黑曲霉液态发酵产柚苷酶的分离纯化及其性质研究

王维娜[1]，李佥[1]，田晶[1]，费旭[2]，徐龙权[2]，廉萌[1]
(1. 大连工业大学生物工程学院，辽宁大连 116034) (2. 大连工业大学现代教育技术部，辽宁大连 116034)

摘要： 本文针对黑曲霉液态发酵所产柚苷酶的分离纯化工艺及其酶学性质进行研究。将黑曲霉液态发酵所产酶液，依次通过30%~70%硫酸铵盐析、膜透析和 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析后得到高纯度柚苷酶。经 SDS-PAGE 凝胶电泳仅得到一条清晰条带，分子量约为 65.10 ku。纯化获得的柚苷酶比酶活可达 6932.54 U/mg，纯化倍数和酶活回收率分别为 13.82 倍和 13.30%，并且能有效水解柚皮苷。进一步研究发现，该酶的最适反应 pH 为 4.5，最适作用温度为 50 ℃，在 20 ℃~50 ℃及 pH 3.0~6.0 范围内有良好的稳定性。在一定浓度范围内，K^+、Ca^{2+}和 Na^+对柚苷酶活性有促进作用，而 Fe^{3+}、SDS 和 EDTA-Na_2 对其活性有明显的抑制作用。本研究为深入理解柚苷酶分离纯化过程，明确其酶学性质，进一步探索柚苷酶应用于天然活性产物生物转化过程的相关机制提供了基础数据，具有非常重要的科学意义和潜在的应用价值。

关键词： 黑曲霉；液态发酵；柚苷酶；纯化；酶学性质
文章篇号： 1673-9078(2016)07-72-78 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.012

Isolation, Purification, and Properties of Naringinase Produced from *Aspergillus niger* FFCC 848 by Liquid Fermentation

WANG Wei-na[1], LI Qian[1], TIAN Jing[1], FEI Xu[2], XU Long-quan[2], LIAN Meng[1]
(1.School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)
(2.Modern Education Technical Department, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: The isolation, purification, and enzymatic properties of naringinase produced by liquid fermentation with *Aspergillus niger* FFCC 848 were investigated. The fermentation broth produced from liquid fermentation by *A. niger* FFCC 848 was purified by ammonium sulfate fractional precipitation, dialysis, and DEAE-Sepharose FF anion exchange chromatography to yield highly purified naringinase. Only one clear band was observed upon sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, with a molecular weight of 65.10 ku. The final, purified naringinase showed 13.82-fold purification, with an enzyme activity recovery of 13.30% and specific activity of 6932.54 U/mg, and the enzyme could effectively hydrolyze naringin. Furthermore, the activity of naringinase was stable at 20–50°C and pH 3.0–6.0; optimum activity was observed at 50°C and pH 4.5. In a specific concentration range, the enzyme activity was enhanced by K^+, Ca^{2+}, and Na^+, but was strongly inhibited by Fe^{3+}, SDS, and EDTA-Na_2. This study provides a basis for understanding the purification of naringinase and for further studies of the related mechanism underlying the bioconversion of bioactive natural products with naringinase.

Key words: *Aspergillus niger*; liquid fermentation; naringinase; purification; enzymatic properties

柚苷酶（EC 3.2.1.40）是由 α-L-鼠李糖苷酶和 β-D-葡萄糖苷酶组成，同时具有 α-L-鼠李糖酶和 β-D-葡萄糖苷酶的活性。因其能水解柚苷类果汁中的苦味物质柚皮苷，使其为低苦味物质，因此在柑桔类水果加工、食品增香、制药工业等方面具有重要用途[1]。在柚苷酶水解柚皮苷脱苦的过程中，α-L-鼠李糖苷酶首先将柚皮苷（4,5,7-三羟基二氢黄酮-7-鼠李葡萄苷）水解为L-鼠李糖和普鲁宁，然后 β-D-葡萄糖苷酶将普鲁宁水解为葡萄糖和非可逆的柚皮素（4,5,7-三羟基二氢黄酮）以达到脱苦的作用。由于第一步反应的关键性作用，因此有很多学者将 α-L-鼠李糖苷酶的活性等同于柚苷酶的活性进行研究[2]。

柚苷酶的来源广泛，包括植物、动物和微生物。目前柚苷酶主要由微生物发酵获得，常用菌种为曲霉属和青霉属真菌。其中，黑曲霉的液态发酵工艺研究较为深入，具有操作简便、不易受杂菌污染并且产量较高的优点。另一个重要的研究方向是如何获得高纯

收稿日期：2015-07-21
基金项目：辽宁省自然科学基金（2013020167）；辽宁省教育厅科学研究一般项目（L2015045）；大连工业大学青年基金（67007908）
作者简介：王维娜（1990-），女，在读研究生，研究方向：生物催化与生物分析
通讯作者：李佥（1982-），女，博士，讲师，研究方向：生物催化与生物分析；田晶（1966-），女，博士，教授，研究方向：生物催化与生物分析

度柚苷酶。文献报道，胡群芳等[3]采用硫酸铵沉淀、疏水层析、HiTrap Blue HP 亲和层析和 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤层析分离到一种分子量为 160 ku 的 *α*-L-鼠李糖苷酶；Koseki 等[4]采用硫酸铵沉淀、DEAE-5PW 离子层析、超滤和 G3000-SWXL 凝胶层析得到分子量为 90 ku 的 *α*-L-鼠李糖苷酶；Chang 等[5]利用 *Aspergillus sojae* 发酵产生柚苷酶，依次通过硫酸铵沉淀、Q-sepharose 离子层析、超滤和 Superdex 200 凝胶层析得到分子量为 70 ku 的柚苷酶，对柚皮苷具有较高的的转化效率，同时该菌株也产生低活性的 *β*-D-葡萄糖苷酶；Puri 等[6]对 *Aspergillus niger*1344 发酵液进行超滤、硫酸铵沉淀、Q-sepharose 离子层析、超滤及 Superdex G-200 凝胶层析后得到电泳纯 *α*-L-鼠李糖苷酶。目前，国内外关于柚苷酶的研究虽然取得了很多进展，但由于发酵所得粗酶液的酶活力较低，而下游分离纯化工艺往往占生产总成本的 40%~50%[7]，使得柚苷酶制剂产品的价格居高不下。因此，如何通过较少的分离纯化步骤即可获得高纯度柚苷酶，是降低生产成本、提高酶活回收率和扩大柚苷酶工业化应用范围的关键问题。

本研究采用实验室自主保藏的 1 株黑曲霉进行液态发酵生产柚苷酶，通过简单的硫酸铵盐析、膜透析和一步离子交换层析即可获得高纯度柚苷酶，同时对影响该酶酶学性质的各因素进行了深入探讨。本工作不仅能够减少柚苷酶的分离纯化步骤，在一定程度上降低生产成本，还为深入了解柚苷酶酶学性质和柚苷酶生物转化过程的相关机制研究提供了基础数据，对推动柚苷酶生产，拓宽其应用研究领域具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株：黑曲霉 FFCC 848，大连工业大学菌种保藏中心保藏。

材料：牛血清白蛋白（BSA），购自国药集团化学试剂有限公司；柚皮苷（≥98%），购自宝鸡市方晟生物开发有限公司；普鲁宁（≥98%），上海源叶生物科技有限公司；SDS-PAGE 凝胶电泳标准蛋白，购自中国科学院上海生化研究所；考马斯亮蓝 R-250，天津光复化学试剂厂；DEAE-Sepharose FF，购自 Pharmacia 公司；薄层层析板，德国 Merk 公司提供。其他化学试剂皆为分析纯。

仪器设备：Lambda-35 型紫外分光光度计，购自美国 PE 公司；HH-8 数显恒温水浴锅，购自江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司；真空冷冻干燥机，北京比朗实验设备有限公司；TGL-16G 高速离心机，购自上海安亭科学仪器厂；电泳用 MV-IIA 型双垂直板电泳槽、JM-250 型电泳仪，购自大连竞迈生物科技有限公司。

1.2 培养基

斜面培养基（g/L）：$NaNO_3$ 3.0，$FeSO_4\cdot7H_2O$ 0.01，$K_2HPO_4\cdot12H_2O$ 1.0，$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.5，KCl 0.5，蔗糖 30.0，琼脂 20.0，柚皮苷 2.0，pH 6.0。

液体发酵培养基（g/L）：$KH_2PO_4\cdot2H_2O$ 1.5，$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.5，$(NH_4)_2SO_4$ 4.0，$ZnSO_4\cdot7H_2O$ 0.09，$CaCl_2$ 0.1，豆粉 2.0，蛋白胨 2.0，酵母浸粉 1.0，柚皮苷 6.0，pH 6.0。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种的培养

将黑曲霉 FFCC 848 孢子转接到斜面培养基上，于 30 ℃恒温培养 4~5 d，待斜面上长满黑褐色孢子后，用 0.9%（*m*/*V*）无菌生理盐水将孢子洗下，加入到装有玻璃珠的锥形瓶中，30 ℃振荡培养 l h 后配成 OD_{600} 为 0.2 的孢子悬浊液，按 10%（*V*/*V*）接种量接种于液体发酵培养基中，30 ℃，180 r/min 培养 4~5 d。

1.3.2 粗酶液的预处理

取 400 mL 发酵液经 4 层纱布过滤，于 4 ℃、4500 r/min 冷冻离心 20 min 后取上清液，即为粗酶液。

1.3.3 硫酸铵分级沉淀

取一定体积的粗酶液分别加入硫酸铵粉末至饱和度为 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%和 90%，边加边搅拌，以防止局部硫酸铵浓度过大而造成酶的失活，并于 4 ℃静置沉淀过夜，然后 10000 r/min 冷冻离心 20 min，沉淀用一定体积磷酸盐缓冲液（10 mM，pH 5.0）溶解后，测定沉淀中的柚苷酶活性和总蛋白浓度。

1.3.4 透析脱盐

由于硫酸铵的存在会影响后续柚苷酶的分离纯化效果，因此采用透析法进行脱盐处理。将经过盐析的沉淀重新溶解于磷酸盐缓冲液（10 mM，pH 5.0）中，置于透析袋（截留分子量 7000~14000）中透析 2 d，每隔 4~5 h 更换一次透析液，取透析袋中溶液离心并收集上清液。

1.3.5 离子交换层析

将脱盐后的酶液加入到已用磷酸盐缓冲液（10 mM，pH 5.0）平衡的 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析柱（φ1.6 cm×10 cm）中，首先用 1~2 倍柱体积

的缓冲液将未吸附的蛋白洗脱下来（衡洗阶段），再用缓冲液配制 50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM 和 400 mM NaCl 溶液进行阶段洗脱，洗脱速度为 1 mL/min，洗脱体积为 400 mL。同时，用部分收集器按 3 mL/管收集各段组分，并在波长 280 nm 处进行紫外吸收检测各峰值部分的酶活。确定并收集具有柚苷酶活性的洗脱液，并进行透析脱盐和超滤浓缩处理。

1.3.6 SDS-PAGE 凝胶电泳对分子量的测定

采用 SDS-PAGE 凝胶电泳对纯化得到的柚苷酶进行纯度检验及分子量大小的测定。配制的浓缩胶浓度为 12%，分离胶浓度为 5%。将样品、标准蛋白分别与相同体积 2×上样缓冲液混合后煮沸 5~10 min，10000 r/min 离心 3 min 后即可上样，上样量为 10~20 μL，先在 80 V 电压条件下电泳至浓缩胶与分离胶交汇处，换用 120 V 电压继续电泳至溴酚蓝指示剂前端到达凝胶下缘 1 cm 处停止。将胶片在考马斯亮蓝 R-250 染色液中染色后，加入脱色液震荡脱色，用已知分子质量的标准蛋白为参照，绘制迁移曲线并计算纯化后所得柚苷酶的分子质量。

1.3.7 柚苷酶对柚皮苷的酶解转化

取 1 mL 柚皮苷溶液（0.8 mg/mL）与适量柚苷酶溶液在 50 ℃、pH 4.5 的条件下反应 30 min 后，加入 2 倍体积的水饱和正丁醇溶液终止反应，于 4000 r/min 离心 5 min 后取上层液（正丁醇层）进行薄层层析分析，并与柚皮苷标准品进行对照。展开剂的配比为正丁醇：乙酸：水为 40:11:29（*V/V*）[8]，以 10%（*m/V*）的硫酸溶液作为显色剂。

1.4 测定方法

1.4.1 蛋白浓度的测定

以牛血清白蛋白作为标准物，采用改进的 Bradford 法[9]，用考马斯亮蓝 G-250 染色，于波长 595 nm 处测定标准系列溶液的吸光值，根据绘制的标准曲线计算蛋白浓度。

1.4.2 柚苷酶活性的测定

采用改进的 Davis 法[10]：取 0.8 mL 的柚皮苷溶液（pH 4.5，0.8 mg/mL）和 0.2 mL 酶液分别置于 50 ℃恒温水浴中保温 4~5 min，然后将二者混合均匀并反应 30 min。取 0.1 mL 反应液，加入 5 mL 二甘醇（90%，*V/V*）和 0.1 mL 的氢氧化钠溶液（4 mol /L），在室温下反应 10 min，于波长 420 nm 处测定溶液的吸光值。

柚苷酶活力单位定义：在 pH 4.5、50 ℃的条件下，1 min 水解 1 μg 的柚皮苷所需的酶量为 1 个酶活性单位（U/mL）。

1.5 柚苷酶酶学性质的研究

1.5.1 温度对柚苷酶酶活的影响

将纯化的酶液和柚皮苷分别于 20 ℃、30 ℃ 、40 ℃ 、45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃、70 ℃和 80 ℃，pH 4.5 的条件下反应 30 min，于波长 420 nm 处测吸光值，以其中最高的酶活为 100%，计算其他条件的相对酶活。

1.5.2 温度对柚苷酶稳定性的影响

将纯化的酶液分别于 20 ℃、30 ℃ 、40 ℃ 、45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃、70 ℃和 80 ℃的条件下保温 1 h；另取纯化的酶液于 40 ℃ 、50 ℃和 60 ℃的条件下保温 1 h、2 h、3 h、4 h、6 h 和 8 h，将保温后的酶液与柚皮苷在 pH 4.5、50 ℃的条件下反应 30 min，于波长 420 nm 处测吸光值，以未保温的酶活为 100%，计算其他条件的相对酶活。

1.5.3 pH 对柚苷酶酶活的影响

将纯化的酶液和底物分别于 pH 值为 2.0、3.0、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0 和 8.0 的磷酸盐缓冲液中溶解，50 ℃反应 30 min，于波长 420 nm 处测定溶液的吸光值，以其中最高的酶活为 100%，计算其他条件的相对酶活。

1.5.4 pH 对柚苷酶稳定性的影响

将纯化的酶溶解在 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0 和 8.0 的磷酸盐缓冲液中，4 ℃放置 24 h，然后将其 pH 调至 4.5，与底物在 50 ℃条件下反应 30 min，于波长 420 nm 处测定溶液的吸光值，以其中最高的酶活为 100%，计算其他条件的相对酶活。

1.5.5 金属离子及化合物对柚苷酶稳定性的影响

将纯化的酶液加入终浓度分别为 1 mM、5 mM、10 mM、20 mM、50 mM 和 100 mM 不同金属离子及化合物溶液中，其中金属离子分别为 K^+、Ca^{2+}、Na^+、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{3+}、Fe^{2+}、Cu^{2+}、Mn^{2+}和 Ba^{2+}，化合物为 SDS、DTT 和 EDTA-Na_2。常温条件下放置 24 h 后，测定各实验组的柚苷酶活性。以空白对照（即未加入上述金属离子及化合物的实验组）的相对酶活为 100%。

1.5.6 数据分析

每组实验均设置 3 个平行并重复 3 次，利用 SPSS 19.0 统计软件和 Origin 8.5 科学绘图软件对实验数据进行分析和处理。

2 结果与讨论

2.1 柚苷酶的分离纯化工艺研究

2.1.1 硫酸铵分级沉淀

对硫酸铵盐析所得沉淀的酶活和蛋白浓度进行测定，结果如图 1 所示。从图中可以看出，当硫酸铵饱和度达到 30%时，蛋白浓度为 0.05 mg/mL，相对活性将近 25%，目的蛋白仍未大量沉下；当硫酸铵饱和度达到 70%时，柚苷酶酶活和总蛋白浓度迅速增加，且相对酶活和蛋白浓度均达到较大值，说明此时大部分柚苷酶被盐析沉淀下来；至饱和度为 90%时，柚苷酶酶活无明显变化，蛋白浓度有略微增加，说明此时沉下的大多是杂蛋白；综合分析实验结果，为减少杂蛋白的干扰及对后续分离造成的困难，选取 30%~70%硫酸铵饱和度用于盐析操作。

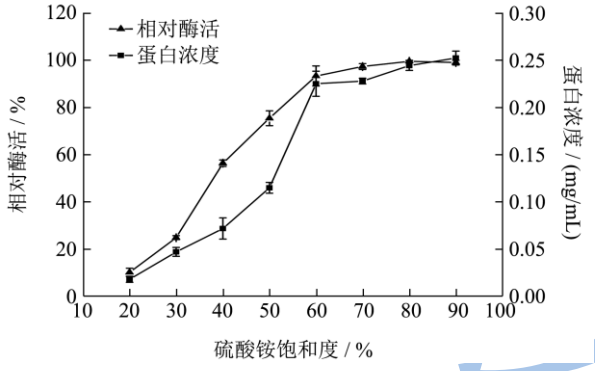


图 1 硫酸铵分级沉淀曲线

Fig.1 Fractional precipitation curve with ammonium sulfate

2.1.2 离子交换层析

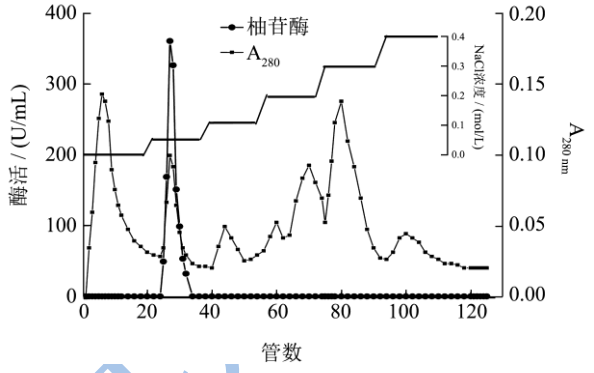


图 2 离子交换层析洗脱曲线

Fig.2 Elution profile of DEAE-Sepharose FF column chromatography

粗酶液经过硫酸铵沉淀和透析脱盐后的活性组分上样于 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱中，NaCl 洗脱梯度为 50~400 mM，结果如图 2 所示。在洗脱过程中出现 7 个蛋白峰，其中第二个蛋白峰和酶活性峰基本重合，其余的蛋白峰组分均未检测出柚苷酶的活力。此时 NaCl 洗脱浓度为 50 mM，说明用磷酸盐缓冲液（10 mM、pH 5.0）配制浓度为 50 mM 的 NaCl 溶液能够将柚苷酶洗脱下来。较高的柚苷酶酶活主要集中在 26~29 管，收集此处含有酶活组分的洗脱液，进行透析和浓缩处理以对其性质进行表征分析。

2.1.3 SDS-PAGE 测定柚苷酶的分子量

分别将发酵液、硫酸铵盐析和阴离子交换层析后收集到的组分浓缩与上样缓冲液混合进行电泳，结果如图 3 所示。由图中可以看出，发酵液、硫酸铵盐析后的组分中含有多种蛋白条带，而经阴离子交换层析后大量杂蛋白已经除去，在电泳图谱上仅显示为一条清晰的条带，证明分离效果较好，已达到电泳纯。由蛋白标准曲线 y=-1.0917x+5.0618（R^2= 0.9811）计算得到柚苷酶分子量约为 65.10 ku，这与 Chang 等[5]得到分子量为 70 ku 和 Feng B 等[11]得到分子量为 66 ku 的 *α*-L-鼠李糖苷酶的实验结果基本相符。此外，Yadav 等[8]通过超滤、透析和 CM-cellulose 层析从 *Penicillium corylopholum* 发酵液中纯化得到 *α*-L-鼠李糖苷酶，Alvarenga 等[12]采用超滤和 Sephadex G-100 凝胶层析从 *Brevundimonas sp.* Ci19 发酵液中得到 *α*-L-鼠李糖苷酶，Qian 等[13]通过硫酸铵沉淀、透析和 DEAE-cellulose 离子交换层析得到薯蓣皂苷 *α*-L-鼠李糖苷酶，上述实验结果表明经过两到三个简单的分离纯化步骤可以达到良好的分离效果，这与胡群芳等[3]通过硫酸铵沉淀、疏水层析、亲和层析和凝胶过滤层析获得 *α*-L-鼠李糖苷酶和 Chang 等[5]通过离子层析、超滤、凝胶层析分离柚苷酶的工艺相比，可以有效减少纯化步骤而达到缩短纯化周期、降低生产成本等目的。

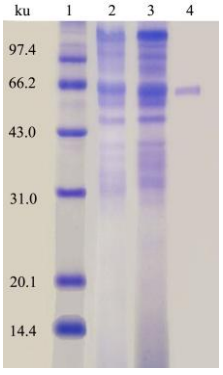


图 3 纯化柚苷酶的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE patterns of purified naringinase

注：1-低分子量标准蛋白；2-发酵液；3-硫酸铵盐析后样品；4-离子交换层析得到的样品。

2.1.4 柚苷酶分离纯化过程的相关参数计算

在经过几个简单的分离纯化步骤后，获得了高纯度的柚苷酶。为了对该纯化过程的效果进行评价，分别测定每一个操作步骤的总蛋白和总酶活并计算比酶活、纯化倍数和回收率，得到相关参数如表 1 所示。分析可知，柚苷酶经硫酸铵沉淀、膜透析和阴离子交

换层析纯化后，比酶活可达 6932.54 U/mg，纯化倍数和酶活回收率分别为 13.82 倍和 13.30%，优于 Alvarenga 等[12]分离得到 α-L-鼠李糖苷酶的纯化倍数（2.7 倍）及回收率（10%）和 Qian 等[13]分离的 α-L-鼠李糖苷酶的纯化倍数（15.7 倍）及回收率（4.1%），与 Yadav 等[8]采用青霉菌发酵进而分离获得的 α-L-鼠李糖苷酶的纯化倍数（15.85 倍）和回收率（13%）基本一致。综合文献报道及本研究的实验结果，黑曲霉发酵获得的柚苷酶粗酶液经过一系列蛋白除杂步骤后，酶的纯化倍数和比酶活均得到了较大程度的提高。因此，通过本文的工作，不仅能够为后续生物转化的相关研究提供高纯度柚苷酶，并将为进一步明确相关转化机制提供必要的研究基础。

表 1 柚苷酶分离纯化过程的相关参数

Table 1 Related parameters for naringinase purification

名称	体积/mL	总酶活/U	总蛋白/mg	比酶活/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	400.00	54192.10	108.05	501.55	1.00	100.00
硫酸铵沉淀	50.00	45528.09	60.51	752.41	1.50	84.01
透析	85.00	41190.15	49.30	835.50	1.67	76.01
离子交换层析	12.00	7209.84	1.04	6932.54	13.82	13.30

2.1.5 柚苷酶对柚皮苷的酶解转化

通过酶解产物与普鲁宁、柚皮苷标准品的薄层层析图谱可以看出，柚皮苷在实验所得高纯度柚苷酶的作用下，几乎全部转化生成了唯一产物，其中柚皮苷的迁移率 Rf 为 0.37，普鲁宁的迁移率 Rf 为 0.68，生成产物的迁移率 Rf 为 0.67，这与 Yadav 等[8]报道的柚皮苷迁移率 Rf 为 0.39，普鲁宁迁移率 Rf 为 0.68 的实验结果基本一致。因此，可以判断酶解生成的产物应为普鲁宁，也进一步证明本实验纯化获得的柚苷酶具有良好的酶解效果，专一性好且转化率高。

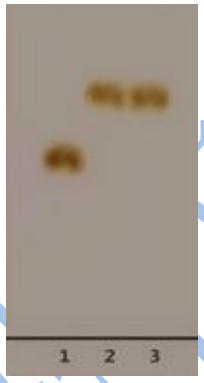


图 4 柚皮苷酶解产物的薄层层析图谱

Fig.4 TLC patterns of the products from enzymatic hydrolysis of naringin

注：1-柚皮苷；2-普鲁宁；3-酶解产物。

2.2 柚苷酶的酶学性质研究

2.2.1 温度对柚苷酶活性的影响

酶催化的反应速率与温度密切相关，因此温度是柚苷酶酶学性质研究的重要因素。文献报道，不同来源的柚苷酶，其最适反应温度也各不相同，但多在 30～50 ℃[14]。将纯化后得到的柚苷酶在不同温度(20～80 ℃)下进行酶活性测定，结果如图 5 所示。在 20 ℃~50 ℃时，温度升高使酶反应速度加快，柚苷酶的相对酶活随之变大；但是当温度高于 50 ℃时，酶活由于酶蛋白的变性失活而显著降低，综合实验结果确定较适宜的反应温度为 50 ℃。

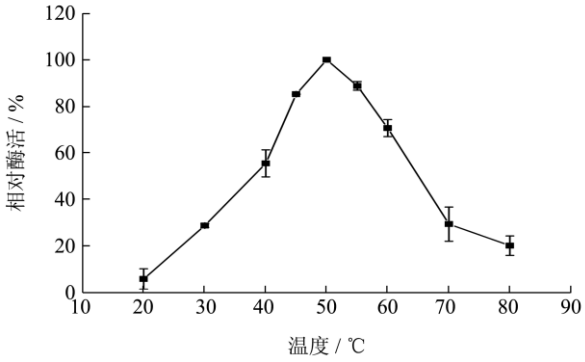


图 5 温度对柚苷酶活性的影响

Fig.5 Effect of temperature on naringinase activity

2.2.2 温度对柚苷酶稳定性的影响

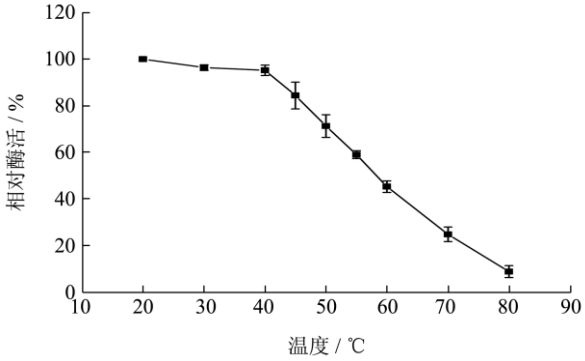


图 6 温度对柚苷酶稳定性的影响

Fig.6 Effect of temperature on naringinase stability

为了进一步研究温度对柚苷酶稳定性的影响，将酶液于 20 ℃~80 ℃条件下保温 1 h 后，进行酶活力的测定，结果如图 6 所示。柚苷酶在 20 ℃~40 ℃条件下保温，酶活力下降不明显，能保持在原酶活的 85%以

上；而当温度超过 40 ℃时，酶活力下降比较快；至 60 ℃时剩余酶活仅为原酶活的 40%左右；而进一步提高温度，失活现象更加严重，在 80 ℃时的剩余酶活降至 10%以下。

同时，进一步将酶液置于 40 ℃、50 ℃和 60 ℃保温不同时间后测定酶活，结果如图 7 所示。随着保温时间的增加，酶活均有不同程度的降低。酶液于 40 ℃下保存时，在较短时间内，即使在较高温度下，仍可保持较高的酶活。而在 50 ℃下保温 4 h 后，其酶活力为原酶活的 80%左右。在 60 ℃下保温 2 h 时，酶活力为原来的 60%，至 8 h 时仅剩 20%的酶活力。研究表明，不同来源的柚苷酶的热稳定性相差较大，可能与其来源微生物的适合生长温度有关系[14]。

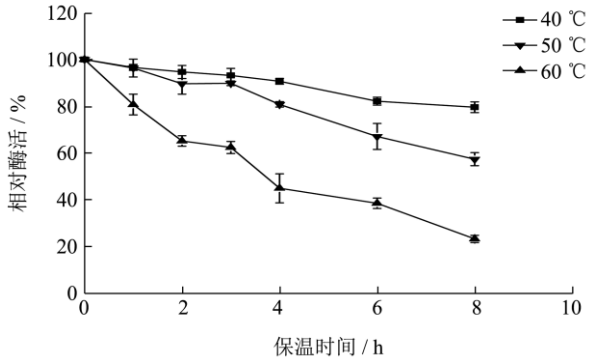


图 7 温度和保温时间对柚苷酶稳定性的影响

Fig.7 Effect of temperature and holding time on naringinase stability

2.2.3 pH 对柚苷酶酶活的影响

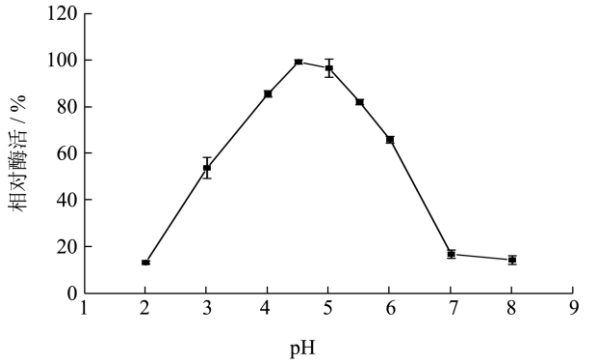


图 8 pH 对柚苷酶活性的影响

Fig.8 Effect of pH on naringinase activity

用 pH 2.0~8.0 的缓冲溶液（0.2 mM）配制底物和稀释酶液，检测 pH 对柚苷酶活性的影响，得到如图 8 所示结果。据文献报道，产自青霉素属或曲霉菌的柚苷酶最适 pH 多为 4.5~6.5，尤其是曲霉属[14]。从图中可以看出，当 pH 低于 2.0 时，柚苷酶活性很低；在 pH 4.5~5.0 表现出较高活力，且在 pH 4.5 时达到最大值；当 pH 超过 5.0 以后，酶活力迅速下降，当 pH 继续升高到 pH 7.0~8.0，酶活力仅为 10%左右，因此确定该酶的最适反应 pH 为 4.5。

2.2.4 pH 对柚苷酶稳定性的影响

酶液置于 pH 2.0~8.0 的缓冲液（0.2 M）中 24 h 后，测定 pH 对柚苷酶稳定性的影响。如图 9 所示，柚苷酶在 pH 3.0~5.5 之间均能保持 90%以上的酶活力，说明该酶具有较强的耐酸性，稳定性较好。在 pH 小于 2.0 和 pH 大于 5.5 时，可能由于柚苷酶发生了失活现象，因此酶活性急剧降低。

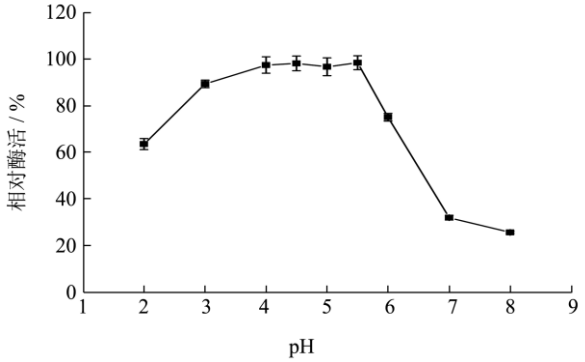


图 9 pH 对柚苷酶稳定性的影响

Fig.9 Effect of pH on naringinase stability

2.2.5 金属离子和化合物对柚苷酶活性的影响

在纯化的酶液中加入不同浓度的金属离子和化合物，测定其对柚苷酶酶活的影响，结果如表 2 所示。可以看出，金属离子及化合物对柚苷酶活性的影响与其浓度有关，但每种物质对柚苷酶酶活的影响趋势与其浓度并不完全相关。K^+在浓度为 20 mM~100 mM 时对酶活性有促进作用，Ca^{2+}在浓度为 10 mM~100 mM 时对酶活性有促进作用，Na^+仅在浓度为 50 mM~100 mM 时对酶活性有促进作用。Fe^{3+}在浓度为 1 mM~ 5 mM 时对酶活性有抑制作用，而当浓度高于 5 mM 时完全检测不到柚苷酶活性。SDS 浓度为 1 mM 时柚苷酶具有 1%的活性，而 EDTA-Na_2 在浓度为 10 mM 时柚苷酶仅剩余 13%的活性，Mg^{2+}、Zn^{2+}、Fe^{2+}、Cu^{2+}、Mn^{2+}、Ba^{2+}和 DTT 均在不同浓度下柚苷酶酶活具有抑制作用或者检测不出活性，这可能是由于这些金属离子引起酶的变性失活而导致酶活损失。Puri 等[6]报道 Mn^{2+}、Ca^{2+}对柚苷酶有抑制作用，而本实验得到 Ca^{2+}在浓度为 10 mM~100 mM 时对酶活性有促进作用，Mn^{2+}在浓度为 1 mM~20 mM 时对酶活性有抑制作用，这可能与不同产酶菌种对金属离子的利用情况及耐受情况有关。

3 结论

柚苷酶在柚类物质的脱苦、鼠李糖及普鲁宁的制备、类固醇的转化及食品中风味物质的形成都具有重要且广泛的应用，并且在天然产物生物转化提高活性

方面具有极大的发展前景，因此研究其分离纯化过程、获得高纯度柚苷酶进而探究酶解特性具有十分重要的意义。本工作采用硫酸铵盐析、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析从黑曲霉 FFCC 848 所产酶系中分离获得高纯度柚苷酶，比酶活为 6932.54 U/mg，纯化倍数和酶活回收率分别为 13.82 倍和 13.30%。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分析鉴定，证实所得柚苷酶已达到电泳纯，其分子量为 65.10 ku，并且对柚皮苷具有良好的酶解效果。此外，还进一步研究了温度、pH、金属离子和化合物种类及浓度对柚苷酶酶活的影响，实验结果表明，本实验所得柚苷酶的最适温度和 pH 分别为 50 ℃和 4.5，且在 20 ℃~50 ℃及 pH 3.0~6.0 范围内均有良好的稳定性。同时，在一定浓度下，K^+、Ca^{2+}和 Na^+对柚苷酶活性有促进作用，而 Fe^{3+}、SDS 和 EDTA-Na_2 则具有不同程度的抑制作用。本工作为简化柚苷酶分离纯化操作步骤，降低生产成本提供了实验依据，也进一步为拓宽柚苷酶的应用研究领域提供了数据基础。

表 2 不同金属离子和化合物浓度对柚苷酶活性的影响

Table 2 Effect of different metal ions and compound concentrations on naringinase activity

金属离子	柚苷酶相对酶活/%					
	1 mM	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM	100 mM
K^+	100.13±0.95	100.74±3.02	100.25±2.84	103.67±0.74	119.31±4.07	130.56±2.53
Ca^{2+}	96.35±7.34	98.09±2.63	105.65±5.21	107.34±3.23	111.91±1.29	120.42±5.65
Na^+	100.31±4.87	100.46±5.42	100.76±2.80	100.35±1.09	107.80±3.10	111.31±0.98
Mg^{2+}	43.00±4.55	41.05±3.06	38.74±6.79	36.52±9.31	33.64±9.42	31.89±2.22
Zn^{2+}	31.64±6.86	23.76±5.30	23.67±9.40	20.64±9.40	-	-
Fe^{3+}	29.63±3.04	12.64±0.31	-	-	-	-
Fe^{2+}	31.12±2.63	23.83±8.31	16.31±9.13	-	-	-
Cu^{2+}	2.42±0.79	20.12±4.12	16.02±5.44	12.31±3.09	9.60±3.21	-
Ba^{2+}	22.65±3.59	19.53±2.39	12.42±3.88	4.91±1.98	-	-
Mn^{2+}	27.26±2.73	21.30±3.21	11.73±2.86	9.02±1.20	-	-
DTT	98.31±2.15	87.03±2.15	34.45±2.15	-	-	-
SDS	1.28±0.15	-	-	-	-	-
EDTA-Na_2	38.46±6.29	22.52±2.57	13.62±6.21	-	-	-

注：数值表示为平均值±标准差；- 未测出活性。

参考文献

[1] Ribeiro M H. Naringinases: occurrence, characteristics, and applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(6): 1883-1895

[2] 张林河,方柏山.微生物来源柚苷酶的研究进展及应用[J].化工进展,2013,32(5):1108-1115
ZHANG Lin-he, FANG Bai-shan. Research progress and application of microbial origin naringinase [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2013, 32(5): 1108 -1115

[3] 胡群芳,李利君,陈艳红,等.从黑曲霉固态发酵产物中纯化 α-L-鼠李糖苷酶及酶法制备普鲁宁[J].现代食品科技, 2015, 31(1):107-114
HU Qun-fang, LI Li-jun, CHEN Yan-hong, et al. Purification of α-L-rhamnosidase from the soild-state fermentation product of aspergillus niger and its aplication in enzymatic production of prunin [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(1): 107- 114

[4] Takuya Koseki, Yuichiro Mese, Nahoko Nishibori, et al. Characterization of an α-L-rhamnosidase from aspergillus kawachii and its gene [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80:1007-1013

[5] Chang H Y, Lee Y B, Bae H A, et al. Purification and characterisation of aspergillus sojae naringinase: the production of prunin exhibiting markedly enhanced solubility with *in vitro* inhibition of HMG-CoA reductase [J]. Food Chemistry, 2011, 124(1): 234-241

[6] Puri M, Kalra S. Purification and Characterization of naringinase from a newly isolated strain of aspergillus niger 1344 for the transformation of flavonoids [J]. World Journal of Microbiology &Biotechnology, 2005, 21(5): 753-758

[7] 崔培梧,文蓉,肖作为,等.青霉菌柚苷酶的分离纯化及酶学性质[J].食品工业科技,2014,35(15):171-179
CUI Pei-wu, WEN Rong, XIAO Zuo-wei, et al. Purification

process and characterization of naringinase from penicillium sp.1523 [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(15): 171-179

[8] Yadav S, Yadava S, Yadav K D S, et al. Purification and characterization and of α-L-rhamnosidase from penicillium corylopholum MTCC -2011 [J]. Process Biochemistry, 2013, 48(9): 1348-1354

[9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, l976, 72: 248-254

[10] Davis D W. Determination of flavonones in citrus juice [J]. Analytical Chemistry, 1947, 19: 46-48

[11] Feng B, Hu W, Ma B P, et al. Purification, characterization, and substrate specificity of a glucoamylase with steroidal saponin- rhamnosidase activity from curvularia lunata [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(6): 1329-1338.

[12] Alvarenga A E, Romero C M, Castro G R. A novel α-L-rhamnosidase with potential applications in citrus juice industry and in winemaking [J]. European Food Research and Technology, 2013, 237(6): 977-985

[13] Qian S R G L, Wang H Y, Zhang C Z, et al. Isolation and characterization of dioscin-L-rhamnosidase from bovine liver [J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2013, 97, 31-35

[14] Yadav V, Yadav P K, Yadav S, et al. α-L-Rhamnosidase: a review [J]. Process Biochemistry, 2010, 45(8): 1226-1235

现代食品科技