结构相对含量

Table 2 Secondary structure content table

样品	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规则卷曲
对照组	28.3	22.5	17.7	31.5
实验组 1(0.6 mol/L)	35.7	16.3	24.7	31.6
实验组 2(1.2 mol/L)	40.6	13.1	15.5	30.9

### 2.4 荧光光谱分析

荧光光谱普遍用于蛋白质三级结构研究,因为其内部 Trp 和 Tyr 的荧光吸收对各类扰动十分敏感,有研究者就采用荧光光谱法对外源物质与蛋白

质的结构变化进行分析研究<sup>[30-31]</sup>。当 Trp 和 Tyr 所处的非极性环境转向极性环境时,多肽链和氨基酸发生去折叠而舒展,酶构象发生改变,引起红移与荧光强度降低。内源荧光结果如图 4(a)所示,对照组最大吸收波长为 342 nm,实验组中添加 1.2 mol/L 山梨醇最大吸收波长为 344.5 nm,小于未添加及添加量为 0.6 mol/L 山梨醇的 347 nm,红移程度有所下降。表面疏水活性分析结果如图 4(b)所示,添加山梨醇的最大吸收波长从 488 nm 移至 486 nm,发生轻微蓝移,荧光强度高于对照组。根据前期实验, $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶中山梨醇的最佳用量为 1.2 mol/L<sup>[28]</sup>,但添加 0.6 mol/L 山梨醇的荧光强度却高于添加 1.2 mol/L 山梨醇的荧光强度。

作者所在实验室前期对底物 pNPR 与  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶进行分子动力学模拟,发现 pNPR 结合环附近的 Trp<sup>253</sup> 和 Trp<sup>640</sup> 对于底物结合十分重要<sup>[32]</sup>,在  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶催化结构域的 ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> 桶状结构域内部所含 Trp 和 Tyr 数量也较多。一般认为,山梨醇可改善酶的热稳定性是由于增强了酶蛋白的疏水作用和氢键数量<sup>[33]</sup>,且涉及催化结构域周围的氨基酸的氢键对酶和底物之间的接触贡献最大<sup>[34]</sup>。由内源荧光光谱与表面疏水活性分析推断,添加 1.2 mol/L 山梨醇的红移程度小于添加量为 0.6 mol/L 山梨醇,是由于山梨醇的羟基可与水分子、Trp 和 Tyr 侧链形成大量氢键,使疏水氨基酸向内卷曲,扭转 Trp 和 Tyr 向更亲水的环境转移,稳定蛋白质构象,进而降低红移程度。山梨醇可在  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶分子周围形成致密水化层,减小酶蛋白在热变性过程中的构象变化,维持蛋白质结构的稳定性。而过量山梨醇会与  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶活性中心相互作用,进而阻碍酶与底物的结合,故添加 0.6 mol/L 山梨醇的荧光强度高于添加 1.2 mol/L 山梨醇的荧光强度。

山梨醇的优先水合作用降低了酶蛋白与水分子的直接相互作用,增强非极性基团间的疏水作用,营造疏水环境<sup>[35]</sup>,从而提高  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性<sup>[36-37]</sup>,其机理图如图 5 所示。圆二色谱与荧光光谱结果显示山梨醇对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性产生了影响,与其他研究人员证实山梨醇可通过改变酶蛋白的微环境来提高纤维素酶<sup>[37]</sup>、 $\beta$ -甘露聚糖酶<sup>[38]</sup>、 $\alpha$ -淀粉酶<sup>[39]</sup>和  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[40]</sup>等的稳定性结果一致。

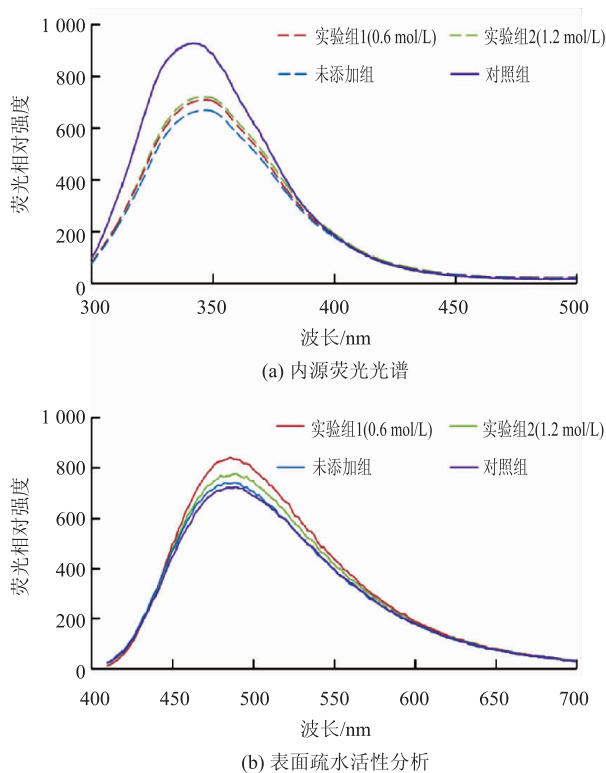


图4 荧光光谱  
Fig. 4 Fluorescence chromatogram

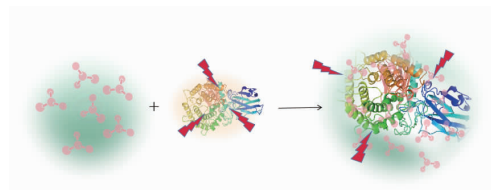


图5 山梨醇提高 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性机理图  
Fig. 5 Mechanism of sorbitol to improve the thermal stability of  $\alpha$ -L-rhamnosidase

### 3 结语

通过分析经山梨醇处理的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶残余酶活力及结构的变化,探究山梨醇对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性的影响。热稳定性及热失活动力学分析表明,在60~70℃下,加入山梨醇提高了 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的热稳定性;在60、65、70℃下,加入1.2 mol/L山梨醇可分别将半衰期提高29、25、10倍。圆二色谱和荧光光谱分析表明,山梨醇可增强 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的表面疏水活性和结构刚性,从而提高其热稳定性。作者解释了山梨醇提高 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性的分子作用及结构变化机制,为深入理解山梨醇提高酶蛋白稳定性的机理提供了参考;同时进一步验证了山梨醇对增强酶类热稳定性的普遍适用性,为提高酶热稳定性提供了参考方法。

### 参考文献:

- [1] ALI M, ISHQI H M, HUSAIN Q. Enzyme engineering: reshaping the biocatalytic functions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(6): 1877-1894.
- [2] 朱小冲, 唐双焱.  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶特性简述及影响酶活的因素[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2623-2632.
- [3] KAUR A, SINGH S, SINGH R S, et al. Hydrolysis of citrus peel naringin by recombinant  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Clostridium stercorarium*[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2010, 85(10): 1419-1422.
- [4] HUANG P S, BOYKEN S E, BAKER D. The coming of age of de novo protein design[J]. *Nature*, 2016, 537(7620): 320-327.
- [5] DAMIS S I R, MURAD A M A, BAKAR F D A, et al. Protein engineering of GH11 xylanase from *Aspergillus fumigatus* RT-1 for catalytic efficiency improvement on kenaf biomass hydrolysis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2019, 131: 1-9.
- [6] YIN B, HUI Q, KASHIF M, et al. Simultaneous enhancement of thermostability and catalytic activity of a metagenome-derived  $\beta$ -glucosidase using directed evolution for the biosynthesis of butyl glucoside[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(24): 1-14.
- [7] LI L J, LI W J, GONG J Y, et al. An effective computational-screening strategy for simultaneously improving both catalytic activity and thermostability of alpha-L-rhamnosidase[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(9): 3409-3419.
- [8] LIAO H, GONG J Y, YANG Y, et al. Enhancement of the thermostability of *Aspergillus niger*  $\alpha$ -L-rhamnosidase based on PoPMuSiC algorithm[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(8): 43-46.

- [9] LI L, LIAO H, YANG Y, et al. Improving the thermostability by introduction of arginines on the surface of  $\alpha$ -L-rhamnosidase (r-Rha1) from *Aspergillus niger*[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018, 112: 14-21.
- [10] 李澜鹏, 程瑾, 曹长海, 等. 山梨醇催化脱水制备异山梨醇研究进展[J]. 现代化工, 2021, 41(Suppl.): 78-82.
- [11] 黄润均, 王军正, 马华菊, 等. 山梨醇工业废水处理的研究进展[J]. 轻工科技, 2017, 33(4): 106-107.
- [12] PAZHANG M, MEHRNEJAD F, PAZHANG Y, et al. Effect of sorbitol and glycerol on the stability of trypsin and difference between their stabilization effects in the various solvents[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2016, 63(2): 206-213.
- [13] 白亮, 杨秀全, 吴志宇. 烷基木糖苷表面活性剂的应用性能研究[J]. 日用化学品科学, 2019, 42(10): 34-36.
- [14] NARAYANAN A, KABIR M A. Sorbitol and PKC1 overexpression alleviate temperature sensitivity in chaperonin mutants of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **MicroPublication Biology**, 2021, 2021: 1-4.
- [15] MOHAMMADI M, SHAREGHI B, FARHADIAN S, et al. The effect of sorbitol on the structure and activity of carboxypeptidase A: insights from a spectroscopic and computational approach[J]. **Journal of Molecular Liquids**, 2021, 330: 1-10.
- [16] LI L, GONG J, WANG S, et al. Heterologous expression and characterization of a new clade of *Aspergillus* alpha-L-rhamnosidase suitable for citrus juice processing[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019, 67(10): 2926-2935.
- [17] PENG C, LI R, NI H, et al. The effects of alpha-L-rhamnosidase, beta-D-glucosidase, and their combination on the quality of orange juice[J]. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2021, 45(7): 1-12.
- [18] SPAGNA G, BARBAGALLO R N, MARTINO A, et al. A simple method for purifying glycosidases: alpha-L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2000, 27(7): 522-530.
- [19] KUMAR D, YADAV S, YADAVA S, et al. An alkali tolerant alpha-L-rhamnosidase from *Fusarium moniliforme* MTCC-2088 used in de-rhamnosylation of natural glycosides[J]. **Bioorganic Chemistry**, 2019, 84: 24-31.
- [20] XIE J, ZHANG S, TONG X, et al. Biochemical characterization of a novel hyperthermophilic alpha-L-rhamnosidase from *Thermotoga petrophila* and its application in production of icaritin from epimedin C with a thermostable beta-glucosidase[J]. **Process Biochemistry**, 2020, 93: 115-124.
- [21] LI L, YU Y, ZHANG X, et al. Expression and biochemical characterization of recombinant  $\alpha$ -L-rhamnosidase r-Rha1 from *Aspergillus niger* JMU-TS528[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016, 85: 391-399.
- [22] ZHANG R, ZHANG B L, XIE T, et al. Biotransformation of rutin to isoquercitrin using recombinant  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Bifidobacterium breve*[J]. **Biotechnology Letters**, 2015, 37(6): 1257-1264.
- [23] ROJAS N L, VOGET C E, HOURS R A, et al. Purification and characterization of a novel alkaline  $\alpha$ -L-rhamnosidase produced by *Acrostalagmus luteo albus*[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2011, 38(9): 1515-1522.
- [24] GE L, CHEN A, PEI J, et al. Enhancing the thermostability of alpha-L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* and the enzymatic conversion of rutin to isoquercitrin by adding sorbitol[J]. **BMC Biotechnology**, 2017, 17(1): 1-10.
- [25] 张霞. 黑曲霉 JMU-TS528 菌株的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶基因的克隆和表达分析[D]. 厦门: 集美大学, 2014.
- [26] 刘小琴, 杨岩, 吴喆瑜, 等. 多点突变提高  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(6): 23-29.
- [27] 杨岩. 基于理性设计的黑曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶热稳定性改造的研究[D]. 厦门: 集美大学, 2017.
- [28] SUN J, LI W J, LIAO H, et al. Adding sorbitol improves the thermostability of alpha-L-rhamnosidase from *Aspergillus niger* and increases the conversion of hesperidin[J]. **Journal of Food Biochemistry**, 2022, 46(2): 1-11.
- [29] RANJBAR B, GILL P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses: a review[J]. **Chemical Biology & Drug Design**, 2009, 74(2): 101-120.
- [30] 郑泉. 荧光光谱法研究金属与蛋白质的相互作用[D]. 杭州: 中国计量大学, 2015.
- [31] 赵晓雪. 荧光光谱法结合分子建模研究难溶活性物质组与清蛋白的分子间作用[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.
- [32] LI L, LI W, GONG J, et al. An effective computational-screening strategy for simultaneously improving both catalytic activity and thermostability of alpha-L-rhamnosidase[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2021, 118(9): 3409-3419.
- [33] PLAZA L, DUVETTER T, VAN DER PLANCKEN I, et al. Influence of environmental conditions on thermal stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectinmethylesterase[J]. **Food Chemistry**, 2008, 111(4): 912-920.

- [34] BERNARDI R C, CANN I, SCHULTEN K. Molecular dynamics study of enhanced Man5B enzymatic activity[J]. **Biotechnology for Biofuels**, 2014, 7(1): 1-9.
- [35] BURSTEIN E A, VEDENKINA N S, IVKOVA M N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules [J]. **Photochemistry and Photobiology**, 1973, 18(4): 263-279.
- [36] 何小勇. 多羟基化合物对漆酶稳定性和催化性能的影响机理研究[D]. 武汉: 武汉科技大学, 2018.
- [37] 贾晓龙, 王越, 曹方, 等. 多羟基化合物对纤维素酶热稳定性影响的研究[J]. **可再生能源**, 2014, 32(10): 1534-1538.
- [38] 刘朝辉, 武伟娜, 刘跃, 等. 保护剂提高 $\beta$ -甘露聚糖酶热稳定性的研究[J]. **天津大学学报**, 2008, 41(1): 114-118.
- [39] DEY T B, KUMAR A, BANERJEE R, et al. Improvement of microbial  $\alpha$ -amylase stability: strategic approaches[J]. **Process Biochemistry**, 2016, 51(10): 1380-1390.
- [40] 王珂, 张焯, 刘石生, 等. 几种多元醇对橡胶籽 $\beta$ -葡萄糖苷酶热稳定性的影响[J]. **食品工业**, 2017, 38(4): 14-17.

## 科技信息

### 欧盟批准来自酿酒酵母 CNCM I-3060 的有机硒作为饲料添加剂

2022年9月5日, 欧盟发布条例 (EU) 2022/1459, 批准来自酿酒酵母 CNCM I-3060 (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060) 的有机硒 (organic form of selenium) 作为饲料添加剂用于所有动物, 本条例自发布之日起第二十天生效。

该添加剂所属类别为“营养添加剂”, 功能组别为“微量元素化合物”; 识别号为 3b810 和 3b810i; 在含水率 12% (质量分数) 的全价饲料中最高质量分数为 0.50 mg/kg; 批准期限至 2032 年 9 月 22 日。

[信息来源] 江苏省技术性贸易措施信息平台. 欧盟批准来自酿酒酵母 CNCM I-3060 的有机硒作为饲料添加剂 [EB/OL]. (2022-9-7). <http://www.tbguide.com/c/mypt/gwxw/511716.jhtml>