

# 一种棘孢曲霉 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的结构及性质特征研究

于越<sup>1</sup>, 倪辉<sup>1,2,3</sup>, 李利君<sup>1,2,3</sup>, 陈月龙<sup>1</sup>, 朱艳冰<sup>1,2</sup>, 肖安风<sup>1,3</sup>, 蔡慧农<sup>1,2,3</sup>, 苏文金<sup>1,2,3</sup>

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 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)

**摘要:**  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶是一种具有重要应用价值的诱导酶。目前,  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的结构与功能关系尚不明确。本文以柚皮苷为诱导物培养棘孢曲霉产  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶, 研究该酶的结构及酶学性质特征。经质谱分析该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶属于棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 A。三维结构模拟发现该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶具有 N 端  $\beta$ -折叠结构域、C 端  $\beta$ -折叠结构域、clan-L (alpha/alpha)(6)-桶状催化结构域以及具有 Asp 等九个完全保守氨基酸残基, 说明该酶属于糖苷酶 78 家族成员。分子对接发现该酶通过酸碱催化的机制水解柚皮苷。该酶的最适温度 50 °C, 最适 pH 4.0, 1 mM 与 10 mM 的  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  及  $\text{Fe}^{3+}$  对该酶有较强的抑制作用; 该酶可以水解柚皮苷、橙皮苷和杨梅苷, 其水解柚皮苷的动力学符合典型的米氏方程,  $K_m$  值为 0.23 mM,  $V_{max}$  为 565.1 U/mg。以上结果丰富了  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的结构与功能关系的研究理论, 为开发性质优良的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶提供了信息参考。

**关键词:** 棘孢曲霉; 柚皮苷;  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶; 结构; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2015)12-82-92

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.013

## Characterization of Structure and Properties of $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Aspergillus aculeatus*

YU Yue<sup>1</sup>, NI Hui<sup>1,2,3</sup>, LI Li-jun<sup>1,2,3</sup>, CHEN Yue-long<sup>1</sup>, ZHU Yan-bing<sup>1,2,3</sup>, XIAO An-feng<sup>1,3</sup>, CAI Hui-nong<sup>1,2,3</sup>, SU Wen-jin<sup>1,2,3</sup>

(1.College of Food and 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)

**Abstract:**  $\alpha$ -L-Rhamnosidase is an inducible enzyme with important applications. Currently, the structure-function relationship of  $\alpha$ -L-Rhamnosidase is not clear. *Aspergillus aculeatus* was cultivated using naringin as the  $\alpha$ -L-rhamnosidase inducer, and the structural characteristics and enzymatic properties of this enzyme were studied. Mass spectrometry analysis revealed that this  $\alpha$ -L-rhamnosidase was the  $\alpha$ -L-rhamnosidase A (RhA) variant from *A. aculeatus*. The simulations of three-dimensional structure of the enzyme revealed that  $\alpha$ -L-rhamnosidase had one N-terminal  $\beta$ -sheet domain, one C-terminal  $\beta$ -sheet domain, a clan-L (alpha/alpha)-barrel structure as a catalytic structure domain and nine fully conserved amino acid residues (e.g., Asp), indicating that this enzyme belongs to the glycoside hydrolase (GH78) family. The molecular docking results showed that this enzyme could hydrolyze naringin through an acid/base-catalyzed hydrolysis pathway. The optimal temperature and pH for the enzymatic reaction were 50 °C and 4.0, respectively, while 0.1 mM and 10 mM  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  had strong inhibitory effects on the enzyme. Moreover,  $\alpha$ -L-rhamnosidase investigated in this study was able to hydrolyze naringin, hesperidin and myricitrin. The kinetics of naringin hydrolysis followed the typical Michaelis-Menten equation, with a  $K_m$  value of 0.23 mM and a  $V_{max}$  of 565.1 U/mg. These results contribute to the structure-function relationships of  $\alpha$ -L-rhamnosidase, and provide useful information for the production of  $\alpha$ -L-rhamnosidase with excellent characteristics.

**Key words:** *Aspergillus aculeatus*; naringin;  $\alpha$ -L-rhamnosidase; structure; enzymatic properties

收稿日期: 2015-02-08

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: 于越 (1991-), 女, 硕士在读, 研究方向: 食品酶工程

通讯作者: 李利君 (1973-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品酶工程

$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶[ $\alpha$ -L-rhamnosidase(EC 3.2.1.40)]属于转化糖苷水解酶类,能够专一、高效地水解多种糖苷类物质如柚皮苷(naringin)、芦丁(rutin)、橘皮苷(hesperidin)<sup>[1]</sup>。 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在食品工业中具有重要的应用价值,可用于去除柑桔类果汁苦味<sup>[1]</sup>,增加酿造酒和果汁香味<sup>[2-4]</sup>,提高果汁抗氧化活性<sup>[5]</sup>,生产抗生素<sup>[6]</sup>,制备普鲁宁<sup>[7]</sup>等。

$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶来源非常广泛,相关学者报道了一些动物<sup>[8]</sup>、植物<sup>[9]</sup>和微生物<sup>[9-10]</sup> $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的研究结果,并明确了 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的合成需要诱导物,如芦丁,橘皮苷及柚皮苷等<sup>[11]</sup>。2005年Miyata<sup>[12]</sup>等发现在*Sphingomonas paucimobilis* FP2001发酵过程中添加鼠李糖可诱导生产 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶。Mutter<sup>[13]</sup>等从*Aspergillus aculeatus*中分离出两个 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶,其中一个 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶是利用柚皮苷和橙皮苷诱导得到。

相关研究表明,不同来源的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶性质差异较大。细菌来源的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶最适pH呈中性或碱性,集中在6.0-8.0<sup>[14]</sup>之间;真菌分泌的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的最适pH一般在酸性范围内,主要在4.0~7.0<sup>[14]</sup>之间。Rojas<sup>[15]</sup>等从白黄笋顶孢霉菌(*Acrostalagmus luteo albus*)中分离到一种 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶,其最适pH为8.0,它可以在碱性条件下水解橘皮苷、柚皮苷以及槲皮苷等糖苷物质。此外,即使同种生物也可合成性质不同的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶。来源于嗜热细菌PRI-1686的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶RhmA和RhmB的最适pH显著不同,其中RhmA最适pH值为7.9,而RhmB最适pH值为5.0~6.9<sup>[10]</sup>。来自*L. plantarum* NCC245的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶rhaB<sub>1</sub>和rhaB<sub>2</sub>的最适pH和最适温度都不同,其中rhaB<sub>1</sub>的最适温度为50℃,最适pH为7.0;而rhaB<sub>2</sub>最适温度为60℃,最适pH为5<sup>[16]</sup>。虽然国内外很多学者对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的酶学性质进行了大量研究,且测定了3个 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的晶体结构,但目前尚未完全阐明该酶结构特征及性质的关系,限制了开发优良性质 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的效率。因此,进一步研究酶性质多样性和酶结构关系具有重要意义,该方面研究不仅可以丰富食品酶学理论,还可为该酶改造及应用提供更广泛信息。

本研究小组在前期试验中筛选得到一株高产柚皮苷酶的棘孢曲霉<sup>[17]</sup>,并发现 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶是该柚皮苷酶的主要活性成分<sup>[18]</sup>。虽然有学者从棘孢曲霉中发现了两种 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶rhaA和rhaB<sup>[19]</sup>,但对棘孢曲霉 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶结构和性质关系研究还不够深入。在此背景下,本论文的目的在于纯化棘孢曲霉 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶,研究结构和酶学性质特征,为该酶的开发利用提供基

础信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与设备

AKTA Purify 纯化仪, DEAE-Sepharose FF 柱和 Sephacryl S-300 HR 凝胶树脂购自瑞典 Amersham Biosciences 公司; waters 2695 液相色谱仪、C<sub>18</sub>反相色谱柱购于 Waters 公司; Avanti J-25 离心机购于 Beckman Coulter 公司; UV-2600A 紫外检测器购于 UNICO(上海)公司。

### 1.2 药品及原材料

柚皮苷( $\geq 98\%$ )、柚皮素( $\geq 98\%$ )、普鲁宁( $\geq 99\%$ )购于西安小草植物科技有限责任公司;柠檬酸(AR)购于汕头西陇化工股份有限公司,磷酸氢二钠(AR)购自国药集团化学试剂有限公司,甲醇(GR)、乙腈(GR)购于 Tedia Company Inc.公司; SDS-PAGE 用标准蛋白购于加拿大 Fermentas 公司。

棘孢曲霉 JMUdb058<sup>[17]</sup>为本实验室保存。

斜面培养基的成分(g/L)为: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5, KCl 0.5, KNO<sub>3</sub> 1.5, 无水 CaCl<sub>2</sub> 0.1, 酵母膏 2.0, 柚皮苷 2.69, 琼脂 20, 初始 pH 为 6.0。

液态发酵培养基的成分(g/L)为: MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.0, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.09, CaCl<sub>2</sub> 0.1, 酵母提取物 1.0, 柚皮苷 5.0, 大豆粉 2.0 及蛋白胨 2.0, 初始 pH 为 6.0。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 棘孢曲霉 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的发酵及粗酶液制备

棘孢曲霉在 28℃ 下活化,活化至 96 h 时后得到成熟孢子,用 0.75% 无菌生理盐水洗孢子,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 将孢子全部打散。用无菌生理盐水调至 OD<sub>600</sub> 为 2.0,得到单孢子菌悬液。将菌悬液按 1% 接种量接种至摇瓶液体培养基中,以 180 rpm 的转速在 28℃ 的条件下进行发酵培养。用纱布在 4℃ 下将发酵液过滤,15,000×g 冷冻离心 20 min,收集上清作为粗酶液。

#### 1.3.2 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶纯化

硫酸铵沉淀:向粗酶液中缓慢加入硫酸铵粉末至饱和度为 40%,持续搅拌 30 min,4℃ 下静置 3 h 后 15000×g 离心 20 min,收集上清,加硫酸铵粉末至 80%

饱和度, 搅拌 30 min, 4 °C 下静置 6 h, 4 °C 条件下 15000×g 离心 20 min, 收集沉淀。

透析: 用最少量的柠檬酸盐缓冲液 (20 mM, pH 6.0) 溶解沉淀, 4 °C 条件下, 用同一柠檬酸盐缓冲液对溶解的样品透析 24 h, 定期更换 6 次透析液, 每次透析液外液的体积至少为透析袋内样品体积的 20 倍左右。

离子交换层析: 用柠檬酸盐缓冲液 (20 mM, pH 6.0) 1 mL/min 平衡 DEAE-Sephrose Fast Flow 柱 (1.6×20 cm) 至 5 倍柱体积, 上样后用 0.8 mol/L NaCl 的柠檬酸盐缓冲液 (20 mM, pH 6.0) 按 0-0.8 mol/L NaCl 线性梯度进行洗脱至 5 倍柱体积, 流速为 1 mL/min; 按 3 mL/管进行收集, 测定并合并具有柚苷酶活性的收集液超滤浓缩。

分子筛层析: 用含有 0.15 mol/L NaCl 的柠檬酸盐缓冲液 (20 mM, pH 6.0) 按 0.4 mL/min 的流速平衡 Sephacryl™ S-300 HR (1.6×60 cm) 柱至 5 倍柱体积, 加入超滤浓缩后的样品, 以 1 倍柱体积分含 0.15 mol/L NaCl 的柠檬酸盐缓冲液 (20 mM, pH 6.0) 进行洗脱, 按照 1 mL/管进行收集, 收集具有  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶活力的样品于 -20 °C 条件下保存。

### 1.3.3 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的质谱分析

表 1 分离肽段梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions for the peptide separation

Time/min	Events Flow rate/( $\mu$ L/min)	Mobile phase/%	
		A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>
0	0.500	95	5
35	0.500	55	45
40	0.500	20	80
45	0.500	20	80
60	0.500	95	5

Note: a Water with 0.1% formic acid; b Acetonitrile with 0.1% formic acid.

将纯化后得到的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶样品, 进行 SDS-PAGE 分析银染后对目的蛋白进行切割, 用超纯水清洗后使用 10% 乙醇和 10% 乙酸进行再脱色, 利用乙腈与 100 ng 经过修饰的测序级胰蛋白酶进行干燥后, 添加 50 mM 的碳酸氢铵在 37 °C, 300 r/min 的条件下孵育 16 h, 消化后用 50% 的乙腈 (内含 0.1% 甲酸) 对肽段进行提取 10 min, 肽段上的溶剂利用真空离心机进行干燥后利用 5% 的乙腈 (内含 0.1% 甲酸) 对肽段进行重悬, 肽段分离待用。肽段的分离及其质量分析试验是在纳升超高压液相系统以及配制有在线纳升电喷雾电离源的 LTQ Orbitrap X 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) 中进行。分离肽段

的梯度洗脱条件见表 1。利用 MASCOT 在线软件将获得的一级、二级质谱 MS/MS 频谱图进行分析, 获得序列信息, 进一步与 Swissprot 真菌蛋白数据库进行检索获得肽段的功能信息。

### 1.3.4 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶空间结构的研究

以蛋白数据库已知的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶晶体结构为模板<sup>[20]</sup>, 在 SWISS-MODEL 在线软件对棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶进行三维空间结构的模拟。并利用 PyMol 软件对模型的序列比对分析。

### 1.3.5 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶亲缘关系分析

从 CAZy (Carbohydrate-Active enzymes Database, CAZy) 网站获取 NCBI 数据库或 Swissprot 数据库相关的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的氨基酸 FASTA 格式序列, 利用 MEGA4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA) 分析软件对序列进行 Clustal\_W 多重比对以及进化树的绘制。

### 1.3.6 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶保守氨基酸分析

利用 DNAMAN 软件, 将每个相关的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的氨基酸序列进行多重序列比对, 找出保守氨基酸。

### 1.3.7 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶催化柚皮苷水解的机制研究

在 Discovery studio 软件中进行  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶催化柚皮苷水解的机制研究, 用 ChemBio3D 软件生成柚皮苷的空间结构, 通过 Swiss-model 在线建模对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶建模。将  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶模型与柚皮苷的模型通过 Discovery studio 软件中的 libdock 模块进行分子对接。

### 1.3.8 pH 值对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的影响试验

最适合 pH 值是在不同 pH 值的反应体系下测定  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶相对酶活力所得到的。所用的缓冲液是浓度均为 50 mM 的柠檬盐缓冲液 (pH 3.0、4.0、5.0、6.0), 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0、7.0), Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0、8.0), 酶促反应温度为 50 °C。

pH 稳定性是将酶液溶解于不同 pH 值的缓冲液中在 4 °C 条件下保存 24 h 后测定相对酶活力来研究。其中所用的溶解缓冲液是浓度均为 50 mM 的柠檬盐缓冲液 (pH 3.0、4.0、5.0、6.0), 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0、7.0), Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0、8.0)。酶促反应温度为 50 °C, 酶反应体系缓冲液为所测得的最适反应 pH、浓度为 20 mM 的柠檬酸盐缓冲液。

### 1.3.9 温度对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷的影响试验

最适反应温度的测定是在不同酶促反应温度下测定相对酶活力所得的, 该温度范围是 30~80 °C; 酶

反应体系缓冲液为 1.3.7 所测得的最适反应 pH、浓度为 20 mM 的柠檬酸盐缓冲液。

将酶液分装后分别置于不同温度下进行水浴保温 1 h 后, 测定  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的相对酶活力, 温度范围是 30~80 °C, 酶反应体系缓冲液为所测得的最适反应 pH、浓度为 20 mM 的柠檬酸盐缓冲液, 酶反应温度为所测得的最适酶促反应温度。

### 1.3.10 金属离子、果胶和糖类效应物对 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的影响

将酶液等量分装后, 与终浓度为 1 mM 及 10 mM (果胶的终浓度为 1 mg/mL 与 10 mg/mL) 的不同效应物混匀, 于 4 °C 条件保存 24 h 后测定相对酶活力, 所选用的效应物为葡萄糖、鼠李糖、果胶、 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 。

### 1.3.11 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶底物特异性的研究

通过研究不同底物转化率来研究  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的底物特异性。所选用的底物为柚皮苷、普鲁宁、橙皮苷、七叶苷、水杨苷、杨梅苷与熊果苷。

### 1.3.12 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷的动力学研究

将酶液与一定浓度梯度的柚皮苷反应, 利用高效液相色谱法测得各酶促反应中  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶活力, 以底物浓度为横坐标, 以酶反应速率为纵坐标分别绘制  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图, 并计算  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶  $K_m$ 、 $V_{max}$  及  $K_{cat}$  等动力学参数。

### 1.3.13 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶活力测定

以柚皮苷 (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 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 底物和 0.1 mL 酶液, 50 °C 反应 5 min 后随即 100 °C 加热 30 min 灭活, 过 0.22  $\mu\text{m}$  的水膜后用液相色谱测定柚皮苷、普鲁宁的量。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 改变至 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。通过柚皮苷量的减少即可计算  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的酶活, 以每分钟每耗 1  $\mu\text{mol}$  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。

## 1.4 数据分析与统计

实验数据为 3 次平行试验的平均值, 一次参数用 Excel 软件计算平均值和标准偏差, 并在作图时添加误差线。利用 SPSS17.0 软件进行正交试验设计并应用

于显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的纯化及质谱分析

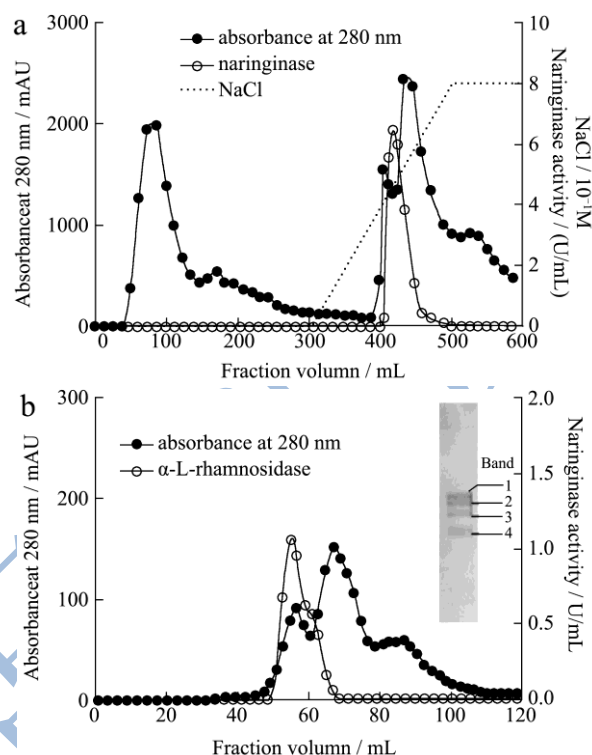


图1 棘孢曲霉 JMUb058 制备柚苷酶纯化图

Fig.1 Purification of naringinase produced by *A. aculeatus* JMUb058

Note: Ninety milliliter (399-489 mL) fractions in DEAE-Sepharose FF column (A) were pooled and subsequently concentrated to 2.5 mL by ultrafiltration prior to separation on Sephacryl S 300HR column (B). The inserted picture in (B) was SDS-PAGE analysis of the purifications on Sephacryl S 300HR chromatography.

对棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的硫酸盐沉淀产物进行柱层析纯化, 经过 DEAE-Sepharose FF 离子交换 (图 1a) 和 Sephacryl<sup>TM</sup> S-300 HR 凝胶过滤层析 (图 1b), 收集图 1b 中 50-70 mL 内的蛋白峰, 获得了含有 4 条条带的粗酶纯化产物 (图 1B 内插图), 对它们进行质谱分析及 Mascot 检索, 从条带 4 中检测到 5 条肽段属于棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 A (登录号: AAK16249.1) (表 2); 而其它三个条带中未发现  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 A 的信息, 但检测到了大量  $\beta$ -D 葡萄糖苷酶的肽段。该结果说明, 纯化得到的酶是  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶和  $\beta$ -D 葡萄糖苷酶的混合物, 这与 Puri<sup>[21]</sup> 关于  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶容易与  $\beta$ -D 葡萄糖苷酶组成复合酶 (柚苷酶) 的研究结果相一致。用纯化得到的酶水解柚皮苷 (图 2), 产

物中不仅有底物柚皮苷 (5.062 min) 和  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的水解产物普鲁宁 (5.818 min), 还有普鲁宁经  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶水解产生的柚皮素 (13.406 min), 该结果进一步验证了纯化产物中含有  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶和  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶两种酶活性。此外, 该结果还说明分离获得的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶是棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 A, 即相关文献报道的 rhaA<sup>[19]</sup>。

表 2 质谱分析出的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶肽段

Table 2 Sequences of the peptide represented by band number 4 in SDS-PAGE patterns of purified naringinase

Amino acid region	Peptide sequence
73~91	<u>R.NIAGIVSLDVTSVSSK.A</u>
178~191	<u>K.GYFHSSDELINR.I</u>
463~499	<u>R.WGPYGAPEAGSTVSPFIGGFEL</u> <u>QAHYLANEPDR.A</u>
504~516	R.LQWGFMLDDPR.M
648~659	R.GLQGGTWTLK.G

Note: Peptide identification was accepted with significance threshold  $p < 0.05$ . Total 5 peptides were analyzed, among which 3 (underlined) were identical to  $\alpha$ -L-rhamnosidase A (Accession No. gi|13241312) from *A.aculeat*.

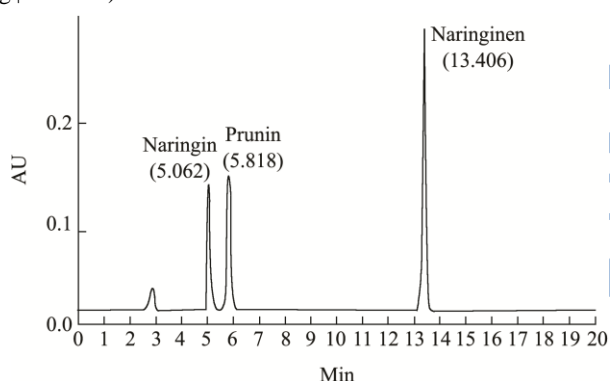


图 2 纯化酶组分水解柚皮苷的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC analysis of the naringin hydrolysis using the purified enzyme fraction

## 2.2 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的结构及序列特征分析

通过查找糖苷水解酶家族数据库中所有的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶, 发现除了少数属于糖苷酶第 106 家族以外, 大部分都分布在糖苷酶第 78 (GH78) 家族。GH78 家族的标志性特征是具有一个 clan-L (alpha/alpha)<sub>(6)</sub>-桶状结构催化结构域, 一个纤连蛋白类型  $\beta$  折叠域经常出现在 N 端, 另一个  $\beta$  折叠域存在 C 端所在的催化模块之中, 还有一个  $\beta$  域插入在 N 端域和催化模块之间 (<http://www.cazy.org/GH78.html>)。2007 年, Cui<sup>[23]</sup>等测定了 *Bacillus* sp. GL1 菌株的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的晶体结构, 如图 3A (Protection Data Bank, PDB)。该  $\alpha$ -鼠李

糖苷酶的结构是一个同源二聚体, 包含有 1908 个氨基酸, 43 个丙三醇分子, 4 个钙离子, 1755 个水分子, 由区域 N, D1, D2, C 组成的  $\beta$ -三明治折叠以及区域 A 五部分组成, 其中区域 A, 即 clan-L (alpha/alpha)<sub>(6)</sub>-桶状结构 (图 3A 中白色区域), 被鉴定出是该酶的催化结构域, 鼠李糖与酶的结合位点便处在该结构的深裂处。以 *B. sp. GL1* 菌株的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的晶体结构作为模板对棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 A (AAK16249.1) 进行空间结构的模拟, 结果如图 3B 所示 (白色区域), 该酶具有与 *B. sp. GL1*  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶极为类似的结构, 即 N 端结构域、C 端结构域及 clan-L (alpha/alpha)<sub>(6)</sub>-桶状催化结构域 A, 而且与之相对应的几个高度保守氨基酸残基都是在催化结构域  $\alpha$ -螺旋桶状结构的底部, 模拟的结果与 Cui 等的结论相一致。该结果从酶空间结构特征的层面上说明本文纯化得到的棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 A 属于糖苷酶 78 家族的成员。

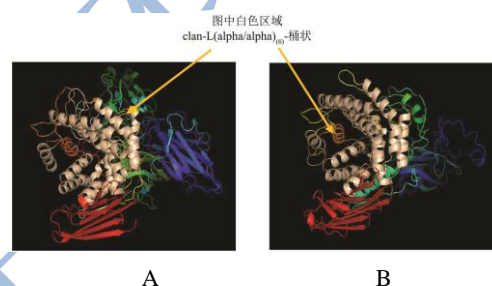


图 3  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的三维结构图

Fig.3 Three-dimensional structure of  $\alpha$ -L-rhamnosidase

Note: Figure (A) was for crystal structure of *Bacillus* sp.  $\alpha$ -L-rhamnosidase (Accession No. AAK16249.1) devied from Protein Data Bank; (B) was for the model of three dimensional structure of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus aculeatus* (AAK16249.1) drawn by PyMol software.

统计分析表明, GH78 家族的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的另一特征是具有 Asp (2 个), Trp, Gly, Thr, Glu, Ser, His 及 Pro 九个完全保守氨基酸残基。本文纯化得到的棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 A 和其他 GH78 家族的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶具有相同保守氨基酸 (表 2)。在 GH28 家族中, 绝大多数都是半乳糖醛酸酶, 他们水解  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接的聚半乳糖醛酸中的半乳糖醛酸酯, 半乳糖醛酸鼠李糖苷酶晶体结构显示出多个 Asp 参与催化, 经过多个学者鉴定得到, Asp202, Asp223, Asp224 为催化氨基酸<sup>[24]</sup>。Cui 等<sup>[23]</sup>通过研究 *B. sp. GL1*  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 (BAB62315.1) 指出, Asp567, Glu572, Asp579 及 Glu841 四个氨基酸残基在 GH78 家族中是高度保守的, 其中 Glu572 在物种演变过程中有一定的变异 (有些时候可转变为 Asp), 但也是高度保守。通

过多重序列比对(表 2)可知,这四个位点分别对应了棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶(AAK16249.1)的 Asp247、Asp252、Asp259 及 Glu523。这些结果从氨基酸的亲水性方面证明了棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 A 属于 GH78 家族中的一员。

从 CAZy 数据库和 GeneBank 数据库搜索 GH 78 完整  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶(酶系统分类号为 E.C 3.2.1.40)序列,获得细菌来源的序列 12 条,真菌来源的序列 11 条。利用 MEGA4.0 软件将这些搜索获得的序列与棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 A 序列(登录号: AAK16249.1)(附图 2)进行双重比对及多重比对,并构建进化树(图 4)可知,以大肠杆菌来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶最早,为单独的一个分支 Blanch A,而另

外一个分支 Blanch B 由第二级的分支组成,分别为 Blanch B-1 与 Blanch B-2,其中 Blanch B-2 再由两个第三级分支组成,分别为 Blanch B-2-1 及 Blanch B-2-2,可以明显地看出除了 Blanch B-1 分支中分布有源于黑曲霉及白曲霉细菌型的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶外,Blanch B-1 与 Blanch B-2-1 的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的来源均为细菌,而 Blanch B-2-2 的来源则全部为真菌类。这清晰地表明了 GH 78 家族不同来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶其进化的早晚以及它们之间的差异性。棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 A(AAK16249.1)由棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 B(AAG13964.1)进化得到,进化时间较黑曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶(XP\_001389086.1)以及白曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶(BAF98236.1)早。

表 3 GH78 家族  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的保守区域

Table 3 Conserved regions of  $\alpha$ -L-rhamnosidase belonging to GH78 family of proteins

Accession number	Conservative region									
	1		2		3		4			
BAB62315.1 * ( <i>Bacillus</i> sp.)	567	DCPSYE QVFWVGD	579	PFMS 831	838	TCWE	841	859	SHCH	862
AAK16249.1 ( <i>A. aculeatus</i> )	247	DGAKRD RLVWPGD	259	PFIG 473	520	TFIE	523	543	SHAH	546
AAG13964.1 ( <i>A. aculeatus</i> ) 2	238	DGAKRDRAVWPGD	250	PFIG 418	455	TLIE	458	478	SHAH	481
BAF98236.1 ( <i>A. kawachii</i> )	244	DGAKRD RLVWPGD	256	PFIG 480	517	TFIE	520	540	SHAH	543
EFL96112.1 ( <i>P. acidilactici</i> ) 2	277	DGIKRD RWIWGGD	289	PYFK 498	535	TVWE	538	560	SLCH	563
CAB53341.1 ( <i>C. stercorarium</i> )	440	DCPQRDERMGWTGD	453	PYLC 671	718	TIWE	721	739	SFNH	742
AAR96046.1 ( <i>T. bacterium</i> )	457	DCPQRDERLGGWTGD	470	PLIC 696	733	TIWE	736	754	SFNH	757
AAV43293.1 ( <i>L. acidophilus</i> )	436	DCPQRDERLGGWTGD	449	PFL 672	709	TIWE	712	730	SLNH	733
ACR19005.1 ( <i>L. plantarum</i> ) 2	218	DGPKRD RRLWI GD	230	PYMY 248	285	TYWE	288	507	SYCH	510
AAR96047.1 ( <i>T. bacterium</i> ) 2	570	DCPAYE QTFWVGD	582	PFMS 803	840	TCWE	843	856	SHCH	859
ABF50852.1 ( <i>E. nidulans</i> )	251	DGAKRDRVWVWIGD	263	PFIS 495	532	TVPE	535	559	SHAH	562
ACR19007.1 ( <i>L. plantarum</i> )	277	DGIKRD RWIWAGD	289	PYFK 496	533	TFWE	536	558	SLCH	561

### 2.3 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的催化机理

采用 Discovery Studio 分子模拟软件中的 LibDock 模块将柚皮苷配体与受体  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶进行分子对

接(图 5),发现在柚皮苷的周围,具有 Val542、Arg537、His544、Glu523、Trp548、Trp214、Trp362 和 Try536 等基团,其中 Trp214 与柚皮苷形成了  $\pi$ - $\pi$  疏水键而将底物与酶牢固的结合在一起(这是因为 Trp214 是一种

芳香族氨基酸, Trp214 上的苯环与柚皮苷上的苯环之间形成一种非共价键从而增强了  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶和柚皮苷之间的相互作用); 当  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶与柚皮苷结合后, 芳香族氨基酸 Tyr536 上的酚基团与柚皮苷上的半缩醛羟基发生酯交换而将底物水解。该结果与相关研究推测 GH78 家族的酶水解糖苷键通过以酸辅助的单一替换或通过质子反相机制相一致<sup>[26]</sup>。

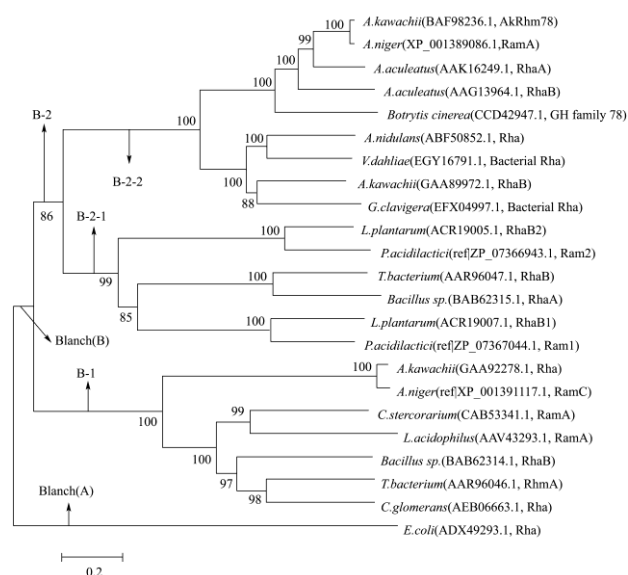


图 4  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 (糖苷水解酶家族 78) 的进化树

Fig.4 Phylogenetic tree showing that  $\alpha$ -L-rhamnosidase belongs to GH78 family

注: 每个分支 bootstrap 的可信度最小的为 85, 均大于 70. 说明所构建的这一系统进化树其结构可靠<sup>[25]</sup>。

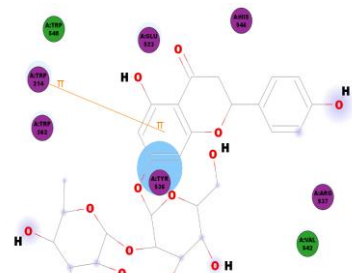


图 5  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶与柚皮苷分子对接的二维平面图  
Fig.5 Two-dimensional plot of molecular docking of  $\alpha$ -L-rhamnosidase and naringin

## 2.4 pH 值和温度对棘孢曲霉 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的影响

本研究  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶最适反应 pH 为 4.0, 在 pH 3~8 的范围内非常稳定, 相对酶活力达到 90% 以上 (图 6a)。该结果与其亲缘关系最近的 *A. aculeatus* RhaB 的最适 pH 一致<sup>[19]</sup>, 但与来源于 *L. plantarum* NCC245<sup>[16]</sup>的 RhaB<sub>2</sub> (最适 pH 为 7) 相差较大。这说

明了来源于不同的微生物的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的最适 pH 特征的差异与图 4 中显示的进化关系具有有较大的相关性。该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在 50 °C 以下表现出稳定性, 但在 50 °C 以上处理 30 min 后, 酶活力已经明显下降, 处理 1 h 后酶活力几乎为零 (图 6a)。

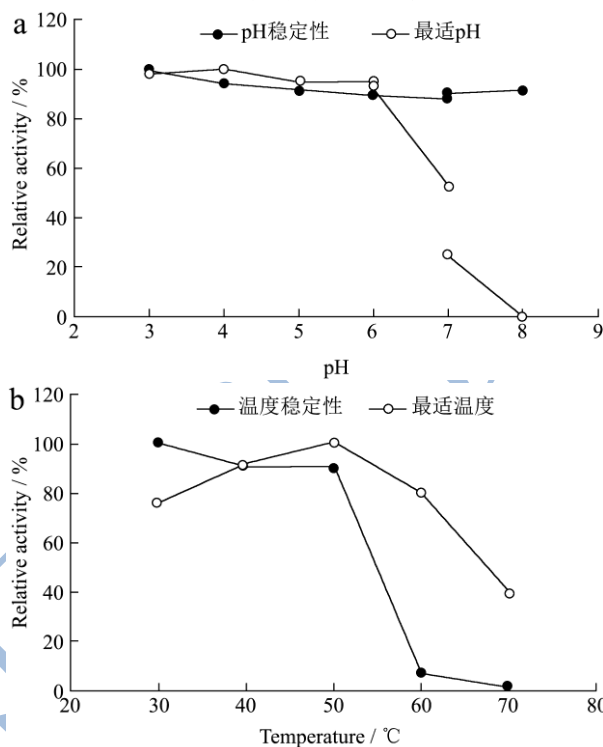


图 6 pH 值及温度对棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的影响

Fig.6 Effects of pH and temperature on  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *A. aculeatus* JMUb058

Note: a: Optimal pH was estimated by analysis of the enzymatic activities in different buffers (pH 3~8). The pH stability was measured by analysis of the activities remained after the enzyme being incubated at 4 °C for 24 h in buffers with different pH values from 3 to 8. The relative activity was the percentage of a detected activity comparing with the largest activity value attained. b: Optimal temperature was estimated by analysis of the enzymatic activities at different temperatures (30~70 °C). The pH stability was measured by analysis of the activities remained after the enzyme was incubated at different temperature for 24 h in citrate buffer.

此外, 本研究的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶最适反应温度为 50 °C, 与其他来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶基本一致<sup>[6, 21, 27, 28]</sup>, 而与其来源于嗜热细菌 PRI-1686 的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 RhmA 和 RhmB 的最适温度 70 °C 存在差异 (表 4)。

## 2.5 效应物对棘孢曲霉 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的影响

由表 5 可知, 其中除了果胶的浓度为 1 mg/mL 与

10 mg/mL 外, 其他的均为 1 mM 与 10 mM 两个浓度梯度。由分析结果可以看出  $Ag^+$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  三种离子对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶活性具有较强的抑制效果, 在 10 mM 的浓度时剩余的酶活力均小于 40%, 而  $Cu^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、鼠李糖、葡萄糖及果胶都显示出一定的抑制作用,

在 1 mM 或 1 mg/mL 浓度下,  $Cu^{2+}$  与  $Fe^{2+}$  显示了一定的激活作用, 而  $Ca^{2+}$  的抑制作用随着浓度的增加有减弱的趋势, 甚至消除。根据报道, 不同效应物对不同来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶其作用效果有着较大的差异<sup>[1]</sup>。

表 4 不同微生物  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的酶学特性

Table 4 Enzymatic properties of the  $\alpha$ -L-rhamnosidase from different microorganisms

source	Microorganism	pH optimum	Temp.optimum /°C	Mw/kDa	pI	Evolutionary relationships parameters
Bacterial	<i>Bacillus</i> sp. <sup>[29]</sup>	6.5~7	40	98 <sup>b,a</sup>	nd	86
	<i>Clostridium stercorarium</i> <sup>[26]</sup>	7.5	60	95 <sup>b</sup>	nd	-
	<i>Bacillus</i> sp. (RhaB1 and RhaB2) <sup>[30]</sup>	6.5~7	40	98 <sup>b</sup> ,106 <sup>b</sup>	nd	-
	<i>Lactobacillus plantarum</i> <sup>[16]</sup> (RhaB1 and RhaB2)	7 5	50 60	73 <sup>b</sup> ,155 <sup>c,a</sup> 57 <sup>b</sup> ,100 <sup>c,a</sup>	nd nd	86
yeast	<i>Pichia angusta</i> X349 <sup>[31]</sup>	6	40	88 <sup>b</sup> ,90 <sup>c</sup>	4.9	-
Fungi	<i>Aspergillus nidulans</i>	4.5~6	60	102 <sup>b</sup>	5	100
	<i>Aspergillus aculeatus</i> (RhaA and RhaB)	4.5~5	nd	92 <sup>b</sup> 85 <sup>b</sup>	6.2 5.2-5.9	100
	<i>Aspergillus kawachii</i> <sup>[32]</sup>	4.5	60	nd	nd	-
	<i>Aspergillus niger</i> <sup>[6]</sup>	4.5	65	85 <sup>b</sup>	4.5-5.2	-
	<i>Aspergillus niger</i> DB056 <sup>[33]</sup>	5	40-55	87 <sup>b</sup>	nd	-

Note: <sup>a</sup>: Molecular weight determined by gel filtration. <sup>b</sup>: Molecular weight determined by SDS-PAGE. <sup>c</sup>: Molecular weight determined by native-PAGE. nd: not detect.

表 5 不同效应物对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的影响

Table 5 Effects of a variety of factors on the purified  $\alpha$ -L-rhamnosidase

Effector(1 mM)	Relative enzyme activity/%	Effector(10 mM)	Relative enzyme activity/%
$Ag^+$	74.75±2.457 <sup>a</sup>	$Fe^{3+}$	31.50±7.657 <sup>a</sup>
pectin	88.87±5.435 <sup>b</sup>	$Fe^{2+}$	35.73±3.718 <sup>a</sup>
$Fe^{3+}$	89.89±4.253 <sup>b</sup>	$Ag^+$	38.95±1.829 <sup>a</sup>
$Ca^{2+}$	93.41±9.521 <sup>b</sup>	$Cu^{2+}$	92.47±5.788 <sup>b</sup>
glucose	95.32±2.781 <sup>bc</sup>	$Ca^{2+}$	97.68±2.341 <sup>b</sup>
ramose	97.51±4.343 <sup>bc</sup>	Ramose	98.67±6.453 <sup>b</sup>
$Cu^{2+}$	106.93±3.121 <sup>c</sup>	Pectin	99.99±7.700 <sup>b</sup>
$Fe^{2+}$	107.19±2.706 <sup>c</sup>	Glucose	100.80±4.865 <sup>b</sup>
Control	100	Control	100

Note: Based on homogeneity test of variance, Duncan's test was used for describing One-way analysis of variance (ANOVA) about effects of various effectors on  $\alpha$ -L-rhamnosidase of naringinase comparing with the activity of pretreatment (100%). The concentrations of effectors were 1 mM (pectin 0.1 mg/mL) and 10 mM (pectin 1 mg/mL), respectively. Different letter indicate significant differences among values.

Yanai<sup>[31]</sup>等从 *Pichia angusta* X349 中纯化鉴定出的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在 1 mM  $Fe^{2+}$  作用下显示出微弱的激活作用。Yu<sup>[34]</sup>等纯化鉴定出来的纹股蓝皂甙  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在 20 mM  $Cu^{2+}$  及 10 mM  $Fe^{2+}$  作用下显示出激活作用。Yadav<sup>[35]</sup>等学者从桔青霉 MTCC-8897 中纯化鉴定的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在低浓度 0.5 mM 的  $Cu^{2+}$  作用下, 有显著的抑制作用。Srguleng<sup>[8]</sup>等从猪肝脏中

分离纯化出来的薯蓣皂甙  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在  $Ca^{2+}$  浓度增加过程中, 显示出高浓度下有激活作用。Galleg<sup>[3]</sup>等纯化鉴定的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在 10 mM  $Ca^{2+}$  作用下, 有一定激活作用。Birgisson<sup>[10]</sup>等从新型嗜热菌中分离得到的两个耐热的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在 2 mM 浓度下的  $Ca^{2+}$  中没有影响。本研究结果与 Yanai、Srguleng、Gallego 等学者的研究结果相似, 但与 Yu、Yadav,



Birgisson 等学者的研究相反, 其原因是不同来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在空间结构上存在差别, 同样的金属离子与不同的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶作用过程中与不同的位点相结合, 从而对酶的活性产生了不同的影响。

## 2.6 棘孢曲霉 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的底物特异性

及酶动力学特征

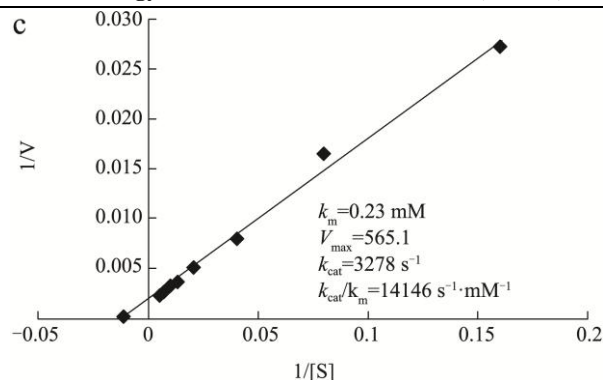
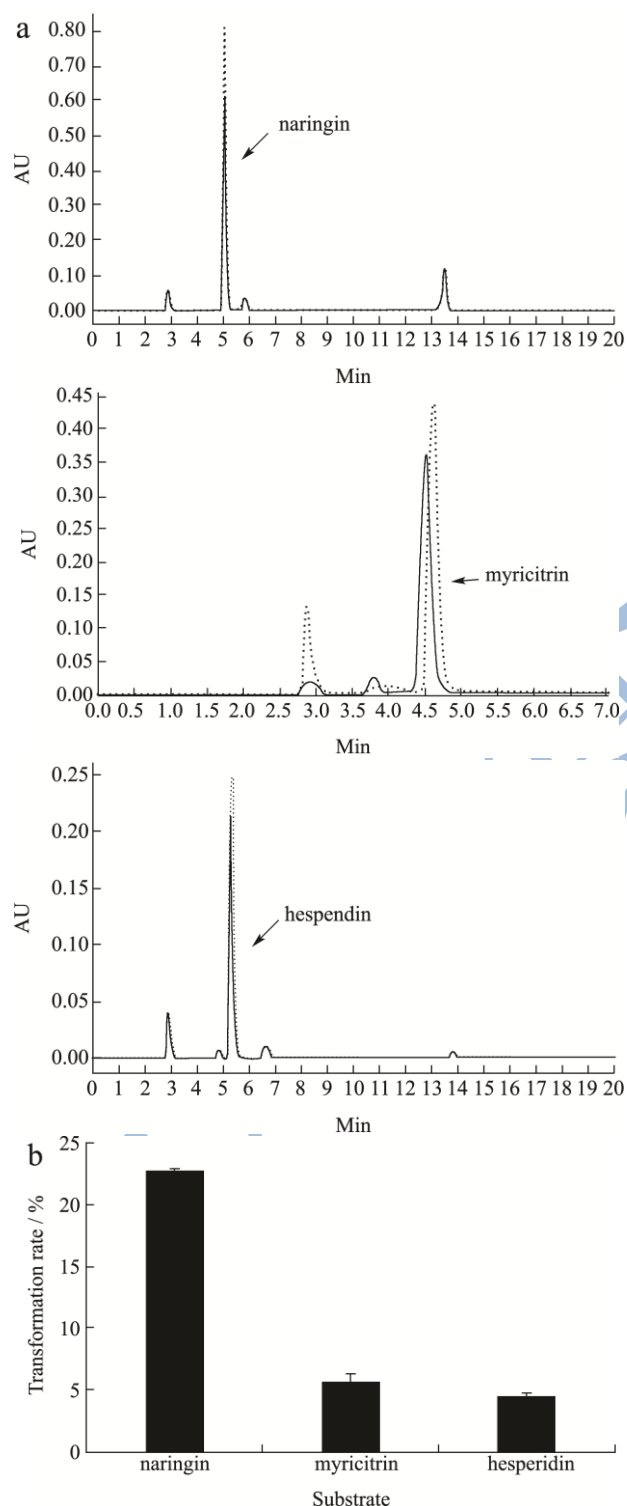


图7  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶底物特异性及双倒数曲线图

Fig.7 Substrate specificity and Lineweaver-Burk plot of  $\alpha$ -L-rhamnosidase

Note: a: Three glycosides containing terminal rhamnose, naringin, myricitrin and hesperidin, were used to investigate the substrate specificity of the  $\alpha$ -L-rhamnosidase. Transformation rate was the percentage of the hydrolyzed concentration in the total concentration before enzyme reaction. The numbers followed by different lowercase superscript letters means statistically different ( $P < 0.5$ ) b: Lineweaver-Burk of  $\alpha$ -L-rhamnosidase

本研究  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶能够水解柚皮苷、橙皮苷和杨梅苷, 该结果表明该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶可以催化水解  $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,6 键释放末端鼠李糖残基 (图 7a)。底物转化率测定结果显示柚皮苷是该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的最佳底物 (图 7b)。通过分子对接模拟软件分析, 该酶预测出 14 个可能的底物结合腔, 其中有两个结合腔和 98 个对接位点与柚皮苷对接成功, 而只有一个可能的结合腔和 2 个对接位点与杨梅苷和橙皮苷对接, 这比较合理地解释了该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的最佳底物的原因。Yanai<sup>[31]</sup>等纯化鉴定得到的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶可以转化柚皮苷, 芦丁, 橙皮苷, 3-槲皮苷, 水解  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,6,  $\alpha$ -1 糖苷键, 对柚皮苷的转化率最高。Zverlov<sup>[36]</sup>等鉴定的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶可以转化 pNPR, 柚皮苷及橙皮苷。Manzanares<sup>[19]</sup>纯化和鉴定出来的两个  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶都可以转化橙皮苷, 柚皮苷, 芦丁, 且对柚皮苷的转化率最高。通过对比以上学者的研究, 该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶底物特异性与其他  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶基本相似, 说明不同来源  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的底物特异性不随该酶结构进化而变化。

本研究发现该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在水解柚皮苷时, 其动力学符合米氏方程 (图 7c), 该结果与相关研究用对硝基苯酚法<sup>[19, 21, 37]</sup>测定  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶动力学规律相一致。计算动力学参数发现  $K_m$  值为 0.23mM, 动力学参数中  $V_{max}$  值为 565.1 U/mg,  $K_{cat}$  值为 3278  $\text{s}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m = 14146 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ 。来源于 *Bacteroides JY-6*<sup>[38]</sup>以

柚皮苷作为底物测得的  $K_m$  值为 0.89mM, 而来源于 *A. niger*<sup>[6]</sup>的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶以柚皮苷作为底物测得  $K_m$  值为 1.9mM, 这两种都与棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶亲缘性较远, 其性质差异较大。与相关文献报道的动力学参数相比, 本研究棘孢曲霉  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶对于柚皮苷的  $K_m$  值很小, 这说明该酶较其他酶的亲和性比较强。

### 3 结论

通过硫酸铵沉淀、DEAE-Sepharose FF 离子交换层析、SephacrylTM S300HR 凝胶过滤层析从棘孢曲霉液态发酵产物中分离纯化得到  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶。经过 SDS-PAGE, 质谱分析、结构模拟、氨基酸序列分析得到该酶是糖苷水解酶 78 家族的一个成员。通过构建系统发育树发现该酶与细菌中的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶亲缘关系较远, 而与黑曲霉相近。对酶活性中心进行通过分子对接发现了该  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷的作用机理是酸碱催化。通过对其酶学性质的研究, 得到该酶的最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 4.0, 1 mM 与 10 mM 的  $Ag^+$ 、 $Fe^{2+}$  及  $Fe^{3+}$  对该酶有较强的抑制作用, 10 mM 的  $Ca^{2+}$  对该酶有激活作用。该酶能够水解柚皮苷, 橙皮苷及杨梅苷, 其酶动力学符合米氏模型, 水解柚皮苷的  $K_m$  值为 0.23 mM,  $V_{max}$  为 565.1 U/mg,  $K_{cat}$  值为  $3278 s^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m$  值为  $14146 s^{-1}mM^{-1}$ 。

### 参考文献

- [1] YADAV V, YADAV P K, YADAV S, et al.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase: a review [J]. Process Biochemistry, 2010, 45 (8): 1226-1235
- [2] CALDINI C, BONOMI F, PIFFERI P G, et al. Kinetic and immobilization studies on fungal glycosidases for aroma enhancement in wine [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1994, 16 (4): 286-291
- [3] ALVARENGA A E, ROMERO C M, CASTRO G R. A novel  $\alpha$ -l-rhamnosidase with potential applications in citrus juice industry and in winemaking [J]. European Food Research and Technology, 2013, 237 (6): 977-985
- [4] GONZ LEZ-POMBO P, FARI A L, CARRAU F, et al. Aroma enhancement in wines using co-immobilized *Aspergillus niger* glycosidases [J]. Food Chemistry, 2014, 143 185-191
- [5] DA SILVA C M G, CONTESINI F J, SAWAYA A C H F, et al. Enhancement of the antioxidant activity of orange and lime juices by flavonoid enzymatic de-glycosylation [J]. Food Research International, 2013, 52 (1): 308-314
- [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 and Biotechnology, 2005, 21 (5): 753-758
- [7] SALAS M P, C LIZ 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
- [8] QIAN S, YU H, ZHANG C, et al. Purification and Characterization of Dioscin ALPHA-L-rhamnosidase from Pig Liver [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2005, 53 (8): 911-914
- [9] BOURBOUZE R, PERCHERON F, COURTOIS J E.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase de *Fagopyrum esculentum* [J]. European Journal of Biochemistry, 1976, 63 (2): 331-337
- [10] BIRGISSON H, HREGGVIDSSON G O, FRIDJ N S S O N 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
- [11] 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
- [12] MIYATA T, KASHIGE N, SATHO T, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of the gene encoding *Sphingomonas paucimobilis* FP2001  $\alpha$ -L-rhamnosidase [J]. Current Microbiology, 2005, 51 (2): 105-109
- [13] MUTTER M, BELDMAN G, SCHOLS H A, et al. Rhamnogalacturonan alpha-L-Rhamnopyranohydrolase (A Novel Enzyme Specific for the Terminal Nonreducing Rhamnosyl Unit in Rhamnogalacturonan Regions of Pectin) [J]. Plant Physiology, 1994, 106 (1): 241-250
- [14] 王艳君. 肠球菌中  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的分离纯化及酶学性质研究[D]. 山东轻工业学院, 2011  
WANG Yan-jun. Purification and Characterization of  $\alpha$ -L-rhamnosidase in *Eenterococcus durans* [D]. Shandong Institute of Light Industry, 2011
- [15] 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 & Biotechnology, 2011, 38 (9): 1515-1522
- [16] ÁVILA M, JAQUET M, MOINE D, et al. Physiological and biochemical characterization of the two  $\alpha$ -L-rhamnosidases of *Lactobacillus plantarum* NCC245 [J]. Microbiology, 2009,

- 155 (8): 2739-2749
- [17] 王迪,倪辉,李利君,等.一株棘孢曲霉的鉴定及其柚苷酶合成规律[J].微生物学报,2013,53(7): 691-701  
WANG Di, NI Hui, LI Li-jun, et al. Identification and Characterization of *Aspergillus aculeatus* JMdb058 for Naringinase Production [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53 (7):691-701
- [18] 陈红,倪辉,李利君,等.棘孢曲霉固态发酵柚皮产柚苷酶及其在柑橘果汁脱苦中的应用[J].菌物学报,2013,32(6): 1034-1045
- [19] MANZANARES P, VAN DEN BROECK H C, DE GRAAFF L H, et al. Purification and characterization of two different  $\alpha$ -L-Rhamnosidases, RhaA and RhaB, from *Aspergillus aculeatus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (5): 2230-2234
- [20] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2OKX>, 2012-3-30. [J]
- [21] PURI M. Updates on naringinase: structural and biotechnological aspects [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93 (1): 49-60
- [22] <http://www.cazy.org/GH78.html>
- [23] CUI Z, MARUYAMA Y, MIKAMI B, et al. Crystal structure of glycoside hydrolase family 78  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Bacillus* sp. GL1 [J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 374 (2): 384-398
- [24] PETERSEN T N, KAUPPINEN S, LARSEN S. The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel  $\beta$  helix [J]. Structure, 1997, 5 (4): 533-544
- [25] BALDAUF S L. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial [J]. Trends in Genetics, 2003, 19 (6): 345-351
- [26] ZVERLOV V V, HERTEL C, BRONNENMEIER K, et al. The thermostable  $\alpha$ -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial  $\alpha$ -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase [J]. Molecular Microbiology, 2000, 35 (1): 173-179
- [27] KOSEKI T, MESE Y, NISHIBORI N, et al. Characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its gene [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 80 (6): 1007-1013
- [28] 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
- [29] HASHIMOTO W, MURATA K.  $\alpha$ -L-rhamnosidase of *Sphingomonas* sp. R1 producing an unusual exopolysaccharide of sphingan [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1998, 62 (6): 1068-1074
- [30] HASHIMOTO W, MIYAKE O, NANKAI H, et al. Molecular identification of an  $\alpha$ -l-rhamnosidase from *Bacillus* sp. strain GL1 as an enzyme involved in complete metabolism of gellan [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003, 415 (2): 235-244
- [31] 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
- [32] SCARONI E, CUEVAS C, CARRILLO L, et al. Hydrolytic properties of crude  $\alpha$ -L-rhamnosidases produced by several wild strains of mesophilic fungi [J]. Lett. Appl. Microbiol., 2002, 34 (6): 461-465
- [33] 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
- [34] YU H, LIU H, ZHANG C, et al. Purification and characterization of gypenoside- $\alpha$ -L-rhamnosidase hydrolyzing gypenoside-5 into ginsenoside Rd [J]. Process Biochemistry, 2004, 39 (7): 861-867
- [35] YADAV S, YADAV V, YADAV S, et al. Purification, characterisation and application of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Penicillium citrinum* MTCC-8897 [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2012, 47 (2): 290-298
- [36] ZVERLOV V V, HERTEL C, BRONNENMEIER K, et al. The thermostable  $\alpha$ -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial  $\alpha$ -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase [J]. Molecular Microbiology, 2000, 35 (1): 173-179
- [37] RIBEIRO M H. Naringinases: occurrence, characteristics, and applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90 (6): 1883-1895
- [38] JANG I S, KIM D H. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Bacteroides* JY-6, a human intestinal bacterium [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1996, 19 (12): 1546-1549