

# 极耐热 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的性质及其在异槲皮素制备中的应用研究

卢 珊, 张珊珊, 邹 康, 卢昌宁, 赵林果\*

(南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:**  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶可特异性切除糖苷类化合物上连接的  $\alpha$ -L-鼠李糖基, 已被广泛用于食品、医药等工业领域。作者旨在获得耐受高温的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶, 提高工业生产的效率和降低使用成本。首先对嗜热菌 *Sulfolobus islandicus* 来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶基因进行克隆及大肠杆菌的异源表达, 随后测定了系列酶学性质, 接着优化了该酶制备异槲皮素的酶法制备工艺。结果表明: 重组酶 SisRha 在 90 °C 下酶活力最佳, 具有极好的热稳定性, 其在 80 °C 下孵育 120 min 后酶活力几乎没有损失; 最适反应 pH 为 5.5, 在 pH 4.5~7.0 时, pH 稳定性良好; 重组酶 SisRha 对人工底物对硝基苯酚鼠李糖糖苷 (pNPR) 的  $K_m$  值为 (0.15±0.03) mmol/L,  $V_{max}$  值为 (6.26±0.51) U/mg,  $k_{cat}$  值为 (10.48±0.86) s<sup>-1</sup>; 对底物 pNPR、芦丁、朝藿定 C、柚皮苷、橘皮苷和淫羊藿苷的比活力分别为 25.06、11.89、6.74、3.14、2.77、0.42 U/mg。重组酶 SisRha 转化芦丁生成异槲皮素的适宜工艺为: 用酶量 0.40 U/mL, 在 85 °C、pH 5.0 的条件下反应 1 h, 可将 2 mmol/L 芦丁几乎全部转化, 摩尔转化率高达 98.56%。本研究丰富了现有的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶资源, 为嗜热菌来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的研究奠定了基础, 同时提供了一种高温转化芦丁制备异槲皮素的方法。

**关键词:**  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶; 嗜热菌; 热稳定性; 芦丁; 异槲皮素

中图分类号: Q 814 文章编号: 1673-1689(2023)01-0102-10 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.01.009

## Characterization of an Extremely Thermostable $\alpha$ -L-Rhamnosidase and Its Applications in Preparation of Isoquercetin

LU Shan, ZHANG Shanshan, ZOU Kang, LU Changning, ZHAO Linguo\*

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:**  $\alpha$ -L-Rhamnosidase can specifically hydrolyze  $\alpha$ -L-rhamnose on glycosides and has been widely used in food, medicine and other industrial fields. This research aimed to obtain high-temperature-tolerant  $\alpha$ -L-rhamnosidase, and to improve the efficiency of industrial production and reduce the cost of application. In this study, the  $\alpha$ -L-rhamnosidase gene screened from the thermophilic bacterium *Sulfolobus islandicus* was cloned and heterogeneously expressed in *Escherichia coli*. In addition, the enzymatic properties of recombinant SisRha was determined, and the enzymatic preparation process of isoquercetin was subsequently optimized. The results showed

收稿日期: 2021-05-23

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0600805)。

\* 通信作者: 赵林果(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物活性物质的研究与开发以及天然药物的生物催化与转化等研究。E-mail: lgzhao@njfu.edu.cn

that the recombinant SisRha was most active at 90 °C with excellent thermal stability, and the enzyme activity was hardly lost after incubation at 80 °C for 120 min. The optimum reaction pH of the enzyme was 5.5, and the enzyme was quite stable in the pH range of pH 4.5~7.0. The  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $k_{cat}$  values of the recombinant enzyme SisRha against pNPR as the artificial substrate were (0.15±0.03) mmol/L, (6.26±0.51) U/mg and (10.48±0.86) s<sup>-1</sup>, respectively. The specific enzymatic activities of SisRha on the substrates pNPR, rutin, epimedin C, naringin, hesperidin and icariin were 25.06, 11.89, 6.74, 3.14, 2.77, 0.42 U/mg, respectively. The optimum process of isoquercetin converted from rutin by the recombinant SisRha was as follows: 2 mmol/L rutin could be almost converted with a molar conversion rate of 98.56% using 0.40 U/mL enzyme dosage of the recombinant SisRha under 85 °C at pH 5.0 for 1 hour incubation. This study enriched the current resources of  $\alpha$ -L-rhamnosidase, established a theoretical foundation for the study of  $\alpha$ -L-rhamnosidase derived from thermophilic bacteria, and provided a method of converting rutin to isoquercetin at high temperature.

**Keywords:**  $\alpha$ -L-rhamnosidase, thermophilic bacteria, thermostability, rutin, isoquercetin

异槲皮素(isoquercitrin),又名异槲皮素-3-O-葡萄糖苷<sup>[1]</sup>,具有抗氧化<sup>[2]</sup>、抑制肿瘤与癌症<sup>[3]</sup>、调节免疫功能<sup>[4]</sup>、降低血糖血脂<sup>[5]</sup>等药理作用,还可用于抗抑郁药物的研发<sup>[6]</sup>,但其在植物中的含量极低,无法使用传统的提取方法进行大规模制备<sup>[7]</sup>。研究表明,芦丁(rutin)与异槲皮素拥有相同的母核结构,仅在异槲皮素葡萄糖基的C6位多连接了一个鼠李糖<sup>[8]</sup>,其在植物中含量较高,如槐花米中的含量高达28%<sup>[9]</sup>,但其药理活性、生物利用度等均不如异槲皮素<sup>[10]</sup>。因此,可以使用芦丁作为转化的底物制备异槲皮素。相较于化学法,生物转化法因其条件温和、高效环保、副产物少等优点,已成为大规模制备异槲皮素的一种较为可行的途径<sup>[11]</sup>。值得注意的是,生物转化法转化芦丁制备异槲皮素的关键是寻找高效的能作用于 $\alpha$ -1,6-鼠李糖苷键的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶。

$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶(EC 3.2.1.40)属于糖苷水解酶,可特异性切除糖苷类化合物非还原末端的 $\alpha$ -L-鼠李糖基<sup>[12]</sup>,在食品工业和医药领域有着广泛的应用<sup>[13-17]</sup>。目前已研究了多种细菌<sup>[18]</sup>和真菌<sup>[19]</sup>来源的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶,其中大部分 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶最适反应温度在40~60 °C<sup>[18-20]</sup>,属于中温酶,较难满足一些工业生产所需。另一方面,天然产物大多是水难溶或水不溶的化合物,在实际的工业生产中,常借助高温增加底物溶解度,提高传质速率,从而提高转化效率,同时较高的反应温度还能降低体系黏

度和避免杂菌污染等<sup>[21]</sup>,但这对参与反应的酶蛋白的热稳定性有着很高的要求。研究发现嗜热菌来源的酶蛋白普遍表现出优异的热稳定性<sup>[22]</sup>,在较高的反应温度下也能长时间保持良好的催化活力。然而,目前仅报道过少数嗜热菌来源的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶,如嗜热菌 *Thermomicrobium* sp.<sup>[23]</sup>、*Dictyoglomus thermophilum*<sup>[24-25]</sup>和 *Thermotoga petrophila* DSM 13995<sup>[26]</sup>等。因此,嗜热菌来源的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶资源值得进一步研究和开发。

在前期研究中,作者已从NCBI数据库中筛选到嗜热菌 *Sulfolobus islandicus* (NC\_021058.1)来源的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 SisRha 的基因序列,对其进行了重组质粒的构建及表达。在此基础上,作者首先优化了重组酶 SisRha 的表达条件,接着测定其酶学性质,然后优化了重组酶 SisRha 制备异槲皮素的工艺条件。研究结果丰富了现有的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶资源,为嗜热菌来源的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的研究奠定了基础,同时提供了一种高反应温度下转化芦丁制备异槲皮素的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与质粒

$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶基因 *sisRha* 来源于嗜热菌 *Sulfolobus islandicus* (NC\_021058.1),基因片段的全长为2 652 bp,可编码883个氨基酸,理论蛋白质相对分子质量约为1.005 4×10<sup>3</sup>,预测的等电点 pI 为

6.14。目的序列的全基因合成由上海捷瑞生物工程有限公司进行,表达宿主菌株 *Escherichia coli* (*E.coli*) BL21(DE3) 购自南京诺唯赞生物技术有限公司。

## 1.2 主要试剂

乙腈、甲醇、乙醇、二甲基亚砜(DMSO)、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾及其他常见生化试剂(均为国产分析纯):国药集团(上海)化学试剂有限公司产品;酵母提取物、蛋白胨:英国 Oxoid 公司产品;麦芽糊精:南京姜华玻璃有限公司产品;芦丁:上海甄准生物科技有限公司产品;异槲皮素标准品:成都曼思特生物技术有限公司产品;硫酸卡那霉素、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG):生物工程上海股份有限公司产品;蛋白质电泳缓冲液、预混蛋白质电泳 Marker:南京天为公司产品;对硝基苯酚鼠李糖糖苷(*p*NPR)、考马斯亮蓝 G-250:美国 Sigma 公司产品;Bradford 蛋白质含量检测试剂盒:日本 TaKaRa 公司产品;PAGE 凝胶快速制备试剂盒、质粒提取试剂盒:上海雅酶生物科技有限公司产品。

## 1.3 培养基

LB 培养基:1.0 g/dL 胰蛋白胨,0.5 g/dL 酵母提取物,1.0 g/dL 氯化钠。

TB 培养基:A 液为 1 g/dL 麦芽糊精(或其他碳源),1.2 g/dL 胰蛋白胨,2.4 g/dL 酵母提取物;B 液为磷酸二氢钾 2.3 g/dL,磷酸氢二钾 16.43 g/dL。A 液和 B 液体积比为 9:1。

## 1.4 主要仪器与设备

SX-500 型全自动高压蒸汽灭菌器:日本 TOMY 公司产品;HH-4 型恒温水浴锅:国华电器(常州)有限公司产品;SHP-250 型生化培养箱:上海精宏实验设备有限公司产品;U-1800 型分光光度计:日本 Hitachi 公司产品;超声波细胞破碎机:宁波新芝生物技术有限公司产品;5415R 型高速离心机、温度梯度 PCR 仪:德国 Eppendorf 公司产品;AIR TECH US-1300L-U 型超净工作台:苏州安泰空气技术有限公司产品;凝胶成像系统:美国 BIO-RAD 公司产品;Agilent 1260 型高效液相色谱仪:美国安捷伦科技有限公司产品。

## 1.5 实验方法

**1.5.1 重组菌的构建及表达** 将重组质粒 pET-28-*sisRha* 热激转化至 *E.coli* BL21(DE3) 的感受态细胞中,采用含有质量浓度 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的

LB 平板培养基进行筛选,37  $^{\circ}$ C 过夜培养后长出阳性转化子,挑取单菌落至 5 mL LB 试管中,于 37  $^{\circ}$ C 摇床过夜培养,使用 30%(体积分数)的甘油将菌种保存于-80  $^{\circ}$ C 冰箱。取 5  $\mu$ L 菌液加入含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素抗性的 5 mL LB 试管中,180 r/min、37  $^{\circ}$ C 摇床过夜复苏。

将 500  $\mu$ L 复苏后的菌液转接到 50 mL LB 培养基中,37  $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8,使用 0.01 mmol/L 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,28  $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 8 h。8 000 r/min、16  $^{\circ}$ C 离心 10 min 后收集菌体。加入 5 mL 25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液重悬菌体,超声破碎后于 10 000 r/min、16  $^{\circ}$ C 离心 15 min,测定上清液酶活力。

**1.5.2 酶活力的测定** 以 5 mmol/L *p*NPR 为底物,水解得到的对硝基苯酚(*p*NP)与碳酸钠发生显色反应,在 405 nm 的波长下测定产物的吸光度。反应体系为:10  $\mu$ L 500 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液,20  $\mu$ L 底物,65  $\mu$ L 去离子水,混匀预热后加入 5  $\mu$ L 酶,在酶的最适温度和 pH 下反应 5 min,以不加酶液的反应体系作空白对照<sup>[22]</sup>。酶活力单位定义参照文献<sup>[22]</sup>。*p*NP 标准曲线为  $y=2.376x+0.048$ ,决定系数  $R^2=0.999 0$ 。酶活计算公式为:

$$E=(c \times V_s)/(t \times V_e) \times N$$

式中: $E$  为  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶酶活力,U/mL; $c$  为酶反应后的 *p*NP 浓度, $\mu$ mol/L; $t$  为酶与底物反应时间,min; $V_s$  为反应体系的体积,mL; $V_e$  为反应体系中酶液的体积,mL; $N$  为酶液的稀释倍数。

**1.5.3 重组酶 *SisRha* 的表达条件优化** 首先优化 TB 培养基的碳源种类,将复苏菌液 500  $\mu$ L 分别接种至 5 瓶 50 mL 含质量浓度 1.00 g/dL 不同碳源(葡萄糖、蔗糖、甘油、菊粉、麦芽糊精)的 TB 培养基中,37  $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8,于 0.02 mmol/L IPTG 中诱导,28  $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 48 h 后分别测定粗酶酶活力,酶活力测定方法见 1.5.2。然后对 TB 培养基的碳源质量浓度(0.10、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 g/dL)、诱导温度(20、25、28、32、37、42  $^{\circ}$ C)以及 IPTG 浓度(0、0.005、0.010、0.050、0.100、0.250 mmol/L)进行优化。重组菌的培养与酶活力测定方法与上述一致。

**1.5.4 重组酶 *SisRha* 的纯化** 粗酶液置于 60  $^{\circ}$ C 水浴锅内热处理 30 min,10 000 r/min、16  $^{\circ}$ C 离心



15 min 后留上清液。采用镍离子亲和层析柱纯化上清液,用含不同浓度咪唑的磷酸缓冲液洗脱并收集洗脱液,再经透析后得到纯酶。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析纯酶,考马斯亮蓝法测定蛋白质质量。

### 1.5.5 重组酶 SisRha 的酶学性质

1) 最适温度和最适 pH 分别将重组酶置于 70~100 °C(不同温度间隔 5 °C)的水浴温度和 pH 为 4.0~8.0(不同 pH 间隔 0.5)的缓冲液中反应后测定吸光度,并计算相对酶活力,每次只改变一个变量,以测得的最高酶活力为 100%,确定最适温度和最适 pH。

2) 热稳定性和 pH 稳定性 将重组酶分别置于 80、85、90 °C 水浴锅中分别保温 5、10、15、30、60、90、120 min 后,在其最适温度和最适 pH 下测定剩余酶活力(相对酶活力),探究其热稳定性;70 °C 下将酶置于 pH 为 4.0~7.5(不同 pH 间隔 0.5)的缓冲溶液保温 1 h 测定剩余酶活力(相对酶活力),探究其 pH 稳定性。

3) 金属离子耐受性 向反应体系中分别添加终浓度为 1 mmol/L 和 3 mmol/L 的  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等金属离子盐溶液,以不含金属离子的酶活力为 100%,计算不同金属离子体系的相对酶活力。

4) 有机溶剂和鼠李糖耐受性 向反应体系添加体积分数 0、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40% 的甲醇、乙醇、二甲基亚砜(DMSO),以不含有有机溶剂的酶活力为 100%,测定有机溶剂对酶活力的影响;添加浓度 0、25、50、100、150、200、250 mmol/L 的鼠李糖,以不加鼠李糖的酶活力为 100%,探究鼠李糖(即产物)对酶活力的影响。

5) 动力学参数测定和底物特异性分析 将重组酶加至浓度 0.2~1.0 mmol/L(不同浓度间隔 0.1 mmol/L)的人工底物 pNPR 中反应 5 min 后测定其吸光度,按照米氏动力学方程计算其  $V_{\max}$ 、 $K_m$  及  $k_{\text{cat}}$ ;再分别以 50 mmol/L 的芦丁、淫羊藿苷、朝藿定 C、橘皮苷、柚皮苷为底物,于最适条件下测定重组酶 SisRha 的酶活力,以底物 pNPR 的酶活力为 100%,探究该酶对不同天然底物的底物特异性。

1.5.6 产物 HPLC 检测 所用色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18(5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm),流量 0.8 mL/min,进样量 10  $\mu\text{L}$ ,检测波长 368 nm,柱温 40 °C;

流动相为甲醇与 0.1%(质量分数)甲酸水混合液(体积比为 40:60)。芦丁出峰时间为 13.091 min,异槲皮素为 14.545 min<sup>[11]</sup>。以不同质量浓度异槲皮素及相对应的色谱峰面积绘制标准曲线,为  $y=21\ 456x-245.42$ ,决定系数  $R^2=0.999\ 5$ 。

### 1.5.7 重组酶 SisRha 转化芦丁的条件优化

1) 转化温度和 pH 优化 构建 100  $\mu\text{L}$  的反应体系,底物芦丁为 2 mmol/L,加酶量 0.1 U/mL,柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液浓度 50 mmol/L,去离子水补足至 100  $\mu\text{L}$ 。分别在 70~90 °C(不同温度间隔 5 °C)的水浴锅和 pH 4.5~7.0(不同 pH 间隔 0.5)的缓冲液中反应 2 h 后,加入 400  $\mu\text{L}$  甲醇终止反应,样品离心后,由 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,HPLC 检测异槲皮素的浓度并计算其产率,确定最适转化温度和 pH。

2) 加酶量优化 在最适转化温度和 pH 下,加入 0、0.02、0.04、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 U/mL 的重组酶 SisRha,反应 2 h 后 HPLC 检测,确定最适加酶量。

3) 反应历程检测 在最适转化温度、pH 和加酶量的条件下,分别于 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、120 min 时取样,加入 400  $\mu\text{L}$  甲醇终止反应,样品离心后,由 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,HPLC 检测,探究底物浓度与转化时间的关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组酶 SisRha 的表达条件优化

重组菌目的蛋白质的表达量条件优化的结果如图 1 所示。通过对比不同碳源培养条件下 SisRha 的相对酶活力,发现菊粉为最合适的碳源(见图 1(a));在对碳源含量进行优化时,培养基中菊粉的质量浓度为 0.50 g/dL 和 1.00 g/dL 时,重组酶 SisRha 的相对酶活力最高且二者几乎相同(见图 1(b));当诱导温度为 37 °C(见图 1(c))且不添加诱导剂时(图 1(d)),重组酶的酶活力最高,即使极微量的 IPTG(0.005 mmol/L)都会降低目的蛋白质的表达量,这可能是由于培养基中微量的乳糖足以启动目的基因的转录,其本底表达即可获得极高的表达。说明该酶的表达不需要依赖诱导剂 IPTG,这在实际应用中更有前景。综上所述,重组酶 SisRha 的最佳表达条件为:以 0.50 g/dL 的菊粉作 TB 培养基的碳源,不添加诱导剂,于 37 °C 摇床培养 48 h,表达量最高可至 0.92 U/mL,为 LB 培养基中的最佳表

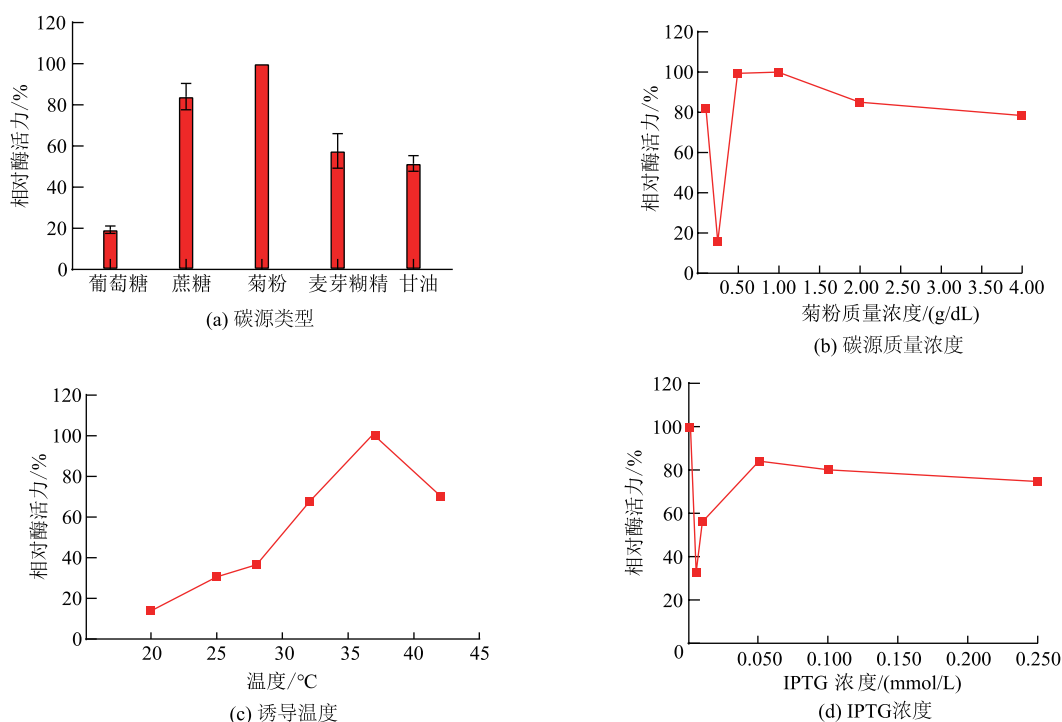


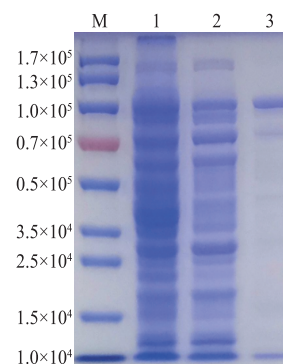
图 1 重组酶 SisRha 在 TB 培养基中的表达条件优化

Fig. 1 Optimization of expression conditions for recombinant enzyme SisRha in TB medium

达量(0.16 U/mL)的 5.75 倍。

## 2.2 重组酶 SisRha 的纯化及 SDS-PAGE 分析

通过超声破碎、热处理、亲和层析等方法对重组酶 SisRha 进行了纯化,并对粗酶液(超声破碎)、热处理的酶液以及亲和层析后的纯酶进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 2 所示,通过热处理,能去除大量非目的蛋白质,很大程度上降低了目的蛋白质后续的纯化难度,通过亲和层析,获得了较纯的目的蛋白质,在  $1.0 \times 10^5$  左右有单一的目的条带。如表 1 所示,纯酶的比活力为 10.76 U/mg,纯化倍数是粗酶的 12.92 倍,得率(纯酶总酶活力/粗酶总酶活力 $\times$ 100%)为 44.35%。获得的纯酶可应用于后续的酶学性质测定及芦丁的转化实验。



M. 标准蛋白质 Marker; 1. 粗酶; 2. 热处理酶; 3. 纯酶。

图 2 重组酶 SisRha 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant enzyme SisRha

表 1 重组酶 SisRha 的纯化及蛋白质质量

Table 1 Purification and protein content of recombinant enzyme SisRha

	总酶活力/U	总蛋白质质量/mg	比活力/(U/mg)	纯化倍数	得率/%
粗酶	97.33	116.81	0.83	1.00	100.00
热处理酶	85.02	59.19	1.44	1.72	87.35
纯酶	43.17	4.01	10.76	12.92	44.35

## 2.3 重组酶 SisRha 的酶学性质

### 2.3.1 重组酶 SisRha 的反应条件测定

1) 最适反应温度及热稳定性 重组  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 SisRha 来源于嗜热菌 *Sulfolobus islandicus*, 其最适生长温度在 80 °C 以上, 该重组酶很有可能为高温酶。因而本研究中使用人工底物 pNPR 对重组酶 SisRha 的最适温度进行测定, 结果表明, 重组酶 SisRha 最适温度为 90 °C (见图 3(a)), 比重组  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 PRHA2 的最适温度高出 30 °C<sup>[27]</sup>。

在实际应用中确定催化反应温度时, 除了考虑酶能保持较高的反应速率外, 还应考虑该温度下是否具有较为优良的热稳定性, 其热稳定性结果如图 3(b) 所示, 重组酶 SisRha 在 80 °C 下保温 2 h 后酶活力几乎没有改变, 而嗜热菌来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 TpeRha 在同样温度下保温 2 h 后酶活力损失 50% 左右<sup>[26]</sup>, 说明该酶具备优异的热稳定性。

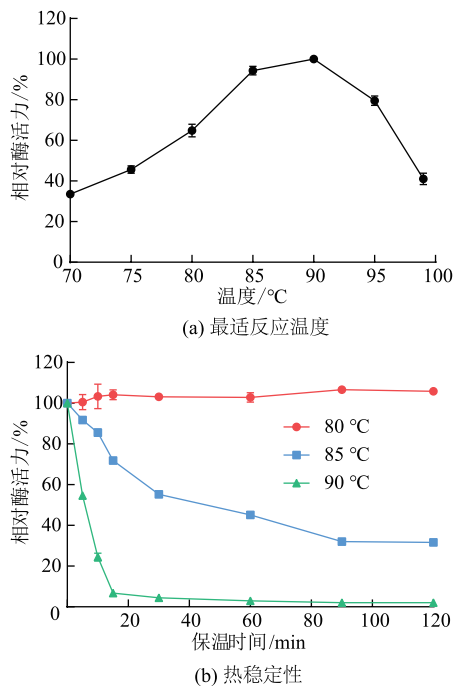


图 3 重组酶 SisRha 的最适反应温度及热稳定性

Fig. 3 Optimum temperature and thermostability of recombinant enzyme SisRha

2) 最适反应 pH 及 pH 稳定性 pH 环境的不同, 不仅会很大程度上影响酶的催化反应速率, 还会对酶蛋白的稳定性产生一定的影响。因此, 本研究中对重组酶 SisRha 的最适反应 pH 和该酶在不同 pH 条件下的稳定性进行了测定, 结果如图 4 所示。与 RhaA 最适反应 pH 7.8 不同<sup>[23]</sup>, 重组酶

SisRha 的最适 pH 为 5.5 (见图 4(a)), 且该酶在 pH 4.5~6.5 时相对酶活力保持在 80% 以上。70 °C 下, 重组酶 SisRha 在 pH 4.5~7.0 的缓冲体系中孵育 1 h, 均保留 80% 以上的残余酶活力 (见图 4(b)), 这与该酶最适 pH 测定曲线的趋势相同, 进一步证实该酶在弱酸环境下稳定性较好。

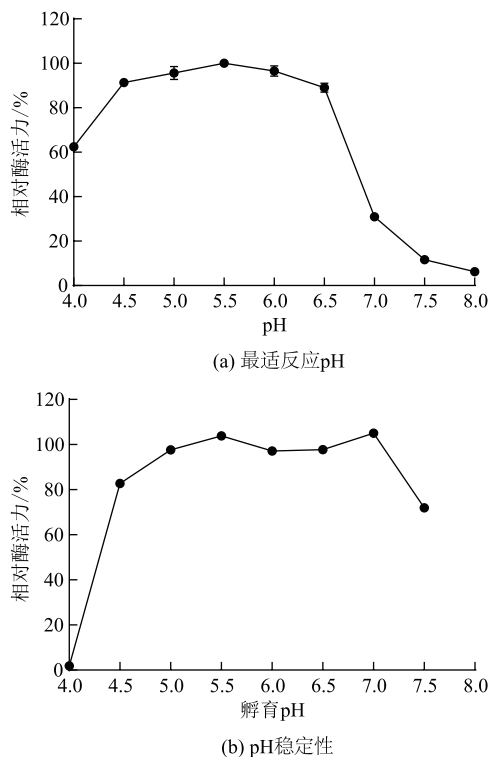


图 4 重组酶 SisRha 的最适 pH 和 pH 稳定性

Fig. 4 Optimum pH and pH stability of recombinant enzyme SisRha

2.3.2 金属离子对重组酶 SisRha 催化活性的影响 部分金属离子和螯合剂对重组酶 SisRha 酶活力的影响如表 2 所示, 少数金属离子对重组酶 SisRha 具有微弱的激活作用,  $Mn^{2+}$  具有相对明显的激活作用,  $Cu^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  则一定程度上抑制 SisRha 的酶活力; 螯合剂 EDTA 对重组酶 SisRha 的酶活力没有显著的影响, 因此金属离子对重组酶 SisRha 的催化活性和三维结构不起作用<sup>[28]</sup>。

2.3.3 重组酶 SisRha 的有机溶剂和鼠李糖耐受性 在工业生产过程中, 常添加一定浓度的有机溶剂增加底物的溶解度, 常用的助溶剂如甲醇、乙醇、二甲基亚砜 (DMSO) 等。本研究中以 pNPR 为底物, 在反应体系中分别加入不同体积分数的甲醇、乙醇、DMSO 测定了重组酶 SisRha 的有机溶剂耐受性。结

表 2 金属离子对重组酶 SisRha 的影响

Table 2 Effects of metal ions on recombinant enzymes SisRha

金属离子	相对酶活力/%	
	1 mmol/L	3 mmol/L
Fe <sup>3+</sup>	78.34±3.36	116.46±1.62
Ni <sup>2+</sup>	101.36±4.02	102.12±2.05
Na <sup>+</sup>	100.03±1.57	97.30±1.13
Sr <sup>2+</sup>	105.18±7.01	106.90±1.46
Ca <sup>2+</sup>	101.66±4.59	94.95±2.41
Cu <sup>2+</sup>	67.34±1.91	62.54±1.02
Li <sup>+</sup>	106.58±2.11	96.79±0.87
Co <sup>2+</sup>	107.80±7.11	96.00±2.09
Zn <sup>2+</sup>	72.78±1.12	57.29±0.51
Mn <sup>2+</sup>	133.78±1.42	137.34±4.02
Mg <sup>2+</sup>	99.95±3.23	99.49±0.49
Ba <sup>2+</sup>	102.22±4.06	99.92±1.86
K <sup>+</sup>	103.07±4.00	100.98±1.58
EDTA	102.96±4.31	98.00±2.58
Al <sup>3+</sup>	102.95±2.15	23.12±2.51
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	93.61±5.58	98.71±0.54

果如图5(a)所示,重组酶 SisRha 对 DMSO 的耐受性优于甲醇和乙醇,DMSO 体积分数为 10%时,残余酶活力(相对酶活力)大于50%。

在糖苷水解酶反应过程中,产物糖的积累会对酶的催化效率产生一定程度的抑制作用,因此,对产物糖的耐受能力的大小,一定程度上决定了糖苷水解酶能水解的底物浓度大小以及催化效率的高低。为确定重组酶 SisRha 对产物鼠李糖的耐受能力,本研究中以 *p*NPR 为底物,在反应体系中分别加入不同终浓度的 *L*-鼠李糖,测定重组酶 SisRha 的鼠李糖耐受性。结果显示,约添加 20 mmol/L 鼠李糖时,该酶保留有 50%左右的残余酶活力(相对酶活力,见图 5(b))。

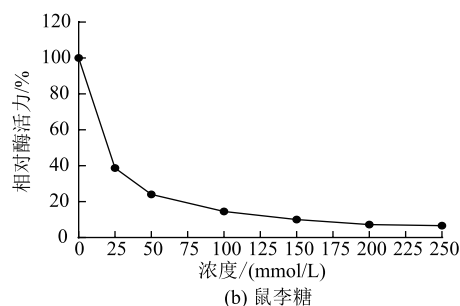
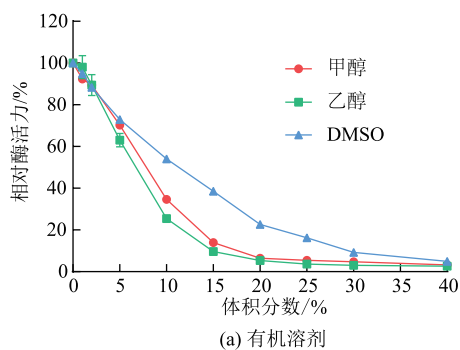


图 5 重组酶 SisRha 的有机溶剂和鼠李糖耐受性

Fig. 5 Tolerance of organic solvent and rhamnose on recombinant enzyme SisRha

### 2.3.4 重组酶 SisRha 的动力学参数及底物特异性分析

为确定重组酶 SisRha 的底物特异性,首先选取人工底物 *p*NPR、*p*NPG、*p*NPX、*p*NPAraf、*p*NPArap 作为底物进行反应,以确定重组酶 SisRha 能切除的糖苷类型,结果如表 3 所示。重组酶 SisRha 仅作用于人工底物 *p*NPR(与鼠李糖相连),比活力为 25.06 U/mg,而对 *p*NPG(与葡萄糖相连)、*p*NPX(与木糖相连)、*p*NPAraf(与阿拉伯呋喃糖相连)和 *p*NPArap(与阿拉伯吡喃糖相连)等其他人工底物无作用。由此可以确定重组酶 SisRha 为鼠李糖苷酶,仅专一识别鼠李糖苷键,而对其他种类的糖苷键没有催化作用。

表 3 重组酶 SisRha 的底物特异性

Table 3 Substrate specificity of recombinant enzyme SisRha

底物	比活力/(U/mg)	相对酶活力/%
<i>p</i> NPR	25.06	100.00
<i>p</i> NPG	—	—
<i>p</i> NPX	—	—
<i>p</i> NPAraf	—	—
<i>p</i> NPArap	—	—
芦丁	11.89	47.45
朝藿定 C	6.74	26.92
柚皮苷	3.14	12.55
橘皮苷	2.77	11.04
淫羊藿苷	0.42	1.68

随后测定了重组酶 SisRha 对几种典型的含有鼠李糖基的黄酮类化合物的催化能力,相较于人工底物 *p*NPR(100%),重组酶 SisRha 对芦丁( $\alpha$ -1,6-鼠李糖苷键)的催化效率最高,表现出 47.45%的相对酶活力,朝藿定 C( $\alpha$ -1,2-鼠李糖苷键)次之,对橘皮苷( $\alpha$ -1,6-鼠李糖苷键)和柚皮苷( $\alpha$ -1,2-鼠李糖苷键)只有大约 10%的相对酶活力,对淫羊藿苷



( $\alpha$ -1-鼠李糖苷键)几乎无酶活力。这是由于不同的糖苷键类型及与母核连接的位置会影响酶的催化活性中心与底物的结合,从而影响酶的催化活性<sup>[29]</sup>。芦丁和橘皮苷都通过  $\alpha$ -1,6-鼠李糖苷键与  $\beta$ -D-葡萄糖连接,芦丁的糖基连在黄酮的 C3 位,而橘皮苷的糖基连在 C7 位,两者的空间结构差异导致酶的催化活性有所不同。相较于切除  $\alpha$ -1,2-鼠李糖苷键,重组酶 SisRha 对  $\alpha$ -1,6-鼠李糖苷键的切除能力更强,并对连在 C3 位置的糖基的切除效果更好,这与 RhaA 的底物特异性结果刚好相反<sup>[23]</sup>。随后又进一步研究了重组酶 SisRha 对 *p*NPR 的动力学常数,以确定其底物亲和力和催化效率。结果如表 4 所示,重组鼠李糖苷酶 SisRha 对人工底物 *p*NPR 亲和力较好, $K_m$  值为  $(0.15\pm 0.03)$  mmol/L, $V_{max}$  值为  $(6.26\pm 0.51)$  U/mg, $K_{cat}$  值为  $(10.48\pm 0.86)$  s<sup>-1</sup>; $K_{cat}/K_m$  为  $(73.28\pm 11.56)$  L/(s·mmol)。

表 4 重组酶 SisRha 的反应动力学参数

Table 4 Kinetic parameters of recombinant enzyme SisRha

底物	$K_m /$ (mmol/L)	$V_{max} /$ (U/mg)	$K_{cat} /$ s <sup>-1</sup>	$K_{cat} / K_m /$ (L/(s·mmol))
<i>p</i> NPR	0.15±0.03	6.26±0.51	10.48±0.86	73.28±11.56

### 2.4 重组酶 SisRha 转化芦丁的条件优化

由 2.3.4 的结果可知,在天然底物的催化中,重组酶 SisRha 对芦丁的催化能力最强,因此本研究中

选取芦丁作为转化底物,对该酶水解芦丁制备异槲皮素的反应条件进行进一步探究。首先优化了重组酶 SisRha 转化芦丁的反应温度、pH 以及加酶量,结果如图 6 所示。当反应温度为 85 °C(见图 6(a)),反应 pH 为 5.0 时(见图 6(b)),芦丁的转化效率最高。这与重组酶 SisRha 的最适反应温度和 pH 相比均有所下降,主要是由于芦丁转化时间比 *p*NPR 反应时间长,转化过程中既要使酶发挥最佳的催化活性,又要确保酶的稳定性不能太差。而该酶的酶学性质表明 85 °C 时既能发挥相对较高的催化活性还能避免酶活力的大量损失;另一方面,不同底物与酶的催化活性中心结合情况不同,导致最适反应 pH 也有所差异。在此基础上又探究了重组酶 SisRha 的加酶量对芦丁转化率的影响,结果表明仅添加 0.40 U/mL 重组酶 SisRha,可将 2 mmol/L 底物芦丁几乎完全转化,摩尔转化率高达 98.56%(见图 6(c)),相较于酸水解法转化率提高了 50%左右<sup>[30]</sup>。

为探究重组酶 SisRha 转化芦丁生成异槲皮素的反应中底物与产物的变化趋势,对反应历程进行了监测。结果如图 6(d)所示,反应初始时,反应体系内仅有 2 mmol/L 芦丁存在,随着反应时间的不断增加,底物芦丁的浓度逐渐减少,同时伴随着产物异槲皮素浓度的逐渐上升。至反应 60 min 左右,产物异槲皮素的浓度达到最高水平,并保持稳定,而底物芦丁则几乎完全转化(见图 6(d))。

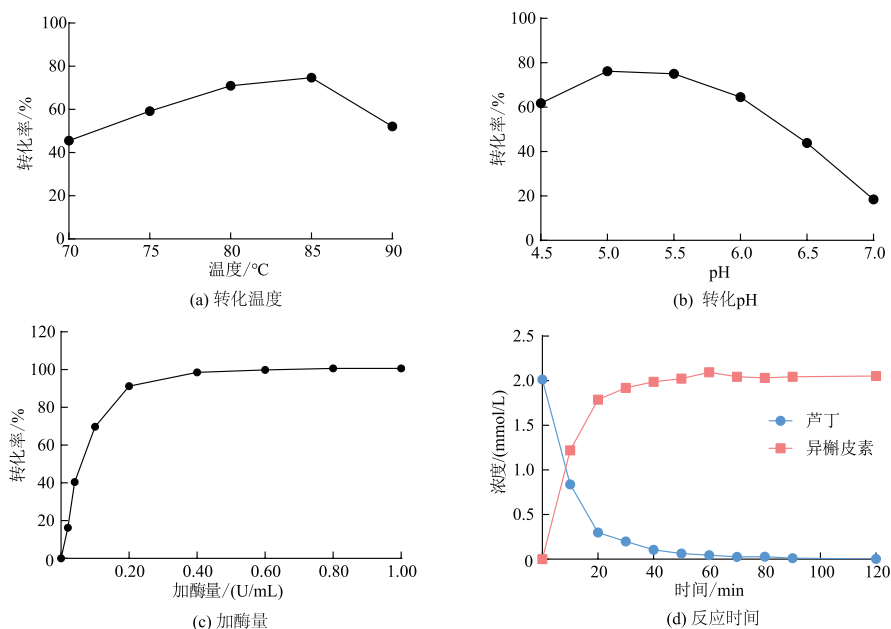


图 6 重组酶 SisRha 转化芦丁的条件优化与反应历程

Fig. 6 Optimization of conversion conditions for rutin with recombinant enzyme SisRha and the reaction process



### 3 结 语

作者表达定性了一种嗜热菌 *Sulfolobus islandicus* 来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 SisRha, 重组酶 SisRha 最适反应温度为 90 °C, 具有优异的热稳定性, 并且在 pH 4.5~7.0 的环境下能保持优良的稳定性。重组酶 SisRha 具有切除  $\alpha$ -L-鼠李糖苷键 (与苷元直接相连)、 $\alpha$ -1,6-鼠李糖苷键、 $\alpha$ -1,2-鼠李糖苷键的能力。该酶对天然底物芦丁的催化效率较高, 利用该

酶水解芦丁制备异槲皮素的适宜反应条件为用酶量 0.40 U/mL, 在 85 °C、pH 为 5.0 的反应体系中反应 60 min。此条件下, 可将 2 mmol/L 底物芦丁几乎完全转化, 摩尔转化率可达 98.56%。本研究不仅丰富了现有  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶资源, 为嗜热菌来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的研究奠定了基础, 同时还提供了一种高温条件下转化芦丁制备异槲皮素的方法, 为生物酶法制备异槲皮素的研究提供了技术支撑。

### 参考文献:

- [ 1 ] DO-YEON K, SOO-JIN Y, CHANG-SU P, et al. Effect of high hydrostatic pressure treatment on isoquercetin production from rutin by commercial  $\alpha$ -L-rhamnosidase[J]. **Biotechnology Letters**, 2016, 38(10) : 1775-1780.
- [ 2 ] ARTI N, ENKHTAIVAN G, GYUN-SEOK P, et al. Novel insights on the multi-functional properties of flavonol glucosides from red onion (*Allium cepa* L.) solid waste: *in vitro* and *in silico* approach[J]. **Food Chemistry**, 2020, 335 : 1-8.
- [ 3 ] SAHREEN S, KHAN M R, KHAN R A, et al. Estimation of flavonoids, antimicrobial, antitumor and anticancer activity of *Carissa opaca* fruits[J]. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2013, 13(1) : 372-386.
- [ 4 ] SHI Y W, CHEN X Y, LIU J X, et al. Isoquercetin improves inflammatory response in rats following ischemic stroke[J]. **Frontiers in Neuroscience**, 2021, 15 : 1-14.
- [ 5 ] ZHANG R, YAO Y, WANG Y P, et al. Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK -A<sup>y</sup> mice[J]. **Nutrition & Metabolism**, 2011, 8(1) : 85-90.
- [ 6 ] FATMA T G D, MERT I, ESRA K A, et al. Identification of the main active antidepressant constituents in a traditional Turkish medicinal plant, *Centaurea kurdica* Reichardt[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2020, 25(6) : 1-11.
- [ 7 ] NAVEEN P, LINGARAJU H B, ANITHA, et al. Simultaneous determination of rutin, isoquercetin, and quercetin flavonoids in *Nelumbo nucifera* by high-performance liquid chromatography method[J]. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, 2017, 7(2) : 94-100.
- [ 8 ] LUTHAR Z, GERM M, LIKAR M, et al. Breeding buckwheat for increased levels of rutin, quercetin and other bioactive compounds with potential antiviral effects[J]. **Plants**, 2020, 9(12) : 1-13.
- [ 9 ] LEE S C. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2013, 150(3) : 805-817.
- [10] DONG-SHIN K, SANG-BIN L. Optimization of subcritical water hydrolysis of rutin into isoquercetin and quercetin[J]. **Preventive Nutrition and Food Science**, 2017, 22(2) : 131-137.
- [11] 房仙颖, 章祎唯, 萧伟, 等. 异槲皮素的制备及研究进展[J]. **天然产物研究与开发**, 2020, 32(4) : 708-717.
- [12] LI L J, 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.
- [13] LI L J, WU Z Y, YU Y, et al. Development and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase mutant with improved thermostability and a higher efficiency for debittering orange juice[J]. **Food Chemistry**, 2018, 245 : 1070-1078.
- [14] ZHANG R, ZHANG B L, LI G C, et al. Enhancement of ginsenoside Rg (1) in *Panax ginseng* hairy root by overexpressing the  $\alpha$ -L-rhamnosidase gene from *Bifidobacterium breve*[J]. **Biotechnology Letters**, 2015, 37(10) : 2091-2096.
- [15] WU T, PEI J J, GE L, et al. Characterization of a  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* with high catalytic efficiency of epimedin C[J]. **Bioorganic Chemistry**, 2018, 81 : 461-467.

- [16] SHIN K C ,SEO M J ,OH D K , et al. Cloning and characterization of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Chloroflexus aurantiacus* and its application in the production of isoquercitrin from rutin[J]. **Biotechnology Letters**, 2019, 41(3): 419-426.
- [17] 郭子彬,胡基志,姜宇,等. 黑曲霉所产  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁[J]. 南昌大学学报(理科版), 2017, 41(6): 561-566.
- [18] JULES B, DANIELA M, SAMUELE V, et al. Characterization of rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2009, 75(11): 3447-3454.
- [19] YADAV S, YADAVA S, YADAV K D S. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Penicillium corylophorum* MTCC-2011[J]. **Process Biochemistry**, 2013, 48(9): 1348-1354.
- [20] 张霞,李利君,倪辉,等. 微生物来源  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的分子和结构生物学研究进展[J]. 生命科学研究, 2015, 19(1): 68-74.
- [21] HUANG J, XIE D F, FENG Y. Engineering thermostable (R)-selective amine transaminase from *Aspergillus terreus* through *in silico* design employing B-factor and folding free energy calculations[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017, 483(1): 397-402.
- [22] 许锦,徐佳慧,张小濛,等. 源自嗜热菌的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶交联聚集体的制备及应用[J]. 林业工程学报, 2020, 5(2): 122-129.
- [23] HAKON B, GUDMUNDUR O H, OLAFUR H F, et al. Two new thermostable  $\alpha$ -L-rhamnosidases from a novel thermophilic bacterium[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2004, 34: 561-571.
- [24] SAIKI T, KOBAYASHI Y, KAWAGOE K, et al. *Dictyoglomus thermophilum* gen. nov., sp. nov., a chemoorganotrophic, anaerobic, thermophilic bacterium[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 1985, 35(3): 253-259.
- [25] COIL D A, BADGER J H, FORBERGER H C, et al. Complete genome sequence of the extreme thermophile *Dictyoglomus thermophilum* H-6-12[J]. **Genome Announc**, 2014, 2(1): 109-114.
- [26] XIE J C, ZHANG S C, TONG X Y, et al. Biochemical characterization of a novel hyperthermophilic  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Thermotoga petrophila* and its application in production of icaritin from epimedien C with a thermostable  $\beta$ -glucosidase[J]. **Process Biochemistry**, 2020, 93: 115-124.
- [27] 郭双双,郑芳芳,可丛雪,等. 乳酸片球菌 AS1.2696 来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶酶学性质分析[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 160-169.
- [28] LI L J, 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.
- [29] MONTI D, PISVEJCOVA A, KREN V, et al. Generation of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2004, 87(6): 763-771.
- [30] 权彦,田咏华. 芦丁水解制取槲皮素工艺改良研究[J]. 科技风, 2014(19): 79.