

# 从黑曲霉固态发酵产物中纯化 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶及酶法制备普鲁宁

胡群芳<sup>1</sup>, 李利君<sup>2</sup>, 陈艳红<sup>1</sup>, 倪辉<sup>1, 2, 3</sup>, 肖安风<sup>1, 2, 3</sup>, 陈峰<sup>1, 4</sup>, 蔡慧农<sup>1, 2, 3</sup>

(1. 集美大学生物工程学院, 福建厦门 361021) (2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建厦门 361021)  
(3. 厦门市食品与生物工程技术研究中心, 福建厦门 361021) (4. 美国克莱姆森大学食品科学、营养与包装科学系, 南卡罗琳娜州 29634)

**摘要:** 本文研究了从黑曲霉固态发酵产物中纯化 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶, 并探究利用该酶转化柚皮苷制备普鲁宁。用黑曲霉固态发酵柚皮产生 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶, 通过40%~80%硫酸铵沉淀、疏水层析、亲和层析和凝胶过滤层析, 从黑曲霉固态发酵产物中分离纯化得到了1种 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶; 该酶为单体分子量约为160 kDa; 它由二硫键连接的两个肽段构成, 其中有一个大肽段分子量约为130 kDa。其水解柚皮苷的最适温度为50~60℃, 最适pH 4.0~5.0, 米氏常数和最大酶反应速度分别为0.24  $\mu\text{mol/mL}$ 和312.5 U/mL。用该酶转化柚皮苷制备普鲁宁的最适反应时间为60~90 min, 柚皮苷转化率达98%以上。转化产物中普鲁宁的含量在95%以上, 普鲁宁的分解产物柚皮素的含量小于5.0%。用从黑曲霉固态发酵产物中纯化的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁具有热稳定性好、底物亲和力强、转化率高和副产物少等优点, 为开发酶法制备普鲁宁的工艺提供了重要参考。

**关键词:** 黑曲霉; 固态发酵;  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶; 纯化; 柚皮苷; 普鲁宁

文章编号: 1673-9078(2015)1-107-114

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.1020

## Purification of $\alpha$ -L-rhamnosidase from the Solid-state Fermentation Product of *Aspergillus niger* and Its Application in Enzymatic Production of Prunin

HU Qun-fang<sup>1</sup>, LI Li-jun<sup>2</sup>, CHEN Yan-hong<sup>1</sup>, NI Hui<sup>1, 2, 3</sup>, XIAO An-feng<sup>1, 2, 3</sup>, CHEN Feng<sup>1, 4</sup>, CAI Hui-nong<sup>1, 2, 3</sup>

(1. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

(2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China)

(3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China)

(4. Department of Food, nutrition and package Science, Clemson University, South Carolina 29634, United States)

**Abstract:** In this study,  $\alpha$ -L-rhamnosidase was purified from the product of solid-state fermentation of pomelo peel powder by *Aspergillus niger* and used to convert naringin to prunin.  $\alpha$ -L-rhamnosidase was isolated and purified by precipitation using ammonium sulfate at concentrations ranging from 40% to 80%, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, and gel filtration chromatography. The enzyme was found to be a monomer with molecular weight of approximately 160 kDa and contained two polypeptides linked by a disulfide bond. The larger polypeptide had a molecular weight of 130 kDa. Naringin was hydrolyzed to prunin using this enzyme, and the optimal temperature and pH,  $K_m$ , and  $V_{max}$  were 50℃~60℃, 4.0~5.0, 0.24  $\mu\text{mol/mL}$ , and 312.5 U/mL, respectively. The optimal hydrolysis time was 60~90 min and a conversion rate above 98% was achieved. The content of Prunin was accounted for more than 95% in the final product, while that of the byproduct naringenin was less than 5%. The approach of using  $\alpha$ -L-rhamnosidase purified from *Aspergillus niger* solid-state fermentation products to prepare prunin shows advantages such as good thermostability, strong substrate affinity, high conversion rate, and fewer by-products, thus providing an important basis for the enzymatic production of prunin.

**Key words:** *Aspergillus niger*; solid-state fermentation; purification;  $\alpha$ -L-rhamnosidase; naringin; prunin

收稿日期: 2014-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31371751); 集美大学科研创新团队基金(2010A006)

作者简介: 胡群芳(1988-), 女, 硕士在读, 研究方向: 食品酶工程; 通讯作者: 倪辉(1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 品发酵与食品酶工程

普鲁宁是一种具有免疫、抗癌和抗氧化活性的黄酮苷类物质,在食品和药物方面有重要应用价值<sup>[1]</sup>。由于在自然界中普鲁宁的丰度很低,难以从生物组织中提取制备。 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶( $\alpha$ -L-rhamnosidase, EC 3.2.1.40)能特异性水解许多天然产物的末端 $\alpha$ -L-鼠李糖基<sup>[2,3]</sup>,可用于柑橘类果汁的脱苦、生物合成普鲁宁和鼠李糖、增加酒的香味、去除橙子果汁中的橙皮苷晶体及提高黄酮的生物活性等。相关研究表明<sup>[4]</sup>,用 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷是制备普鲁宁的有效手段,其反应过程如下图1所示。

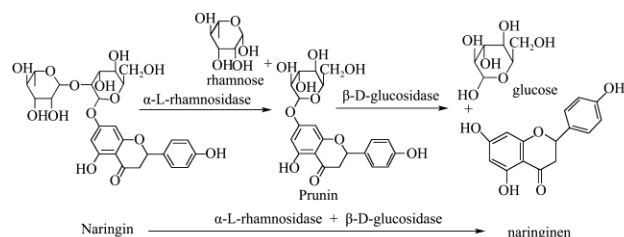


图1 酶催化生成普鲁宁及其分解的机制

Fig.1 Mechanism of enzymatic synthesis and degradation of prunin

$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶广泛存在于动物组织、植物、真菌和细菌<sup>[5]</sup>中,但大部分生物在合成 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶时也常合成 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶,由于 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶和 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的分子量和等电点相似而难以分离,导致分离得到的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶中含有大量 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性,在此条件下普鲁宁会被 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶进一步水解成柚皮素(图1B),从而影响了普鲁宁的得率和纯度。一些学者用碱性溶液处理柚皮苷( $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶和 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶的复合物),使其中的 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶失活并用于转化柚皮苷制备普鲁宁<sup>[6]</sup>,虽然克服了 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶对普鲁宁的分解作用,但由于碱处理条件难以控制而容易导致 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶活性大量损失。最近, Ni等<sup>[4,7]</sup>改进了 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的分离工艺,获得了高纯度的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶,将97%的柚皮苷转化成普鲁宁且消除了 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶对普鲁宁的影响。

黑曲霉是国际公认的食品用酶生产安全菌株,人们对它的遗传和酶分泌进行了深入和系统研究<sup>[8]</sup>,并发现黑曲霉具有强大的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶合成能力,不仅在液态发酵中能合成该酶<sup>[7]</sup>,也可以用固态发酵合成该酶<sup>[9]</sup>。相关研究还发现,黑曲霉在深层液态发酵过程中易形成菌丝球,限制了营养物质的吸收<sup>[10]</sup>,制约了 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶活力的提高;与液态发酵相比,固态发酵 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶以农业副产物为原料<sup>[9,11]</sup>,菌丝不结团,营养物质吸收效率高,因此用固态发酵柚皮苷具有培养基成本低和酶活力高的优点。虽然有

多位学者从黑曲霉液态发酵产物中纯化了 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶并研究了其酶学性质<sup>[4,12]</sup>,但从黑曲霉固态发酵产物中分离纯化该酶并用于制备普鲁宁的研究还很少。因此,本论文的目的是从黑曲霉固态发酵产物中纯化 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶,并研究其水解柚皮苷制备普鲁宁的工艺可行性,为开发简便、低成本的普鲁宁制备工艺提供实验参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

黑曲霉 JMU-TS528 菌株(28s rDNA 登录号为 JQ072028),为集美大学生物工程学院食品发酵与酶工程研究室选育保存。柚皮苷( $\geq 98\%$ )、柚皮素( $\geq 98\%$ )购自西安小草植物科技有限责任公司;色谱纯甲醇(GR)和乙腈(GR)是 Tedia Company Inc. 产品;分析纯柠檬酸(AR)购自汕头西陇化工股份有限公司,分析纯磷酸氢二钠(AR)购自国药集团化学试剂有限公司;SDS-PAGE 用标准蛋白购自加拿大 Fermentas 公司;N-糖苷酶购自 Sigma-Aldrich 公司。

斜面培养基<sup>[13]</sup>的成分(g/L)为:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0,  $KH_2PO_4$  1.0,  $(NH_4)_2SO_4$  1.5, KCl 0.5,  $KNO_3$  1.5, 无水  $CaCl_2$  0.1, 酵母膏 2.0, 柚皮苷 2.69, 琼脂 20, 初始 pH 6.0。

固态发酵培养基的成分(g/瓶)为: 柚皮粉 5,  $(NH_4)_2HPO_4$  0.5, 含水量为 5, 自然 pH。调配时,柚皮粉加入含有 $(NH_4)_2HPO_4$ 的蒸馏水,搅拌均匀后装入 250 mL 的三角瓶中装,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min。

### 1.2 主要仪器设备

AKTA Purify 纯化仪、HiTrap Phenyl FF (high sub) 疏水预装柱、HiTrap Blue HP 亲和预装柱和 Sephacryl S-200 HR 凝胶树脂购自瑞典 Amersham Biosciences 公司;高效液相色谱仪购自美国 Waters 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 黑曲霉发酵及粗酶液制备

制备单孢子菌悬液:参照肖安风等<sup>[14]</sup>把 4 °C 下保藏的菌种接种于斜面培养基上,在 28 °C 下培养 3 d 得到成熟孢子,用 0.75% 无菌生理盐水洗下孢子,放到装有 50 mL 无菌生理盐水和无菌玻璃珠的锥形瓶中,充分振荡 30 min。待孢子充分打散后,用无菌生理盐水调整其  $OD_{600}$  值至 2.0, 即得单孢子菌悬液。

固态发酵:将单孢子菌悬液按 10% (V/m) 接种量接种到固态发酵培养基中。在 30 °C 条件下培养 10 d。

粗酶液提取：向每个三角瓶中加入 60 mL 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液 (pH 5.0)，在 220 r/min、30 °C 下振荡 1 h，用纱布过滤，所得发酵液再用滤纸过滤，所得滤液即为粗酶液。

### 1.3.2 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶分离纯化

硫酸铵沉淀：用磁力搅拌器搅拌粗酶液，慢加硫酸铵粉末至 40% 饱和度，在 4 °C 条件静置过夜后 10000 r/min 冷冻离心 30 min，取上清慢加硫酸铵粉末至 80% 饱和度，在 4 °C 条件静置过夜，10000 r/min 冷冻离心 30 min，取沉淀用 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液 (pH 5.0) 溶解，4 °C 保存。

疏水柱层析分离：先以 5 倍柱体积分含有 1 M 硫酸铵的 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液 (pH 7.0) 平衡；上样后以 18 倍柱体积分含有 1 M 硫酸铵的 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液 (pH 7.0) 进行流洗，再以 10 倍柱体积分含有 0.7 M 硫酸铵的 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液 (pH 7.0) 进行洗脱。所有操作的流速均为 2 mL/min，收集的速度为 2 mL/管。

亲和柱层析分离：先以 5 倍柱体积分含有 1 M 硫酸铵的 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液 (pH 7.0) 平衡 HiTrap Blue HP 亲和柱，再以 5 倍柱体积分含有 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液 (pH 3.0) 平衡；上样后以 12 倍柱体积分含有 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液 (pH 3.0) 进行流洗，以 8 倍柱体积分含有 1 M 硫酸铵的 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液 (pH 7.0) 进行洗脱，流洗和洗脱的流速为 2 mL/min；收集的速度为 2 mL/管。

分子筛层析柱分离：以 5 倍柱体积分含有 0.15 M 氯化钠的 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液 (pH 6.0) 平衡 Sephacryl S-200 HR 柱，流速为 0.5 mL/min；上样后以 1 倍柱体积分含有 0.15 M 氯化钠的 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液 (pH 6.0) 进行洗脱，0.5 mL/管进行收集。

### 1.3.3 pH 值对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷制备普鲁宁的影响

pH 值对酶活力的影响：在 50 mM 不同 pH 值 (pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0) 的柠檬盐缓冲液进行柚皮苷的转化反应，测定柚皮苷的分解量，计算相对酶活性。

pH 对酶稳定性的影响：将 100  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶与 900  $\mu\text{L}$  pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 的柠檬盐缓冲液 (50 mM) 混合，在 4 °C 条件下放置 24 h 后测定剩余酶活力。

### 1.3.4 温度对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷制备普鲁宁的影响

温度对酶活性的影响：在 30~80 °C 范围内，不改变酶活力测定方法的其它条件，只改变酶反应的温度，测定柚皮苷的水解量，计算相对酶活力。

温度对酶稳定性的影响：将酶液分装后分别置于 30~80 °C 下水浴保温 1 h 后测定剩余的酶活力。

### 1.3.5 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷制备普鲁宁的动力学参数测定

将酶液不同浓度的柚皮苷溶液进行反应，测不同柚皮苷浓度条件下的酶活力，以柚皮苷浓度的倒数为横坐标，以酶反应速率的倒数为纵坐标绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图，计算  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷的米氏常数及最大反应速率。

### 1.3.6 反应时间对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷制备普鲁宁的影响

将 500  $\mu\text{L}$  酶液加入 1.5 mL pH 5.0 的 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-C}_4\text{H}_2\text{O}_7$  缓冲溶液与 2 mL 400  $\mu\text{g/mL}$  柚皮苷的混合体系里反应，分别在不同时间进行取样分析，测定柚皮苷的分解及普鲁宁和柚皮素的生成量，计算转化率及普鲁宁的纯度。

### 1.3.7 分析检测方法

#### 1.3.7.1 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶活力测定

参照陈月龙<sup>[15]</sup>的酶活力测定方法，稍做修改，以柚皮苷为底物测定酶活性。酶活性测定的反应体系为 1.9 mL 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.0, 20 mM) 加 2 mL 300  $\mu\text{g/mL}$  底物和 0.1 mL 酶液，50 °C 反应 5 min 后随即 100 °C 加热 30 min，过 0.22  $\mu\text{m}$  的水膜后用液相色谱测定柚皮苷、普鲁宁及柚皮素的量。高效液相色谱的流动相由水 (A)、甲醇 (B) 及乙腈 (C) 组成，梯度洗脱程序为 0~4 min A/B/C 维持 95/0/5；4~14 min A/B/C 改变至 60/0/40；14~16 min A/B/C 维持 60/0/40；16~24 min A/B/C 改变至 30/0/70；24~28 min A/B/C 回复至 95/0/5；28~32 min A/B/C 维持 95/0/5；流速为 0.5 mL/min，检测波长为 280 nm，柱温为 35 °C。以每分钟消耗 1  $\mu\text{g}$  柚皮苷所需要的酶量定义为一个  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶活力单位。

#### 1.3.7.2 蛋白浓度测定

酶纯化过程中，用紫外检测器测定 280 nm 的吸光值，推测蛋白含量。纯化后酶液中的蛋白含量用考马斯亮蓝法<sup>[16]</sup>测定，以牛血清白蛋白为标准蛋白制定标准曲线计算酶液中蛋白质的含量。

#### 1.3.7.3 凝胶层析法测定 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶分子质量

用 Sephacryl S-200 HR 柱测定  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的分子质量；控制流速为 0.5 mL/min，先测定标准蛋白的洗脱体积 ( $V_e$ )，柱体积 ( $V_c$ ) 及葡聚糖洗脱体积 ( $V_0$ ) 并以  $(V_e - V_0)/(V_c - V_0)$  为纵坐标，以其分子量的对

数值即  $\log(Mr)$  为横坐标绘制标准曲线；再根据  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的洗脱体积通过标准蛋白分子量线性回归方程求得酶分子量。

### 1.3.7.4 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的分子量测定及二硫键和糖基化分析

用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶亚基的分子量。上样缓冲液：20 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8)、8 g SDS、0.4 g 溴酚兰、20 mL 甘油，用蒸馏水定容到 100 mL。

巯基乙醇处理样品方法：样品加入了上样缓冲液后，加入 5% 的巯基乙醇，再煮沸 10 min，离心，上样。

N-糖苷酶处理样品方法：参照 PNGase F from Elizabethkingia 说明书，取 45  $\mu$ L 的蛋白样品，加入 5  $\mu$ L 的变性剂 (含 0.2% SDS 的 100 mM 的巯基乙醇)，100  $^{\circ}$ C 加热 10 min，让蛋白充分变性；待溶液冷却之后，加入 5  $\mu$ L 的曲通 X-100，混合均匀；再加入 5  $\mu$ L 酶活力为 500 U/mL 的 N-糖苷酶溶液到反应体系；37  $^{\circ}$ C 反应 2 h；100  $^{\circ}$ C 加热 5 min 终止反应。对照为加入灭活的 N-糖苷酶。处理后的样品进行 SDS-PAGE 分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的分离纯化

如图 2 所示，通过用 HiTrap<sup>TM</sup> Phenyl FF (high sub) 疏水柱、HiTrap<sup>TM</sup> Blue HP 亲和柱和 Sephacryl S-200 HR 分子筛层析柱对 40~80% 的硫酸铵沉淀组分进行纯化， $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的比活力达到 79180.2 U/mg，纯化倍数达到 117.8。将该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶洗脱体积 94.5 mL (图 2c)，代入用标准蛋白洗脱体积 (图 3a) 制定的标准蛋白分子量标准曲线 ( $y = -0.2997x + 1.6954$ ，图 3b) 可得该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的分子量为 164.48 kDa。SDS-PAGE 凝胶电泳分析发现，纯化后的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶只有一个电泳条带 (图 4)，分子量在约为 160 kDa，这说明该酶只有一个亚基，为单体酶；加入 5% 的巯基乙醇后，该酶检测到分子量约为 130 kDa 的条带，由此可以推测该鼠李糖苷酶是由二硫键连接的两个肽段组成，其中较大的肽段分子量约为 130 kDa，另一较小肽段 (分子量约为 30 kDa) 由于分子量小及浓度低而未检测到；经过 N-糖苷酶处理后，分子量为 130 kDa 的蛋白条带仍然存在，其原因可能是在巯基乙醇存在的条件下长时间加

热处理导致 SDS 电泳出现 60~67 kDa 的条带<sup>[17]</sup>。这种现象说明该肽段不含有糖基。

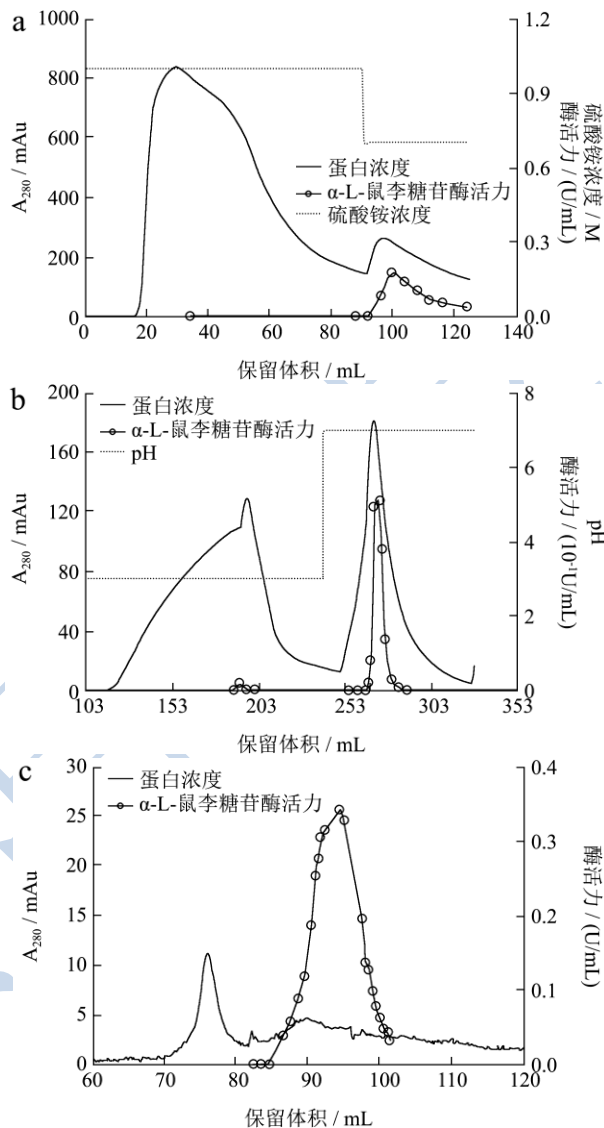


图 2 用疏水柱 (a) 和亲和柱 (b) 及凝胶过滤柱 (c) 从硫酸盐沉淀产物中层析纯化  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶

Fig.2 Chromatographic purification of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from ammonium sulfate precipitation fraction by using a hydrophobic column (a), affinity column (b), and gel filtration column (c)

表 1  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶纯化参数表

Table 1 Parameters for the purification of  $\alpha$ -L-rhamnosidase

步骤	总蛋白 / $\mu$ g	总活力 /U	比活力 / (U/mg)	纯化倍数	回收率 /%
硫酸铵沉淀	10569.00	7106.89	672.43	1.00	100.00
疏水柱	1150.00	2867.48	2494.11	3.70	40.34
亲和柱	44.00	1162.32	26267.65	39.10	16.36
凝胶柱	3.00	213.06	79180.20	117.80	3.00

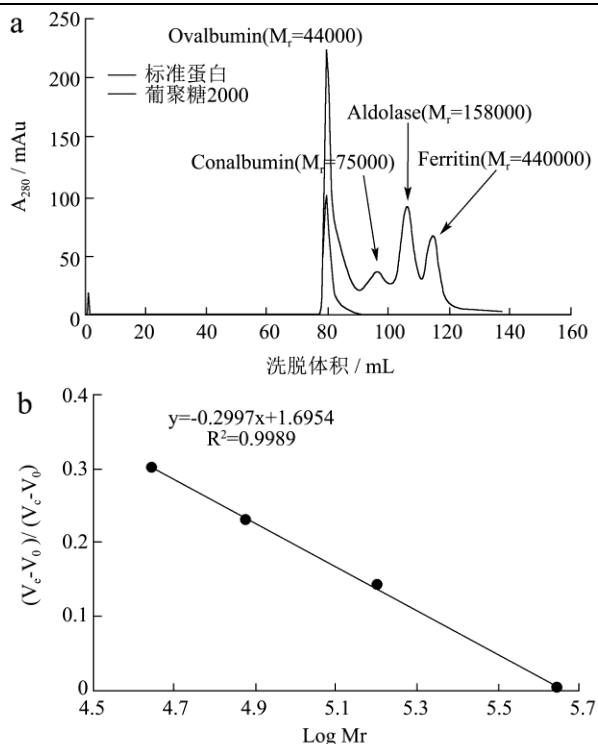


图3 凝胶层析测定标准蛋白的洗脱体积 (a) 与蛋白质分子量标准曲线 (b)

Fig.3 Elution volume of standard proteins (a) and the standard curve for protein molecular weight (b) determination by gel filtration chromatography

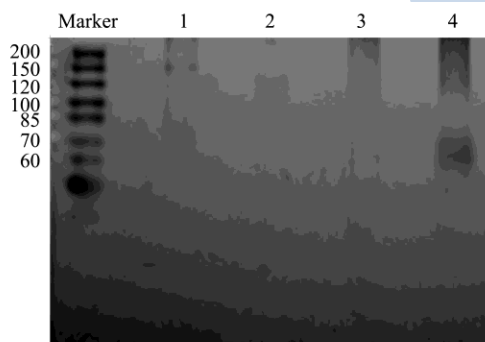


图4 经不同方法处理的凝胶柱纯化的样品聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the  $\alpha$ -L-rhamnosidase in the fraction eluted from the gel filtration column that was exposed to various treatments

注：泳道1是纯化的酶，分子量在160kDa处；泳道2是加入5%的巯基乙醇处理的酶，蛋白质条带在130kDa；泳道3是N-糖苷酶处理对照，泳道4是N-糖苷酶处理样品，这两个泳道中除130 kDa的条带之外，还出现了分子量为60~70 kDa的条带。

## 2.2 pH对酶法制备普鲁宁的影响

如图5所示，黑曲霉固态发酵的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷的最适pH范围为4.0~5.0，在pH 3.0~8.0范围内放置24 h后酶活性损失小于15%，尤其是在pH值4~5的范围内稳定性最好。该结果这说明用该酶转化柚皮苷制备普鲁宁的适宜pH值应该在4~5的范围内。此外，该结果和其他学者报导的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的性质类似<sup>[4, 18-19]</sup>，说明糖基化对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的最适pH和酸碱适应性影响较少。

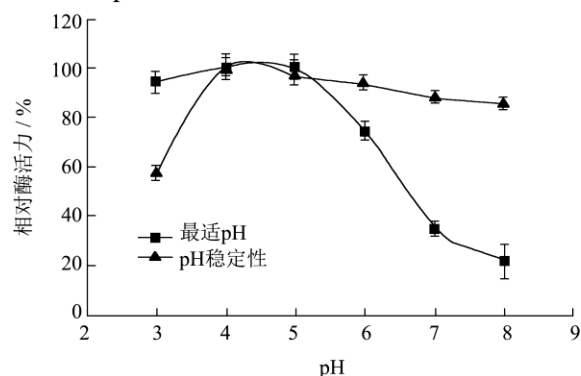


图5 pH值对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶转化柚皮苷制备普鲁宁的影响

Fig.5 Effect of pH on prunin production via enzymatic hydrolysis of naringin by  $\alpha$ -L-rhamnosidase

## 2.3 温度对酶法水解柚皮苷制备普鲁宁的影响

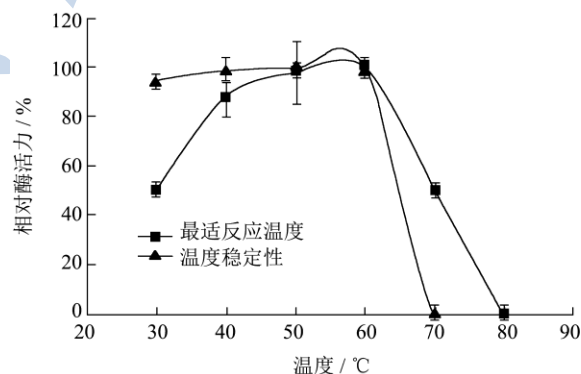


图6 温度对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶转化柚皮苷制备普鲁宁的影响

Fig.6 Effect of temperature on prunin production via enzymatic hydrolysis of naringin by  $\alpha$ -L-rhamnosidase

如图6所示，该 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷的最适温度为50~60 $^{\circ}$ C，该性质与有关文献报导 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶最适温度在40~70 $^{\circ}$ C之间<sup>[20]</sup>相符。该酶在60 $^{\circ}$ C以下具有良好的稳定性，综合温度对酶活性和酶稳定性的影响，用该酶水解柚皮苷制备普鲁宁，将反应温度控制在60 $^{\circ}$ C以下。此外，在60 $^{\circ}$ C放置1 h后酶活力仍有95%以上，该性质比一些学者报导的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的热稳定性好<sup>[4, 15, 21-22]</sup>，表明该酶具有更好的

热稳定性能,可能和其糖基化有关。

### 2.4 酶法水解柚皮苷制备普鲁宁的动力学参数

数

测定  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶对柚皮苷的水解活性,发现活力在底物浓度 0~100  $\mu\text{g/mL}$  内随底物浓度升高而增大(图 7a)。对酶活性及底物浓度作 Lineweaver-Burk 双倒数曲线得到拟合方程为  $y=0.4392x+0.0032$  (图 7b), 由该方程可知,  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷的米氏常数( $K_m$ )和最大酶反应速度( $V_{max}$ )分别为 137.25  $\mu\text{g/mL}$  (0.24  $\mu\text{mol/mL}$ ) 和 312.5 U/mL。这与 Ni 等<sup>[4]</sup>报导的  $K_m$  为 0.27  $\mu\text{mol/mL}$  接近,比 Puri 等<sup>[19]</sup>报导的  $K_m$  为 1.9  $\mu\text{mol/mL}$  低很多。 $K_m$  值为 0.24  $\mu\text{mol/mL}$  表明该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶对柚皮苷亲和力强,可以在柚皮苷浓度较低时仍然保持较大的反应速度,如在底物浓度为 274.50  $\mu\text{g/mL}$  时反应速度为 312.5 U/mL,有利于提高柚皮苷的转化率和反应速度。

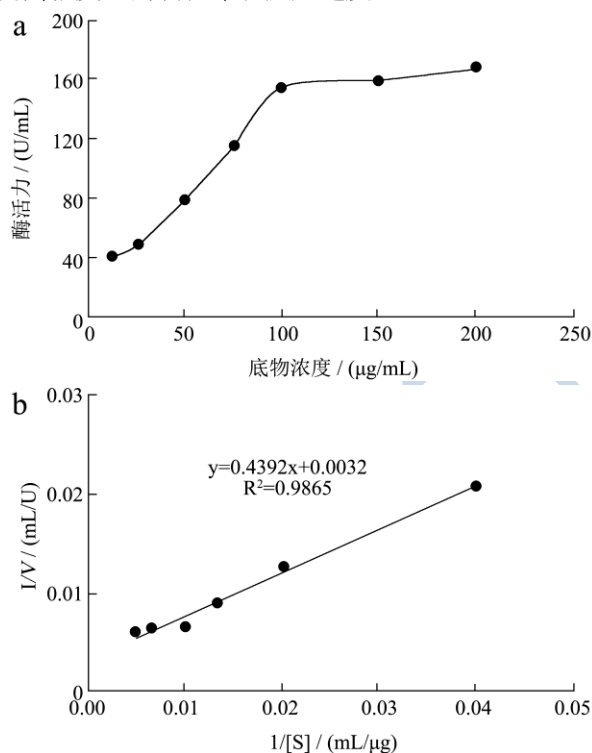


图 7 柚皮苷浓度对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶转化柚皮苷的影响 (a) 和  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线 (b)

Fig.7 Effect of substrate concentration on  $\alpha$ -L-rhamnosidase conversion of naringin to prunin (a) and the double-reciprocal (Lineweaver-Burk) plot of  $\alpha$ -L-rhamnosidase (b)

### 2.5 转化时间对酶法水解柚皮苷制备普鲁宁的影响

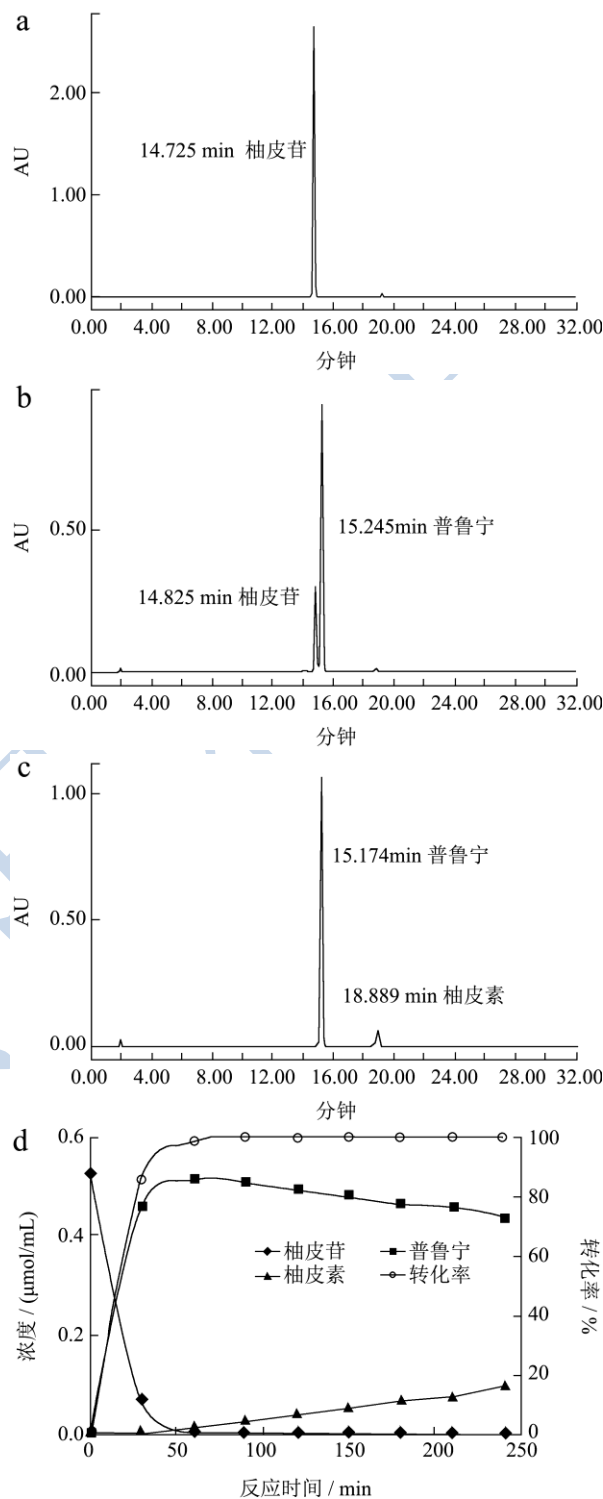


图 8 反应时间对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶转化柚皮苷制备普鲁宁的影响

Fig.8 Chromatograms showing the effect of reaction time on the enzymatic conversion of naringin to prunin by  $\alpha$ -L-rhamnosidase

注: a 起始反应物的色谱图; b 反应 30 min 的色谱图; c 反应 90 min 的色谱图; d 柚皮苷、普鲁宁和柚皮素含量及柚皮苷转化率随时间变化的趋势。

为了进一步评价用纯化得到的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶进

行普鲁宁制备的工艺可行性,测定不同反应时间的反应产物中柚皮苷、普鲁宁和柚皮素的含量变化。初始反应物、反应 30 min 和 90 min 产物的液相色谱图分别如图 8a、8b 和 8c 所示,随着时间的延长,柚皮苷含量不断减小,普鲁宁含量快速增加,此外还生成了微量的柚皮素,该结果说明纯化的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶中还含有少量的  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶。为了评价该  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶对酶法制备普鲁宁的影响,进一步计算了不同反应时间的柚皮苷、普鲁宁和柚皮素含量及柚皮苷的转化率,结果(图 8d)表明反应时间在 60~90 min 的范围内,柚皮苷转化率达到 98% 以上,且柚皮素在反应产物(普鲁宁和柚皮素的总量)中的含量小于 5.0%,说明通过控制适当的反应时间(60~90 min)可以消除  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶对酶法转化普鲁宁的影响。该结果所获得的转化率及产物中普鲁宁含量与 Ni 等<sup>[4]</sup>从液态发酵产物中纯化  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁的结果相似,但反应产物中柚皮素的含量远远低于 Puri 等<sup>[9]</sup>用柚苷酶水解柚皮苷的结果。因此,该酶法制备普鲁宁的工艺具有转化率高和副产物(柚皮素)少的优点。

转化率 = 已转化的柚皮干的量 / 柚皮干的总量 \* 100

综上,用黑曲霉固态发酵的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁具有热稳定性好、底物亲和力强、转化率高和副产物(柚皮素)少等优点。此外,黑曲霉固态发酵  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶具有发酵成本低和酶活力高的优点。因此,用固态发酵方法生产纯化的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶进行酶法转化是合成普鲁宁的有效途径。

### 3 结论

通过硫酸沉淀、疏水层析和凝胶过滤层析从黑曲霉固态发酵产物中纯化得到了  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶,凝胶层析和 SDS-PAGE 电泳发现该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶由二硫键连接的两个肽段组成,其中大的肽链分子量约为 130.0 kDa; 用该酶转化柚皮苷制备普鲁宁的适宜 pH 为 4.0~5.0,最适温度为 50~60 °C,对柚皮苷的  $K_m$  值为 0.24  $\mu$ mol/mL,在低底物浓度下仍然具有很高的反应速度,反应 60~90 min 柚皮苷转化率达到 98% 以上,柚皮素在反应产物中的含量小于 5.0%。用该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁具有热稳定性好、底物亲和力强、转化率高和副产物(柚皮素)少等优点。

### 参考文献

[1] Salas M P, CeLiz G, Geronazzo H, et al. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species [J]. Food Chemistry, 2011, 124(4): 1411-1415

- [2] Feng B, Ma B-P, Kang L-P, et al. The microbiological transformation of steroidal saponins by *Curvularia lunata* [J]. Tetrahedron, 2005, 61(49): 11758-11763
- [3] Terada Y, Koy hesperidin glycosides, Fmetani T, et al. Prevention of hesperidin crystal formation in canned mandarin orange syrup and clarified orange juice bood [J]. Science and Technology International, 1995, 1(1): 29-33
- [4] Ni H, Xiao A F, Cai H N, et al. Purification and characterization of *Aspergillus niger*  $\alpha$ -L-rhamnosidase for the biotransformation of naringin to prunin [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(24): 5276-5284
- [5] Birgisson H, Hreggvidsson G O, Fridj Nsson O H, et al. Two new thermostable  $\alpha$ -L-rhamnosidases from a novel thermophilic bacterium [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34(6): 561-571
- [6] Roitner M, Schalkhammer T, Pittner F. Preparation of prunin with the help of immobilized naringinase pretreated with alkaline buffer [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1984, 9(5-6): 483-488
- [7] Ni H, Cai H, Xiao A, et al. Improved purification of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger* naringinase [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(11): 2539-2544
- [8] 郭艳梅,郑平,孙际宾.黑曲霉作为细胞工厂:知识准备与技术基础[J].生物工程学报,2010,26(10):1410-1418
- GUO Yan-mei, ZHENG Ping, SUN Ji-bin. *Aspergillus Niger* as a potential cellular factory: prior knowledge and key technology [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(10): 1410-1418
- [9] 汪钊,毛富根.柚苷酶固体发酵及消除桔子汁苦味的研究[J].食品科学,1996,17(6):17-19
- WANG Zhao, MAO Fu-gen. *Naringinase* from the solid fermentation was used for eliminating the bitterness of orange juice [J]. Food Science, 1996, 17(6):17-19
- [10] 吴升山,蔡慧农,苏文金,等.黑曲霉 DB056 发酵  $\alpha$ -鼠李糖苷酶和柚苷酶培养基的优化研究[J].中国食品学报, 2010, 10(4):193-201
- WU Sheng-shan, CAI Hui-nong, SU Wen-jin, et al. Optimization of culture medium for producing  $\alpha$ -rhamnosidase and naringinase by *Aspergillus Niger* DB056 [J]. Journal of Chinese Food, 2010, 10(4):193-201
- [11] 徐泽敏,殷涌光.柚皮的综合利用[J].食品研究与开发,2007,28(1):176-178
- XU Ze-min, YIN Yong-guang. Comprehensive utilization of the pomelo peel [J]. Food Research and Development, 2007,

- 28(1):176-178
- [12] 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
- [13] 丁涛. 柚苷酶发酵放大技术及酶制剂的研究[D]. 厦门: 集美大学, 2011
- DING Tao. Studied on scale-up technology of naringinase fermentation and its enzyme preparation [D]. Xiamen: Ji Mei University, 2011
- [14] 肖安风, 倪辉, 吴升山, 等. 黑曲霉产柚苷酶的发酵条件优化[J]. 中国食品学报, 2011, 11(6): 89-97
- XIAO An-feng, NI Hui, WU Sheng-shan, et al. Optimization of fermentation conditions for production of naringinase by *Aspergillus Niger* [J]. *Journal of Chinese Food*, 2011, 11(6): 89-97
- [15] 陈月龙. 棘孢曲霉 JMUb058 柚苷酶的结构及其水解柚皮苷的特性研究[D]. 厦门: 集美大学, 2012
- CHEN Yue-long. Structure and characterization of the naringinase from *Aspergillus aculeatus* JMUb058 for the Hydrolysis of Naringin [D]. Xiamen: Ji Mei University, 2012
- [16] 陈钧辉, 陶力, 朱婉华, 等. 生物化学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2007
- CHEN Jun-hui, TAO Li, ZHU Wan-hua, et al. *Biochemical experimental* [M]. Beijing: Scientific Press, 2007
- [17] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000
- WANG Jia-zheng, FAN Ming. *The technical manuals of protein* [M]. Beijing: Scientific Press, 2000
- [18] Manzanares P, Graaff L H, Visser J. Purification and characterization of an  $\alpha$ -l-rhamnosidase from *Aspergillus niger* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 157(2): 279-283
- [19] 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 and Biotechnology*, 2005, 21(5): 753-758
- [20] Yadav V, Yadav P K, Yadav S, et al.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase: a review [J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(8): 1226-1235
- [21] Yanai T, Sato M. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X349 [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64(10): 2179-2185
- [22] Gallego M, Pinaga F, Ram N D, et al. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of Interest in Winemaking [J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(2): 204-209