

# 黑曲霉 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987酶法制备白藜芦醇和宝霍苷I

巩宇龙<sup>1</sup>, 于坤朋<sup>1</sup>, 彭程<sup>1</sup>, 李利君<sup>1,2\*</sup>, 倪辉<sup>1,2,3</sup>

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建厦门 361021)

(2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建厦门 361021)

(3. 厦门海洋职业技术学院海洋生物学院, 福建厦门 361021)

**摘要:**  $\beta$ -葡萄糖苷酶在酶法制备白藜芦醇和宝霍苷 I 中具有重要作用。为了挖掘具有高效转化效率和对乙醇具有较好耐受性的酶资源, 研究了黑曲霉 CBS 513.88 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 (XP\_001394024.1) 对白藜芦醇和宝霍苷 I 的转化率, 乙醇耐受性以及 pH 值和温度稳定性, 单因素优化其水解虎杖苷和淫羊藿苷制备白藜芦醇和宝霍苷 I。研究表明  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 对虎杖苷和淫羊藿苷的酶活分别为 130.02 IU/mL 和 70.37 IU/mL; 具有较好的乙醇耐受性, 10% 的乙醇体积分数下对酶活力基本无影响, 40% 的乙醇体积分数下其仍能够保持 45% 的酶活力; 最适温度和 pH 值分别为 65 °C 和 4.5。应用 An3987 水解虎杖苷制备白藜芦醇, 65 °C 条件下反应时间 20 min 转化率为 90.43%; 水解淫羊藿苷制备宝霍苷 I, 60 °C 条件下反应时间 40 min 转化率为 92.26%。该研究为黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶制备白藜芦醇和宝霍苷 I 提供了理论基础。

**关键词:**  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 乙醇耐受性; 虎杖苷; 白藜芦醇; 淫羊藿苷; 宝霍苷 I

文章编号: 1673-9078(2025)02-52-60

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.1489

## Enzymatic Preparation of Resveratrol and Baohuoside I by $\beta$ -Glucosidase An3987 from *Aspergillus niger*

GONG Yulong<sup>1</sup>, YU Kunpeng<sup>1</sup>, PENG Cheng<sup>1</sup>, LI Lijun<sup>1,2\*</sup>, NI Hui<sup>1,2,3</sup>

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

**Abstract:**  $\beta$ -Glucosidase plays an important role in the enzymatic preparation of resveratrol and baohuoside I. In order to obtain the enzyme resources with high conversion efficiency and good ethanol tolerance,  $\beta$ -glucosidase An3987 (XP\_001394024.1) was selected from *Aspergillus niger* CBS 513.88 to study its conversion rate between resveratrol and baohuoside I, ethanol tolerance, pH and temperature stability, and its hydrolysis of polydatin and icariin was optimized by

引文格式:

巩宇龙,于坤朋,彭程,等.黑曲霉 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987酶法制备白藜芦醇和宝霍苷I[J].现代食品科技,2025,41(2): 52-60.

GONG Yulong, YU Kunpeng, PENG Cheng, et al. Enzymatic preparation of resveratrol and baohuoside I by  $\beta$ -Glucosidase An3987 from *Aspergillus niger* [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 52-60.

收稿日期: 2023-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871765)

作者简介: 巩宇龙 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬产品加工, E-mail: 913090600@qq.com

通讯作者: 李利君 (1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术领域及产业化应用, E-mail: ljli@jmu.edu.cn

single factor experiments to prepare resveratrol and baohuoside I. The results showed that the activities of  $\beta$ -glucosidase An3987 against polydatin and icariin were 130.02 IU/mL and 70.37 IU/mL, respectively; An3987 possessed good ethanol tolerance, with 10% (V/V) ethanol having no effect on the enzyme activity of An3987, and 40% (V/V) ethanol still letting 45% enzyme activity retained; The optimum temperature and pH were 65 °C and pH 4.5. Using An3987 to hydrolyze polydatin to prepare resveratrol at 65 °C for 20 min, the conversion rate was 90.43%; The hydrolysis of icariin at 60 °C for 40 min, the conversion rate for An3987 was 92.26%. This study provides a theoretical basis for the preparation of resveratrol and baohuoside I by the  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger*.

**Key words:**  $\beta$ -glucosidase; ethanol tolerance; polydatin; resveratrol; icariin; baohuoside I

白藜芦醇和宝藜苷 I 都是生物活性物质, 白藜芦醇是一种非黄酮类多酚物质, 在预防心脑血管疾病、抗癌和抗氧化等方面有重要作用<sup>[1]</sup>。淫羊藿是一种具有强健筋骨、祛风祛湿等功效的中药材, 主要生物活性成分是淫羊藿黄酮类物质。宝藜苷 I 的主要来源是多种淫羊藿黄酮化合物的主要代谢产物<sup>[2]</sup>, 具有增强免疫力, 防止骨质疏松和预防肿瘤的功效<sup>[3]</sup>。近年来, 对白藜芦醇和宝藜苷 I 的制备方法和药理活性关注越来越多。

天然白藜芦醇在虎杖中含量最高<sup>[4]</sup>, 虎杖中的白藜芦醇含量在 0.4% 左右, 白藜芦醇的糖苷前体虎杖苷的含量在 2.4% 左右<sup>[5]</sup>, 虎杖苷的生物利用率低于白藜芦醇<sup>[6]</sup>, 因此, 将虎杖苷转换为白藜芦醇, 是提高白藜芦醇产量的可行方法<sup>[7]</sup>。王珊珊等<sup>[8]</sup>以虎杖为底物, 使用  $\beta$ -葡萄糖苷酶和纤维素酶复合酶制备白藜芦醇, 在 43 °C、pH 值 5.0 条件下, 反应 153 min, 得到制备白藜芦醇的最优工艺。Zhou 等<sup>[9]</sup>以虎杖苷为底物使用  $\beta$ -葡萄糖苷酶制备白藜芦醇, 在 40 °C、pH 值 6.0 的条件下, 反应 4 h, 转化率为 95.3%。

宝藜苷 I 相比淫羊藿苷具有更好的生物活性, 但其在淫羊藿属植物原料中含量低于 0.15%<sup>[10]</sup>。宝藜苷 I 的制备方法包括化学合成法、微生物转化法、酶解法等<sup>[11]</sup>, 主要以淫羊藿苷为底物。与其它方法相比, 酶解法具有更温和的反应条件、高效、无污染且成本低等优点。Zhang 等<sup>[12]</sup>在 45 °C、pH 值 5.5 条件下、反应时间 24 h、使用  $\beta$ -葡萄糖苷酶复合酶水解淫羊藿苷生成宝藜苷 I, 转化率最高。

$\beta$ -葡萄糖苷酶是酶法制备白藜芦醇和宝藜苷 I 的常用酶, 其能够水解虎杖苷中的  $\beta$ -糖苷, 生成白藜芦醇; 选择性地水解淫羊藿苷 C-7 位上连接的 D-葡萄糖, 从而释放出相应的苷元宝藜苷 I (图 1)<sup>[11]</sup>。挖掘具有优良性能的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 有助于提高酶参与转化生产白藜芦醇和宝藜苷 I 的催化效率, 降低工业

生产成本。在已有的报道中, 纤维素酶或  $\beta$ -葡萄糖苷酶均可酶法制备白藜芦醇和宝藜苷 I, 虽然转化率高, 但耗时较长。酶法生产白藜芦醇的过程中, 乙醇作为虎杖苷提取试剂, 使得酶法生产难以同时对这两种底物具有良好的转化效率, 因此具有乙醇耐受特性的  $\beta$ -葡萄糖苷酶可同时高效制备白藜芦醇和宝藜苷 I。本研究在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 得到 16 个黑曲霉 (*Aspergillus niger*) CBS 513.88 来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶对应的氨基酸序列信息, 构建重组质粒, 在毕赤酵母中表达, 并测其酶学性质, 发现大多数酶具有水解天然底物的能力, 其中基因序列登录号为 XP\_001394024.1 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 对制备白藜芦醇和宝藜苷 I, 具有转化时间短, 反应条件温和, 转化率高等优点, 且对乙醇具有较好的耐受性, 在酶法制备白藜芦醇和宝藜苷 I 具有较好的应用价值。

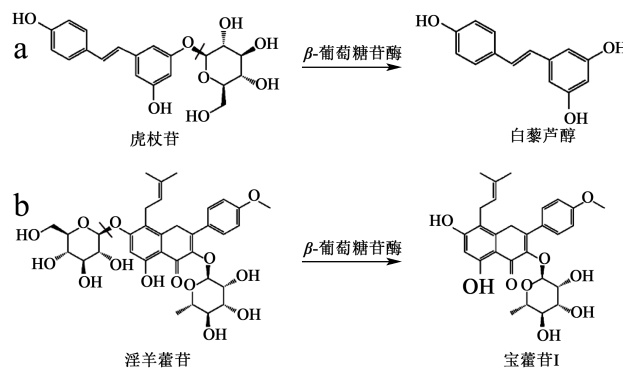


图 1 白藜芦醇制备图 (a) 和宝藜苷 I 制备图 (b)

Fig.1 Preparation of resveratrol (a) and Preparation of baohuoside I (b)

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 来源  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 (XP\_001394024.1) 菌种为实验室前期克隆表达并保存于实验室<sup>[13]</sup>。实验试剂 4-硝基苯基- $\beta$ -D-

吡喃木糖苷 (*p*NPX)、4-硝基苯基- $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷 (*p*NPA)、对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (*p*NPG), 虎杖苷和淫羊藿苷在上海源叶生物技术有限公司购买, 其他试剂为国产或进口分析纯。

### 1.2 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987酶活力的测定

底物 *p*NPG 浓度为 2 mmol/L, 将 50  $\mu$ L 酶液加到 100  $\mu$ L *p*NPG 溶液中, 在 65  $^{\circ}$ C, 水浴 10 min, 使用 1 mL 1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应, 使用酶标仪在 410 nm 测定吸光度。*p*NPG 酶活单位定义为在最适反应条件下, 每分钟生成 1  $\mu$ mol 的 *p*NP 所需的酶量为 1 IU。

### 1.3 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987水解底物酶活力的测定

分别测定  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 在浓度为 2 mmol/L 的不同底物 *p*NPG、*p*NPA、*p*NPX, 虎杖苷和淫羊藿苷的酶活力来研究该酶的底物特异性。虎杖苷的酶活力定义为每分钟生成 1  $\mu$ mol 的白藜芦醇所需的酶量为 1 IU, 淫羊藿苷的酶活力定义为每分钟生成 1  $\mu$ mol 的宝霍昔 I 所需的酶量为 1 IU。

### 1.4 乙醇和DMSO对 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987酶活力的影响

在最适反应条件下, 分别测定该酶在不同体积分数 (10%、20%、30%、40%、50%) 的乙醇、DMSO 处理 24 h 后的酶活力, 以未用有机试剂处理过酶的酶活力为 100%, 计算其相对酶活。

### 1.5 温度和pH值对 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987酶活力的影响

在相应的 pH 值条件下, 通过测定重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶在 30~80  $^{\circ}$ C 每隔 5  $^{\circ}$ C 的酶活力来探究该酶的最适温度。将一定量的酶液在 65  $^{\circ}$ C 条件下进行孵育, 隔 30 min 取一次样, 测定其残余酶活力探究温度稳定性。

以 2 mmol/L 的 *p*NPG 为底物, 分别在 50 mmol/L 的 pH 值 3.0~6.0 柠檬酸盐缓冲液与 50 mmol/L 的 pH 值 6.0~8.0 磷酸盐缓冲液按照相应的酶活测定的方法, 测定重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶与上述不同 pH 值的底物进行反应时的酶活力, 探究重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适 pH 值。测定酶液在不同 pH 值条件下 (pH 值 3.0~8.0), 4  $^{\circ}$ C 放置 24 h 后的残余酶活力, 探究重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶的 pH 值稳定性。

### 1.6 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987制备白藜芦醇和宝霍昔I反应条件优化

准确称量 10 mg 虎杖苷和淫羊藿苷分别加入 1 mL 缓冲液 (50 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液 pH 值 4.0) 溶解后, 分别加入 0.018、0.17、0.34、0.51、0.68、0.85 和 1.02 U 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 对应最适温度, 反应 20 min, 反应结束后, 沸水浴 10 min, 冷却至室温, 过膜, 上样分析, 测定白藜芦醇和宝霍昔 I 的生成量, 探究最适酶用量。

准确称量 10 mg 虎杖苷和淫羊藿苷分别加入 1 mL 缓冲液 (50 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液 pH 值 4.0) 溶解后, 对应最适温度、加酶量 0.34 U, 分别反应 0、1、5、10、20、30、40、50 与 60 min, 反应结束后, 沸水浴 10 min, 冷却至室温, 过膜, 上样分析, 测定白藜芦醇和宝霍昔 I 的生成量, 探究酶解的最佳时间。

准确称量 10 mg 虎杖苷和淫羊藿苷分别加入 1 mL 缓冲液 (50 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液 pH 值 4.0) 溶解后, 在加酶量 0.34 U, 分别在 45、50、55、60、65、70、75、80 和 85  $^{\circ}$ C, 反应 20 min, 反应结束后, 沸水浴 10 min, 冷却至室温, 过膜, 上样分析, 测定白藜芦醇和宝霍昔 I 的生成量, 探究酶解最适温度。

准确称量 10 mg 虎杖苷和淫羊藿苷分别加入 1 mL、50 mmol/L 的 pH 值 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 缓冲液溶解后 (pH 值 3.0~6.0 柠檬酸盐缓冲液、pH 值 6.0~8.0 磷酸盐缓冲液), 对应最适温度、加酶量为 0.34 U, 反应 20 min, 反应结束后, 沸水浴 10 min, 冷却至室温, 过膜, 上样分析, 测定白藜芦醇和宝霍昔 I 的生成量, 确定酶解最适 pH 值。

虎杖苷和白藜芦醇检测条件: 色谱柱  $C_{18}$  (5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm), 柱温 30  $^{\circ}$ C, 进样量 10  $\mu$ L, 检测波长为 306 nm; 以甲醇 (A) 和 0.1% 体积分数的甲酸缓冲液 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 流量为 1.0 mL/min, 梯度洗脱条件 (0~5 min, 15%~20% A; 5~10 min, 20%~23% A; 10~15 min, 23% A; 15~20 min, 23%~18% A)。

淫羊藿苷和宝霍昔 I 检测条件: 色谱柱  $C_{18}$  (5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm), 柱温 30  $^{\circ}$ C, 进样量 10  $\mu$ L, 检测波长为 270 nm; 以超纯水 (A) 和乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 梯度洗脱条件 (0~5 min, 68% A; 5~7 min, 68%~40% A; 7~12 min, 40% A; 12~17 min, 40%~68% A)。



## 1.7 数据统计分析

所有实验重复平行 3 次, 使用 Graph Pad Prism 进行绘图与数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 的重组表达

以往的研究中黑曲霉 *Aspergillus niger* CBS 513.88 主要被发酵工业应用于生产酶和有机酸, 但是黑曲霉来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 (XP\_001394024.1) 尚未有在制备白藜芦醇和宝霍昔 I 方面的研究。在 NCBI 数据库中的 Genome 里以 *Aspergillus niger* 和 Beta-glucosidase 为关键词搜索, 经过筛选得到来源于 *Aspergillus niger* CBS 513.88 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶序列 An3987 (XP\_001394024.1), 基于氨基酸序列计算理论分子量约 82.1 kDa。构建 pPIC9K 重组质粒, 通过电转化操作, 将其在 *Pichia pastoris* GS115 进行异源表达。

### 2.2 $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 水解不同底物的酶活力

分别测定  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 在浓度为 2 mmol/L 的不同底物 pNPG、pNPA、pNPX、虎杖苷和淫羊藿苷的酶活力,  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 对人工底物 pNPG 具有较好的酶活性, 且酶活为 613.28 IU/mL, 对天然底物虎杖苷的酶活力为 130.02 IU/mL, 淫羊藿苷的酶活力为 70.37 IU/mL。对另外两种人工底物 pNPA 和 pNPX 基本上无酶活力 (表 1)。

表 1  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 对不同底物的酶活

Table 1 The enzymatic activities in different substrates of  $\beta$ -glucosidase An3987

底物	酶活/(IU/mL)
pNPG	613.28
pNPA	ND
pNPX	ND
虎杖苷	130.02
淫羊藿苷	70.37

注: ND 表示在本研究条件没有测得酶活力。

### 2.3 乙醇和 DMSO 对 $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 酶活力的影响

在天然产物的提取分离过程中, 通常会用有机

溶剂先进行提取, 如虎杖中虎杖苷的提取常用的提取试剂是乙醇, 有相关研究表明, 在虎杖中加入乙醇的体积分数达到 60%, 虎杖苷的提取率达到最大<sup>[14]</sup>, 白藜芦醇的提取率随着乙醇体积分数的增加有所增加。淫羊藿苷的提取过程中, 乙醇的体积分数在 60% 以上效果最好<sup>[15]</sup>。提取后的虎杖苷和淫羊藿苷作为底物会残留一定量的乙醇参与下一步的反应中, 所以研究有机试剂对于酶活性的影响具有重要的意义。 $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 对低体积分数的有机试剂有一定的耐受性, 当反应环境中乙醇的体积分数达到 10%, An3987 酶活力基本不受影响, 当乙醇的体积分数达到 20% 时, 酶活力受到一定抑制作用, 残余酶活力为 75% 左右; 随着浓度的进一步增大, 酶活力有所下降, 当处于 40% 的乙醇体积分数中时, An3987 仍然能够保持 45% 的活性。DMSO 为溶解虎杖苷的常用试剂, 在 DMSO 体系下,  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 酶活力和乙醇环境下下降趋势基本上一致, 但是在 10% 的 DMSO 体积分数中, An3987 酶活力为 70% 左右, DMSO 体积分数增加到 50%, 残余酶活力在 20% 以下 (图 2)。已有研究表明具有耐受乙醇特性  $\beta$ -葡萄糖苷酶数量较少, 如来自土壤元基因组文库的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 Bg10, 在约 23% 乙醇体积分数条件下残余酶活力大于 70%<sup>[16]</sup>, 来自海洋细菌 *Bacillus* sp. 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 BglD2, 低浓度的乙醇对其具有促进作用, 在 10% 的乙醇体积分数中, 酶活提高了 1.2 倍, 在 25% 乙醇体积分数中保留了 60% 酶活力<sup>[4]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 和已有研究的  $\beta$ -葡萄糖苷酶相比具有出色的乙醇耐受性, 能够更好的应用在高浓度乙醇环境中制备白藜芦醇和宝霍昔 I。

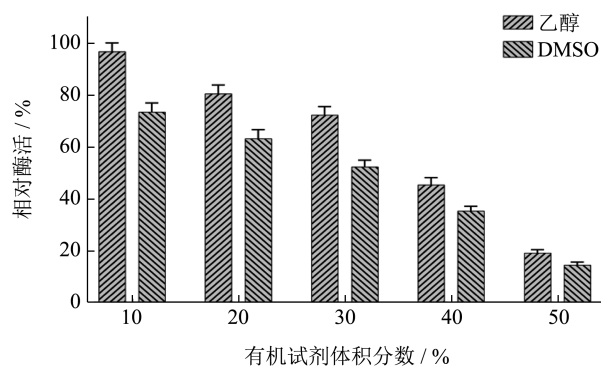


图 2 乙醇和 DMSO 对  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 酶活力的影响  
Fig.2 Effect of ethanol and DMSO on the enzymatic activity of  $\beta$ -glucosidase An3987

## 2.4 温度和pH值对 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987酶活力的影响

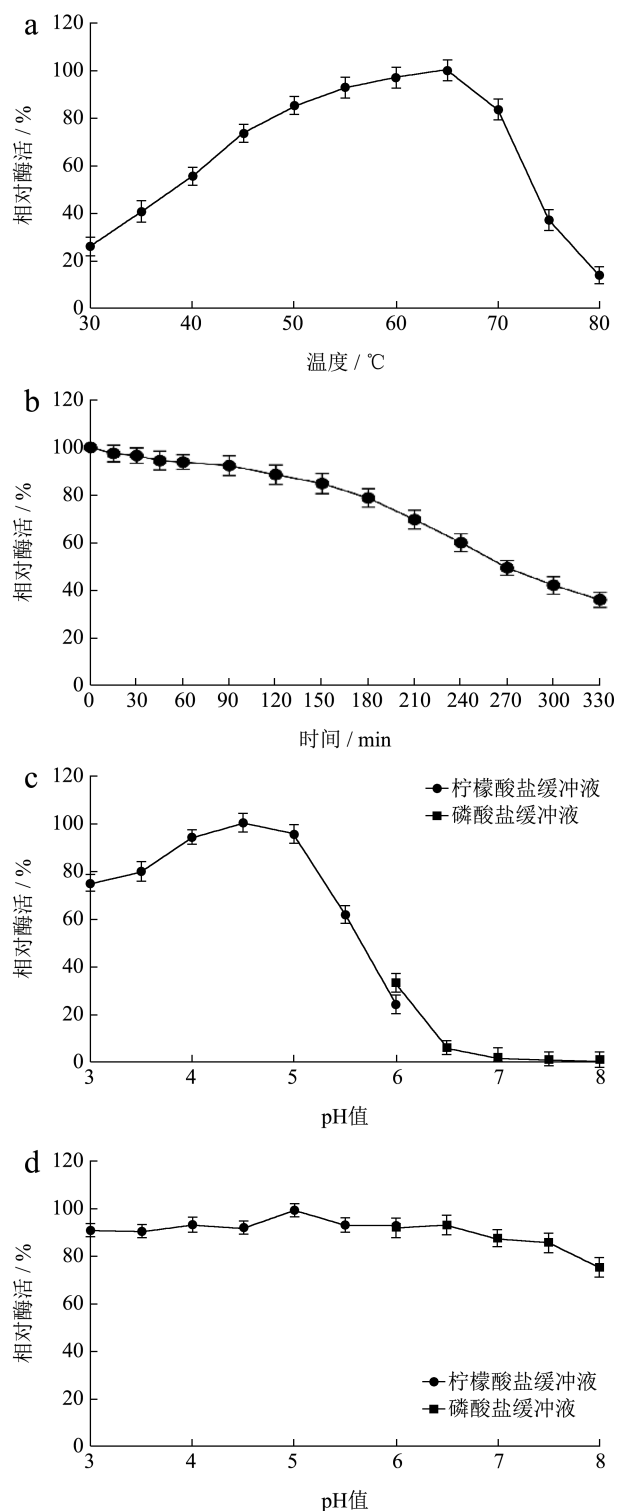


图3 温度和pH值对 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987酶活力及稳定性的影响

Fig.3 Effect of temperature and pH on the enzyme activity and stability of  $\beta$ -glucosidase An3987

注: a: 温度对酶活力的影响; b: 温度稳定性; c: pH值对酶活力的影响; d: pH值稳定性。

黑曲霉属于丝状真菌,在不同的培养基中能产生出不同类别的酶<sup>[17]</sup>,来源于黑曲霉 $\beta$ -葡萄糖苷酶因具有良好的耐酸性能、较强的酶活性及底物水解多样性<sup>[18]</sup>,而受到越来越广泛的关注。 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987最适反应温度为65℃,在30~80℃范围内均有酶活性(图3a),在40~70℃范围内保持超过50%的酶活力,具有良好的温度适应性。这与大多数 $\beta$ -葡萄糖苷酶最适温度一致,通常不同来源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶最适温度的范围在40~100℃之间<sup>[19]</sup>,如来源于*Aspergillus versicolor*<sup>[20]</sup>、*Aspergillus flavus*<sup>[21]</sup>和*Aspergillus niger*<sup>[22]</sup>和*Aspergillus niger*的 $\beta$ -葡萄糖苷酶(AS3.4523)<sup>[23]</sup>。本研究的黑曲霉CBS 513.88的 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987(XP\_001394024.1),其最适温度为60~65℃,具有较好的温度稳定性。最适温度比嗜热淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans*)来源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶Bgl52低10℃<sup>[24]</sup>,与嗜热菌(*Talaromyces thermophilus*)来源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶Bgl.tls的最适温度65℃相近<sup>[25]</sup>,高于酵母糖单孢菌(*Saccharomonospora* sp.)来源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶BglNB11的最适温度40℃<sup>[26]</sup>。酶在催化反应过程中的温度稳定性,在工业应用中具有重要作用<sup>[27]</sup>。

$\beta$ -葡萄糖苷酶An3987最适pH值为4.5(图3c),随着pH值的增大, $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987的酶活性呈现先升高再降低的趋势,当pH值逐渐升高并偏向于碱性时, $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987的酶活性急速下降,在pH值8.0几乎失去活性;可能是由于随着pH值的升高,碱性环境影响了酶活性中心的必需基团,使酶和底物的解离程度减弱,影响酶与底物间的结合和催化能力,进而影响酶的活力<sup>[28]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987最适pH值与相关报道中*Aspergillus niger* NRRL 3122  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适pH值<sup>[29]</sup>,*Dictyoglomus turgidum* DSM 6724的 $\beta$ -葡萄糖苷酶最适pH值<sup>[30]</sup>和*Aspergillus niger* BE-2的 $\beta$ -葡萄糖苷酶最适pH值<sup>[31]</sup>的研究结果相近。 $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987在65℃半衰期可达4h(图3b)表现出良好的温度稳定性。在pH值3.0~8.0的范围内, $\beta$ -葡萄糖苷酶An3987经过处理24h后,仍能够保持80%以上的酶活力,具有较好的pH值稳定性(图3d)。

天然产物在提取过程中,温度和pH值是一个重要因素。温度过低,产物溶出率低,温度过高,温度敏感性产物易分解,但是适当提高温度可以提高溶出率,研究表明,提取温度在60℃左右,白

藜芦醇提取率最高<sup>[5]</sup>。提取温度在 75 °C 条件下, 固定化耐高温  $\beta$ -葡萄糖苷酶提取宝霍昔 I 转化率为 97.6%<sup>[10]</sup>。白藜芦醇在弱酸环境下稳定性好, 碱性环境中容易分解<sup>[32]</sup>, 宝霍昔 I 在水中溶解度很低<sup>[33]</sup>, 生产宝霍昔 I 一般在酸性环境中, 可以有效提高宝霍昔 I 的产量<sup>[34]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 在 70 °C 和 pH 值 5.5 仍保持超过 50% 的酶活力, 具有耐高温能力、较好的温度稳定性和 pH 值稳定性, 适用于在工业中生产白藜芦醇和宝霍昔 I。

## 2.5 $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 制备白藜芦醇单因素优化

使用 An3987 进行白藜芦醇制备, 以白藜芦醇生成量为指标。考察温度、pH 值、酶解时间和加酶量对于 An3987 水解虎杖苷制备白藜芦醇的最优条件, 结果如图 4 所示。

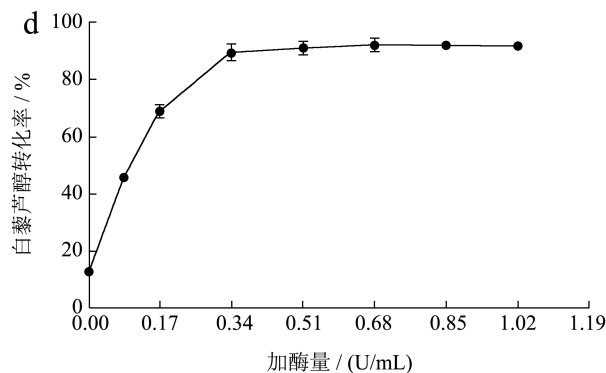
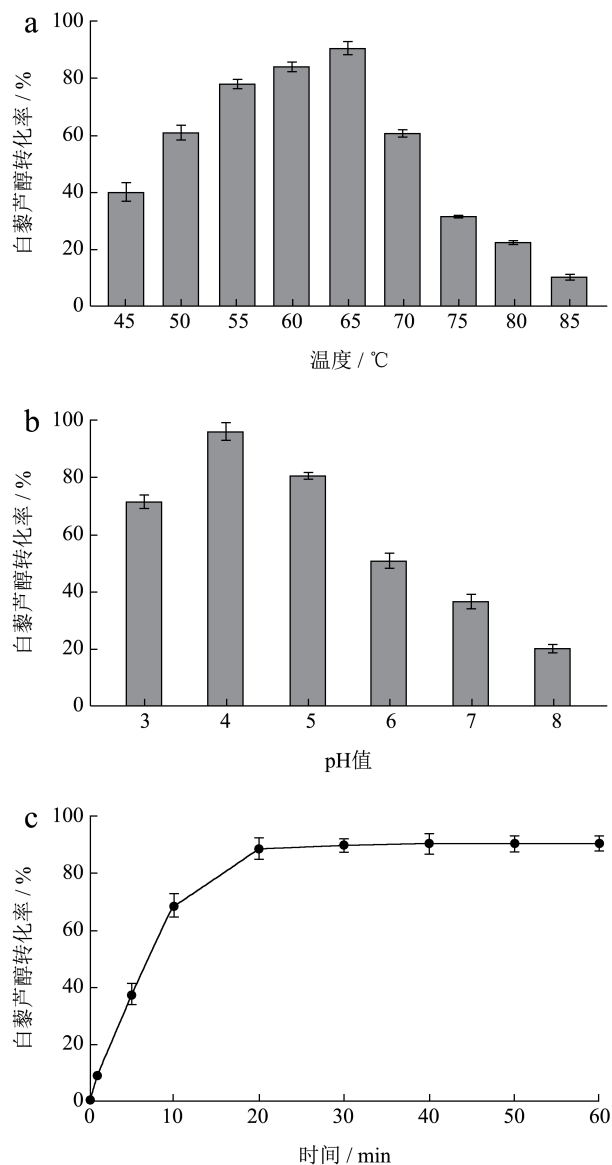


图 4  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 酶解虎杖苷条件优化

Fig.4 Optimization of  $\beta$ -glucosidase An3987 for enzymatic hydrolysis of resveratrol

An3987 在 60~65 °C 白藜芦醇产量最高, 超过 65 °C 产量下降。在 pH 值 4.0 条件下, 白藜芦醇转化率最高。时间优化结果显示, 在反应 20 min 后, 白藜芦醇的含量不再增加。加酶量在 0.34 U, 白藜芦醇的转化率最大。因此, 温度 65 °C、pH 值 4.0、反应时间 20 min, 加酶量 0.34 U 的反应体系下, An3987 对于白藜芦醇的转化率达到最大, 10 mg/mL 虎杖苷转化为白藜芦醇的转化率为 90.43%。

大多数真菌来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶适用于生产应用中, 如 *Penicillium sp.*<sup>[35]</sup>、*Saccharomyces cerevisiae*<sup>[36]</sup>、*Aspergillus niger*<sup>[36]</sup> 和 *Aspergillus oryzae*<sup>[37]</sup>。虽然多种来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶都能够水解虎杖苷制备白藜芦醇, 但一般所需时间较长。如 Kuo 等<sup>[38]</sup>使用 *Dekkera bruxellensis* 来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解虎杖苷制备白藜芦醇, 在底物质量浓度为 8 mg/mL、50 °C、pH 值 5.0 和加酶量 1.05 U/mg 条件下, 反应 40 h, 白藜芦醇转化率约 80%。Zhou 等<sup>[39]</sup>使用 *Sphingomonas sp.* 来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 在底物质量浓度 30 mg/mL、40 °C、pH 值 6.0 的条件下, 反应 4 h, 白藜芦醇转化率为 95.3%。本研究  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 在底物质量浓度为 10 mg/mL、65 °C、pH 值 4.0 和加酶量 0.34 U/mL 条件下, 反应时间 20 min, 白藜芦醇转化率为 90.43%, 相比已有的研究具有短时高效催化虎杖苷的特点。

## 2.6 $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 制备宝霍昔 I 单因素优化

使用 An3987 进行宝霍昔 I 制备, 以宝霍昔 I 生成量为指标。测定温度、pH 值、酶解时间和加酶量单因素对宝霍昔 I 制备的影响, 结果如图 5 所示。

首先对于影响淫羊藿苷水解的 2 个单因素因

素, 温度和 pH 值进行测定, An3987 在 60~65 °C 范围, 宝霍昔转化率最高。超过 65 °C 转化率逐步下降, 因此后续优化条件在 65 °C 下进行, pH 值优化结果显示, pH 值在 5.0 条件下宝霍昔 I 转化率最高。时间优化显示, 反应时间 40 min, 宝霍昔 I 的含量不再增加。酶量优化结果显示, 加入加酶量 0.51 U 时, 宝霍昔 I 的量逐渐不再增加。以上结果显示, An3987 水解淫羊藿苷制备宝霍昔 I 的最优条件为: 底物质量浓度 10 mg/mL、温度 60 °C、pH 值 5.0、加酶量 0.51 U, 反应时间 40 min; 宝霍昔 I 转化率为 92.26%。

对于  $\beta$ -葡萄糖苷酶催化淫羊藿苷制备宝霍昔 I 的研究中, Shen 等<sup>[40]</sup>用活性较高的商品  $\beta$ -葡萄糖苷酶双相体系将淫羊藿苷转化为宝霍昔 I, 在淫羊藿苷质量浓度 50 mg/mL、60 °C、pH 值 4.5 条件下, 反应 2 h, 宝霍昔转化率为 99.92%。Xie 等<sup>[41]</sup>用嗜热菌 *Ignisphaera aggregans* 来源  $\beta$ -葡萄糖苷酶在底物质量浓度 10 mg/mL, 90 °C、pH 值 6.5 的条件下, 反应 90 min, 加酶量 0.8 U/mL, 宝霍昔 I 转化率为 99.48%。本研究中的 An3987 在底物质量浓度为 10 mg/mL, 65 °C、pH 值 4.0 和酶用量 0.51 U/mL 条件下, 反应 20 min, 宝霍昔 I 的转化率为 96%, 相比已有研究, An3987 水解淫羊藿苷制备宝霍昔 I 的反应具有酶用量更少、反应时间短、转化率高

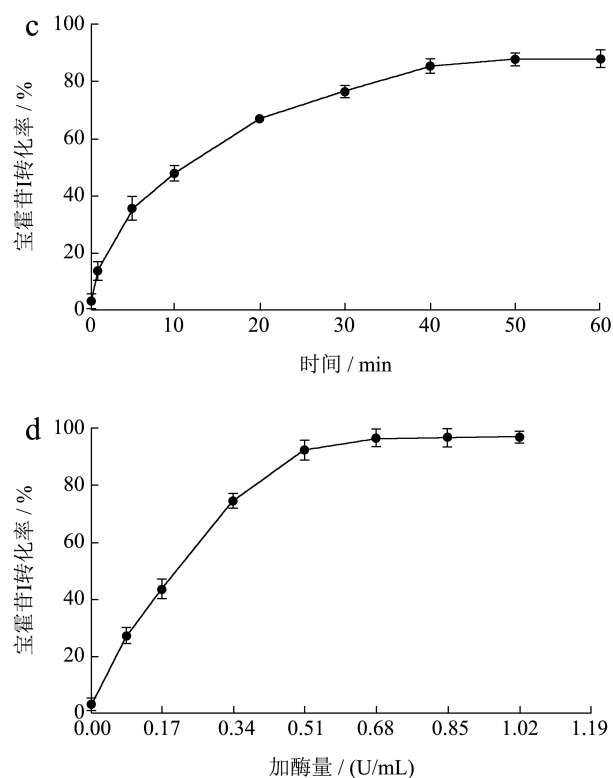
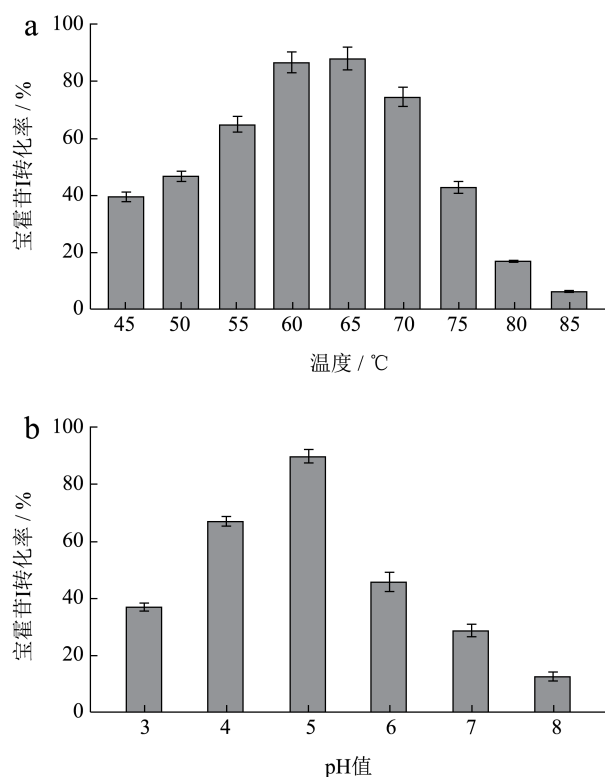


图5  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 酶解淫羊藿苷条件优化  
Fig.5 Optimization of  $\beta$ -glucosidase An3987 for the hydrolysis of icaritin

### 3 结论

本研究黑曲霉 CBS513.88 来源  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 (XP\_001394024.1) 最适温度为 65 °C, 最适 pH 值为 4.5, 具有较好的温度稳定性和 pH 值稳定性。由于虎杖苷易溶于有机溶剂, 在提取过程中会带入一定量的乙醇, 具有耐乙醇特性的  $\beta$ -葡萄糖苷酶显得尤为重要, 在对乙醇的耐受性实验中,  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 表现出优异的耐乙醇特征, 在 40% 的乙醇体积分数中时, An3987 仍然能够保持 45% 的活性。表明其适用于在乙醇环境中水解虎杖苷制备白藜芦醇。

$\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 对虎杖苷和淫羊藿苷均具有较好的水解活力。通过单因素优化实验, 水解虎杖苷制备白藜芦醇, 在 65 °C 条件下反应时间 20 min, 白藜芦醇转化率为 90.43%; 水解淫羊藿苷制备宝霍昔 I, 在 60 °C 条件下反应时间 40 min, 宝霍昔 I 转化率为 92.26%。均具有在短时间内快速且高效的制备白藜芦醇和宝霍昔 I 的能力。

实验表明,  $\beta$ -葡萄糖苷酶 An3987 具备较好的温度、pH 值稳定性和出色的耐受乙醇的特征, 对虎杖苷和淫羊藿苷均具有较好的水解特征, 能够在



较短的时间内快速水解虎杖苷生成白藜芦醇, 水解淫羊藿苷生成宝霍苷 I, 具有酶法制备白藜芦醇和宝霍苷 I 的潜力。

### 参考文献

- [1] CHENG C K, LUO J Y, LAU C W, et al. Pharmacological basis and new insights of resveratrol action in the cardiovascular system [J]. *British Journal Pharmacology*, 2020, 177(6): 1258-1277.
- [2] 王燕萍, 贾旭森, 王艳, 等. 不同干燥方式对淫羊藿黄酮类成分含量及抗氧化活性影响[J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4193-4200.
- [3] CHEN M X, WU J F, LUO Q L, et al. The anticancer properties of herba epimedii and its main bioactive components icariin and icarisside II [J]. *Nutrients*, 2016, 8(9): 563.
- [4] 何成, 吴言, 孟春雨, 等. 新型 $\beta$ -葡萄糖苷酶Bg1D2异源表达及水解虎杖苷能力[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 580-592.
- [5] 张玉千, 张宇, 龚赛男, 等. 虎杖中白藜芦醇和虎杖苷的提取工艺研究[J]. *南京师范大学学报(工程技术版)*, 2020, 20(2): 88-92.
- [6] KUO C H, CHEN B Y, LIU Y C, et al. Production of resveratrol by piceid deglycosylation using cellulase [J]. *Catalysts*, 2016, 6(3): 32.
- [7] WANG C Q, LIU X L, ZHANG M L, et al. Efficient enzyme-assisted extraction and conversion of polydatin to resveratrol from *Polygonum cuspidatum* using thermostable cellulase and immobilized  $\beta$ -glucosidase [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 445.
- [8] 王珊珊, 胡萍, 余少文. 响应面法优化虎杖苷转化为白藜芦醇的工艺条件[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(4): 6-10.
- [9] ZHOU L F, LI S H, ZHANG T, et al. Properties of a novel polydatin- $\beta$ -D-glucosidase from *Aspergillus niger* SK34.002 and its application in enzymatic preparation of resveratrol [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(7): 2588-2595.
- [10] LU S, ZOU K, GUO B, et al. One-step purification and immobilization of thermostable  $\beta$ -glucosidase on Na-Y zeolite based on the linker and its application in the efficient production of baohuoside I from icariin [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2022, 121: 105690.
- [11] 李子豪, 柯仲成, 封亮, 等. 宝霍苷 I 的制备方法及其药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(17): 3444-3450.
- [12] ZHANG S S, LU C N, CAO S P, et al. Efficient production of icariin and baohuoside I from *Epimedium folium* flavonoids by fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidase hydrolysing regioselectively the terminal rhamnose of epimedin C [J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 107.
- [13] 彭程. 三种糖苷水解酶的异源表达及其对茶叶香气改良的作用[D]. 厦门: 集美大学, 2021.
- [14] 陶婷, 刘子博, 张婷, 等. Box-Behnken响应面法优化虎杖提取工艺及其质量标准研究[J]. *成都中医药大学学报*, 2023, 46(5): 43-49, 53.
- [15] 张龙, 李珊珊, 白雪, 等. 基于一测多评法的淫羊藿质量评价方法研究及验证[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(11): 2843-2551.
- [16] GOMES-PEPE E S, SIERRA E G M, PEREIRA M R, et al. Bg10: a novel metagenomics alcohol-tolerant and glucose-stimulated GH1  $\beta$ -glucosidase suitable for lactose-free milk preparation [J]. *Plos One*, 2016, 11(12): e0167932.
- [17] 李利君, 李文静, 于智超, 等. 5种黑曲霉粗酶液对乌龙茶溶液挥发性成分的影响[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2019, 24(4): 267-276.
- [18] 张媛媛, 苏敏, 朴春红, 等. 微生物来源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶在食品工业中应用进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(16): 329-335.
- [19] BOHLIN C, OLSEN S N, MORANT M D, et al. A comparative study of activity and apparent inhibition of fungal  $\beta$ -glucosidases [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107(6): 943-952.
- [20] HUANG C, FENG Y, PATEL G, et al. Production, immobilization and characterization of  $\beta$ -glucosidase for application in cellulose degradation from a novel *Aspergillus versicolor* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 177: 437-446.
- [21] CHEN Z, LIU Y L, LIU L, et al. Purification and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus flavus* and its application in saccharification of soybean meal [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2019, 49(7): 671-678.
- [22] KARAMI F, GHORBANI M, MAHOONAK A S, et al. Fast, inexpensive purification of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* and improved catalytic/physicochemical properties upon the enzyme immobilization: possible broad prospects for industrial applications [J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2020, 118: 108770.
- [23] HAO S, LIU Y P, QIN Y, et al. Expression of a highly active  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* AS3.4523 in *Escherichia coli* and its application in gardenia blue preparation [J]. *Annals of Microbiology*, 2020, 70(1): 32.
- [24] 刘洋, 彭惠, 张余, 等. 嗜热淀粉芽孢杆菌来源 $\beta$ -葡萄糖苷酶的重组表达与酶学性质[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(7): 2050-2059.
- [25] MALLEK - FAKHFAKH H, BELGHITH H.



- Physicochemical properties of thermotolerant extracellular beta-glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides [J]. Carbohydrate Research, 2016, 419: 41-50.
- [26] ZADA N S, BELDUZ A O, GÜLER H I, et al. Cloning, expression, biochemical characterization, and molecular docking studies of a novel glucose tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Saccharomonospora* sp. NB11 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 148: 109799.
- [27] BASSO A, SERBAN S. Industrial applications of immobilized enzymes-a review [J]. Molecular Catalysis, 2019, 479: 35-54.
- [28] 徐星,肖华,黄琳琳,等.黑曲霉胞外 $\beta$ -葡萄糖苷酶的纯化及酶学性质的研究[J].天津科技大学学报,2015,30(5):15-19.
- [29] ABDELLA A, EL-BAZ A F, IBRAHIM I A, et al. Biotransformation of soy flour isoflavones by *Aspergillus niger* NRRL 3122 beta-glucosidase enzyme [J]. Natural Product Research, 2018, 32(20): 2382-2391.
- [30] FUSCO F A, FIORENTINO G, PEDONE E, et al. Biochemical characterization of a novel thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113: 783-791.
- [31] ALI N, XUE Y, GAN L, et al. Purification, characterization, gene cloning and sequencing of a new beta-glucosidase from *Aspergillus niger* BE-2 [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2016, 52(5): 564-571.
- [32] 贾伟炜,赵映瑜,陈振斌.酶解辅助法提取虎杖中白藜芦醇的研究[J].应用化工,2018,47(6):1132-1136.
- [33] JIN X, ZHANG Z H, SUN E, et al. A novel drug-phospholipid complex loaded micelle for baohuoside I enhanced oral absorption: *in vivo* and *in vitro* evaluations [J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2013, 39(9): 1421-1430.
- [34] SHEN Y P, WANG M, ZHOU J W, et al. Eco-efficient biphasic enzymatic hydrolysis for the green production of rare baohuoside I [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 131: 109431.
- [35] SANTA-ROSA P S, SOUZA A L, ROQUE R A, et al. Production of thermostable  $\beta$ -glucosidase and CMCase by *Penicillium* sp LMI01 isolated from the Amazon region [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2018, 31: 84-92.
- [36] DE SOUZA M F, BON E P D, DA SILVA A S. Production of cellulases and beta-glucosidases by *Trichoderma reesei* rut C30 using steam-pretreated sugarcane bagasse: an integrated approach for onsite enzyme production [J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2021, 38(3): 435-442.
- [37] LÜBECK M, LÜBECK P S. Fungal cell factories for efficient and sustainable production of proteins and peptides [J]. Microorganisms, 2022, 10(4) 753.
- [38] KUO H P, WANG R B, HUANG C Y, et al. Characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Dekkera bruxellensis* for resveratrol production [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2018, 26(1): 163-171.
- [39] ZHOU J, LIANG M, LIN Y, et al. Application of  $\beta$ -glucosidase in a biphasic system for the efficient conversion of polydatin to resveratrol [J]. Molecules, 2022, 27(5): 1514.
- [40] SHEN Y P, WANG H Y, LU Y, et al. Construction of a novel catalysis system for clean and efficient preparation of baohuoside I from icariin based on biphasic enzymatic hydrolysis [J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 170: 727-734.
- [41] XIE J C, XU H, JIANG J C, et al. Characterization of a novel thermostable glucose-tolerant GH1 beta-glucosidase from the hyperthermophile *Ignisphaera aggregans* and its application in the efficient production of baohuoside I from icariin and total epimedii flavonoids [J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 104: 104296.