

研究报告

鸟肠球菌(*Enterococcus avium*)中 α -L-鼠李糖苷酶基因的克隆表达及酶学性质

郑鼎玉, 陈婕, 郑紫云, 卢丹丹, 杨官娥*

山西医科大学药学院, 山西 太原 030001

郑鼎玉, 陈婕, 郑紫云, 卢丹丹, 杨官娥. 鸟肠球菌(*Enterococcus avium*)中 α -L-鼠李糖苷酶基因的克隆表达及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 49-60

Zheng Dingyu, Chen Jie, Zheng Ziyun, Lu Dandan, Yang Guan'e. Cloning, expression and enzymology properties of α -L-rhamnosidase gene from *Enterococcus avium*[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 49-60

摘要:【背景】前期工作中筛选出一株产 α -L-鼠李糖苷酶的细菌, 经分子生物学方法鉴定为鸟肠球菌(*Enterococcus avium*)。 α -L-鼠李糖苷酶能够从天然类黄酮化合物中特异性切割末端鼠李糖, 在食品生产、医药加工和化工等方面具有极大的开发前景和应用价值。【目的】克隆、表达鸟肠球菌中 α -L-鼠李糖苷酶基因, 进一步对重组蛋白的酶学性质进行研究。【方法】以鸟肠球菌(*Enterococcus avium*) strain 352 基因组中推定的 α -L-鼠李糖苷酶基因序列为基础, 设计特异性引物扩增其编码区序列。以 pET-28a(+) 为载体构建重组表达质粒, 将重组蛋白在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 感受态细胞中进行诱导表达。使用镍亲和层析纯化重组蛋白, 以 pNPR 为底物测定重组蛋白的酶学性质。【结果】重组蛋白 EaRha1 分子量大小约为 130 kDa。以 pNPR 为底物, EaRha1 最适 pH 是 7.0, 最适温度为 50 °C, 在 pH 5.0–8.0 稳定性较好, 在 40 °C 以下能保持较高酶活。金属离子对 EaRha1 有不同程度的促进或抑制作用。甲醇对 EaRha1 有抑制作用, 并且抑制作用随着甲醇浓度的增大而增强。酶动力学常数 K_m 和 V_{max} 分别为 0.35 mmol/L 和 4.2 μ mol/(mg·min) ($R^2=0.999$)。EaRha1 能催化水解新橙皮苷、柚皮苷和芦丁。【结论】通过对重组蛋白 EaRha1 酶学性质的研究, 确定了该蛋白对黄酮类化合物的水解特性, 为黄酮类化合物的生物转化奠定了理论基础。

关键词: α -L-鼠李糖苷酶; 基因克隆; 蛋白表达; 酶学性质

基金项目: 山西省国际科技合作项目(201803D421065); 中央引导地方科技发展基金(YDZX20201400001443); 国家自然科学基金(30672621, 81173473); 太原市科学技术发展计划(120247-08)

Supported by: International Science and Technology Cooperation Project of Shanxi Province (201803D421065); Central Government Guides Local Scientific and Technological Development Fund (YDZX20201400001443); National Natural Science Foundation of China (30672621, 81173473); Taiyuan Science and Technology Development Project (120247-08)

*Corresponding author: E-mail: yangguane@aliyun.com

Received: 2021-06-09; Accepted: 2021-07-11; Published online: 2021-08-26

Cloning, expression and enzymology properties of α -L-rhamnosidase gene from *Enterococcus avium*

ZHENG Dingyu, CHEN Jie, ZHENG Ziyun, LU Dandan, YANG Guan'e*

School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

Abstract: [Background] A bacterium strain producing α -L-rhamnosidase was screened and identified as *Enterococcus avium* by molecular biological methods in the preliminary work. α -L-rhamnosidase can specifically cut terminal rhamnose from natural flavonoid compounds, which has great development prospect and application value in food production, pharmaceutical processing and chemical industry. [Objective] The α -L-rhamnosidase gene from *E. avium* was cloned and expressed, and the enzymatic properties of the recombinant protein were further studied. [Methods] Based on the putative α -L-rhamnosidase gene sequence in the genome of *Enterococcus avium* strain 352, specific primers were designed to amplify its coding sequence. Recombinant expression plasmid was constructed using pET-28a(+) as vector and the recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) competent cells. The recombinant protein was purified by nickel affinity chromatography, and the enzymatic properties were determined using pNPR as a substrate. [Results] The molecular weight of the fusion protein EaRha1 is about 130 kDa. The optimal pH of EaRha1 is 7.0, the optimal temperature is 50 °C, EaRha1 is stable at pH 5.0–8.0 and can maintain higher enzyme activity below 40 °C. Metal ions can promote or inhibit EaRha1 in different degrees. Methanol has inhibitory effect on EaRha1, and the inhibitory effect increases with the increase of methanol concentration. The kinetic characteristic constants K_m and V_{max} of EaRha1 were 0.35 mmol/L and 4.2 μ mol/(mg·min) ($R^2=0.999$) respectively. The recombinant EaRha1 could catalyze the hydrolysis of neohesperidin, naringin and rutin. [Conclusion] In this study, the hydrolysis characteristics of the protein to flavonoids was determined by studying the enzymatic properties of recombinant protein EaRha1, which laid a theoretical foundation for the biotransformation of flavonoids.

Keywords: α -L-rhamnosidase; gene cloning; protein expression; enzymology properties

α -L-鼠李糖苷酶[E.C.3.2.1.40]是一类广泛存在于自然界中且从天然糖苷(如类黄酮和萜烯基糖苷)中特异性切割末端 α -L-鼠李糖的糖苷水解酶^[1], 在植物^[2]、动物肝脏组织细胞^[3-4]及微生物^[5-6]中均有发现。其微生物来源非常广泛, 主要存在于细菌和真菌中, 包括肠球菌属^[7]、拟杆菌属^[8]、芽孢杆菌属^[9]、新鞘脂菌属^[10]、单胞菌属和乳杆菌属^[11]等属的细菌和曲霉属^[12]、青霉属和犁头霉属^[13]等属的真菌。早期研究中, 国内外学者对真菌中的 α -L-鼠李糖

苷酶的研究较多, 尤其是曲霉属^[12]较为普遍, 近年来, 越来越多的细菌中发现了 α -L-鼠李糖苷酶的存在^[8]。

α -L-鼠李糖苷酶在食品工业、医药和化工工业等方面具有极大的开发前景和应用价值, 在食品工业中主要应用在生产食品添加剂和提升饮料品质如增加香气^[1]、饮料脱苦等; 在医药上主要用于制备多种药物和药物前体^[14]; 在化工工业上可以作为生物催化剂应用到工业生产中^[15]。

自然界中, 黄酮类化合物通常以糖苷的形式存在, 结构复杂多样, 具有多种药理活性^[16], 但此结构类型影响了其在人体内的吸收。 α -L-鼠李糖苷酶具有特异性切割黄酮苷类化合物末端鼠李糖的能力, 可将黄酮苷类化合物转化为相对应的苷元, 增强其药理活性。本实验通过对重组蛋白酶学性质的研究, 确定了蛋白反应的最佳条件, 并在最佳条件下测定了重组蛋白对多种黄酮苷类物质的水解特性, 确定了酶的催化位点, 对酶在工业上的应用提供了理论指导作用。

1 材料与方法

1.1 材料

Enterococcus avium XB1 由本实验室分离保存, 并保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC), 保藏号为 CGMCC21305, GenBank 登录号为 MZ687307。 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 宝日医生物技术(北京)有限公司。 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 北京全式金生物技术有限公司。

pMD18-T 载体, 宝日医生物技术(北京)有限公司, 含有抗氨苄霉素基因; pET-28a(+)载体, 北京索莱宝科技有限公司, 含有抗卡那霉素基因。

限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I、PrimeSTAR HS DNA Polymerase、细菌全基因组提取试剂盒, 宝日医生物技术(北京)有限公司; Ni-琼脂糖凝胶 6FF (His 标签纯化树脂)、氨苄霉素 (Amp)、卡那霉素(Kan)、对硝基苯酚、对硝基苯基- α -L-鼠李吡喃糖苷 (p-nitrophenyl- α -L-rhamnogluco-side, pNPR), 北京索莱宝生物科技有限公司; Blue Plus[®] V Protein Marker (10–190 kDa), 北京全式金生物技术有限公司; 柱式 DNA 胶回收试剂盒、*Taq* PCR MasterMix

(2 \times , blue dye)、改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒、重力型蛋白纯化空柱(5 mL), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 槲皮苷、新橙皮苷、杨梅苷、朝藿定 C、柚皮苷、橙皮苷、芦丁、人参皂苷-Rg2, 成都曼斯特生物科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 全自动高效液相色谱仪, 岛津公司; 迷你双垂直电泳仪, 北京市六一生物科技有限公司; 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 全自动酶标分析仪, 杭州奥盛仪器有限公司; 全自动数码凝胶成像分析系统, 北京赛智创业科技有限公司。

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 琼脂 15.0 (固体培养基添加)。pH 为 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 备用。LB/Amp 培养基: 在 LB 培养基中加入氨苄霉素 100 μ g/mL。LB/Kan 培养基: 在 LB 培养基中加入卡那霉素 100 μ g/mL。

1.2 方法

1.2.1 α -L-鼠李糖苷酶基因的克隆

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒从鸟肠球菌中提取基因组 DNA (gDNA)。通过 NCBI 网站查找到鸟肠球菌基因组数据, 从 *E. avium* strain 352 基因组数据中找到一条 α -L-鼠李糖苷酶基因序列(QCQ 11839.1), 用 Primer 5 软件设计引物(F: 5'-ATGAGAATTTCAAAAATTTTGA TCAATC-3'; R: 5'-TTAAACAAATGAGATTTC CTCCCGTTC-3'), 使用高保真酶扩增 α -L-鼠李糖苷酶基因的编码区。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 10 s, 48 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环。根据 DNA 柱式凝胶回收试剂盒回收目的条带, 将回收的目的基因片段使用 *Taq* PCR MasterMix 于 72 $^{\circ}$ C 下保温 30 min, 以在 PCR 产物的 3'末端添加 A 碱基, 然后与 pMD18-T 载体连接, 转

入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。用 LB/Amp 固体培养基筛选阳性克隆, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序得到的序列在 UniProt (<https://www.uniprot.org/blast/>) 进行比对, 使用 MEGA 5.0^[17] 中 neighbor-joining 方法构建系统发育树, 将扩增得到的鼠李糖苷酶基因命名为 *EaRha1*。

1.2.2 重组蛋白序列的生物信息学分析

结构域预测和信号肽分析: 用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白质结构组件^[18]。

疏水性预测: 使用 ExPASy (<https://www.expasy.org>) 的 Translate、ProtParam 和 ProtScale 工具对 *EaRha1* 进行分子量、等电点等理化性质的预测及疏水性分析。

三级结构预测: *EaRha1* 蛋白的结构通过 ExPASy 上的 SWISS-MODEL 平台(<http://swissmodel.expasy.org>) 进行预测^[19], 预测结果通过 VMD 软件进行可视化。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达

将 1.2.1 中设计的特异性引物序列 5'-端引入合适的酶切位点。F1: 5'-CTAGCTAGCATGAGAATTTCAAAAAT-3' (引入酶切位点 *Nhe* I); R1: 5'-CCGCTCGAGTTAAACAAATGAGATTT-3' (引入酶切位点 *Xho* I)。以目的基因片段为模板, 使用带酶切位点的引物进行 PCR 扩增, PCR 反应条件: 98 °C 10 s, 35.6 °C 15 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 98 °C 10 s, 50.7 °C 15 s, 72 °C 3 min, 25 个循环。将纯化的目的基因片段和 pET-28a(+) 载体分别使用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 经 T4 连接酶连接后, 转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。用 LB/Kan 固体培养基进行阳性克隆筛选, 并通过 PCR 和测序进行验证。将重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) 表达感受态细胞, 于 LB/Kan 固体培养基上进行阳性

重组子筛选。

在 37 °C、180 r/min 下, 将阳性重组子于 LB/Kan 液体培养基中培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 加入 0.5 mmol/L IPTG 进行重组蛋白诱导, 诱导时间为 12 h, 诱导温度为 30 °C。4 °C、3 500 \times g 离心 20 min 收集菌体, 超声破碎(4 °C、工作时间 10 s, 间歇时间 20 s)至无黏性的流体后再次离心并收集上清液。使用 Ni 重力柱纯化蛋白, 将层析柱平衡后, 分别使用浓度为 20、50、100、150、200、250、300 mmol/L 的咪唑缓冲溶液进行洗脱, 对洗脱后的蛋白进行 SDS-PAGE 分析。使用改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.4 重组 α -L-鼠李糖苷酶的酶学性质

将 *EaRha1* 酶活力单位定义为: 在最适条件下, 每分钟内生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需 *EaRha1* 酶的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

重组酶 *EaRha1* 的活性测定: 以 pNPR 为底物来测定 *EaRha1* 的活性。将 70 μ L pH 7.0 的磷酸缓冲液与 10 μ L 终浓度为 1 mmol/L 的 pNPR 混合, 于 50 °C 保温 2 min 后立即加入 20 μ L 终浓度约为 10 μ g/mL 的 *EaRha1*, 50 °C 继续反应 5 min 后, 迅速加入 100 μ L 浓度为 1 mol/L 的碳酸钠终止反应并显色, 立刻于 405 nm 处测量吸光度。

(1) 最适 pH 的测定

在 30 °C 条件下, 分别于 pH 值 3.0–6.0 (50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)、6.0–8.0 (50 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液)、8.0–10.0 (50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液) 测定重组蛋白的酶活。将测得的最高酶活定义为 100%, 计算不同 pH 下重组酶 *EaRha1* 的相对酶活力。

(2) 最适温度的测定

在最适 pH 条件下, 分别于 25–70 °C (间隔 5 °C) 测定重组蛋白的酶活。将测得的最高酶活定义为 100%, 计算不同温度下重组酶 *EaRha1*

的相对酶活力。

(3) pH 稳定性和温度稳定性的测定

分别于 4 °C 和 50 °C 检测酶的 pH 稳定性: 将重组酶 EaRha1 保存在上述一系列不同 pH 值的缓冲液中, 于 4 °C 或 50 °C 保存 12 h, 然后在最适反应条件下测定其残存酶活力。将测得的最高酶活定义为 100%, 计算不同 pH 下重组酶 EaRha1 的相对酶活力。

将重组酶 EaRha1 在一系列不同温度 (25–70 °C, 间隔 5 °C) 下保存 12 h, 然后于最适反应条件下测定其残存酶活力。将测得的最高酶活定义为 100%, 计算不同温度下重组酶 EaRha1 的相对酶活力。

(4) 酶动力学常数的测定

在最适条件下, 将重组蛋白分别与浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mmol/L 的 pNPR 反应, 测定重组蛋白的酶活。以不同浓度 pNPR 的倒数为横坐标, 以不同浓度 pNPR 下重组酶 EaRha1 反应速率的倒数为纵坐标, 基于米氏方程进行双倒数作图, 计算出重组酶 EaRha1 的 V_{\max} 和 K_m 值。

(5) 金属离子对酶活性的影响

在最适条件下, 分别于体系中加入终浓度为 10 mmol/L 的不同金属离子溶液(K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Al^{3+}), 测定不同金属离子对酶活性的影响。以相同条件下不加金属离子的重组酶 EaRha1 的酶活力为 100%, 计算不同金属离子下重组酶 EaRha1 的相对酶活力。

(6) 甲醇浓度对酶活性的影响

大多数黄酮类化合物水溶性较差, 需要使用甲醇溶解后进行后续实验, 因此需要考察甲醇浓度对酶活力的影响。在最适条件下, 分别于体系中加入体积分数为 1%、3%、5%、8%、10% 的不同浓度甲醇溶液, 测定不同甲醇浓度

对酶活性的影响。以相同条件下不加甲醇的重组酶 EaRha1 的酶活力为 100%, 计算不同浓度甲醇溶液下重组酶 EaRha1 的相对酶活力。

(7) 底物特异性的测定

在最适条件下, 将重组蛋白分别与不同的底物反应 12 h 后煮沸 10 min 终止反应, 用 50% 乙腈溶液稀释 5 倍, 离心后使用 HPLC 进行分析。HPLC 检测条件: 岛津 LV-20AT 高效液相色谱系统, 色谱柱为 Diamonsil®C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm)。橙皮苷、新橙皮苷和柚皮苷参照文献[20]检测。杨梅苷、槲皮苷、芦丁、朝藿定 C、人参皂苷-Rg2 分别参照文献[21–25]检测。

2 结果与分析

2.1 α -L-鼠李糖苷酶基因的克隆和生物信息学分析

2.1.1 目的基因编码区序列的扩增

以鸟肠球菌基因组 DNA 为模板, 使用高保真酶对目的基因编码区序列进行 PCR 扩增后得到目的条带。将 *EaRha1* 编码的氨基酸序列在 UniProt 数据库中进行比对并构建系统发育树 (图 1)。UniProt 数据库中, 与 EaRha1 序列相似度最高 (100%) 的序列为推定的 α -L-鼠李糖苷酶 (A0A4P8KCH1), 与之相似度最高 (33.9%) 的已鉴定的 α -L-鼠李糖苷酶序列号为 Q82PP4。*EaRha1* 基因全长为 2 826 bp, 编码的氨基酸个数为 941, 预测的蛋白相对分子量约为 106.96 kDa。该基因编码的蛋白理论等电点 (PI) 为 4.83, 在酵母细胞中的半衰期 >20 h, 在大肠杆菌中的半衰期 >10 h。

2.1.2 结构域预测和疏水性分析

使用 SMART 进行保守结构预测及信号肽分析, 发现 EaRha1 包含 Pfam Bac_rhamnosid_N、Pfam Bac_rhamnosid、Pfam Bac_rhamnosid 6H 和 Pfam Bac_rhamnosid_C 这 4 个保守结构域 (图 2A),

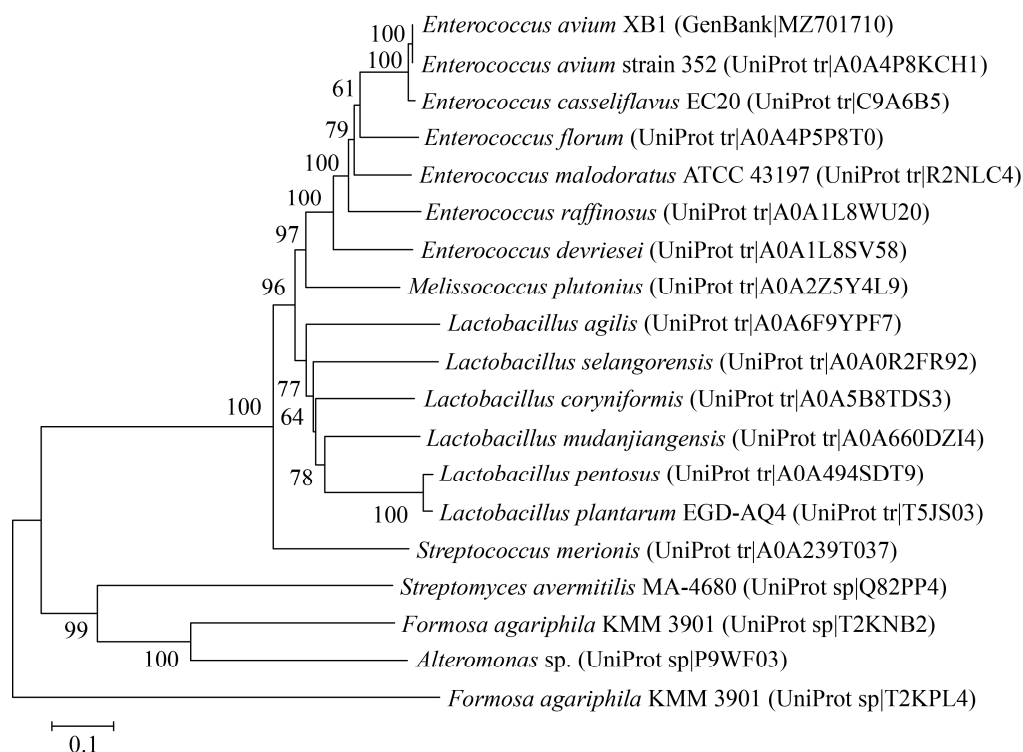


图1 EaRha1 的系统发育树 括号中的序号表示 GenBank/UniProt 登录号; 分支上的数字为 1 000 次 bootstrap 分析所得值, 仅显示大于 50% 的值; 标尺 0.1 为进化距离

Figure 1 Phylogenetic tree of EaRha1. The numbers in parenthesis represent GenBank/UniProt accession numbers; Bootstrap values >50% based on 1 000 replications are shown at branch nodes; Bar, 0.1 substitutions per amino acid positions.

无信号肽序列。EaRha1 蛋白的总平均亲水性为 -0.361, 疏水性分析结果见图 2B, 表明 EaRha1 蛋白无明显疏水性结构, 有较好的亲水性。

2.1.3 三级结构预测

利用 SWISS-MODEL 网站对 EaRha1 进行建模分析, 以 6gsz.1.A (PDB-ID) 为模板, 其与 EaRha1 序列相似性达到 37%, 达到同源建模的要求。根据建模分析的结果(图 2C)预测, EaRha1 具有 α 螺旋、 β 折叠及无规卷曲等二级结构。

2.2 重组蛋白的诱导表达

将重组菌株在最适条件下诱导 12 h, 超声破碎后得到 EaRha1 粗酶液, 经不同浓度咪唑缓冲液洗脱, SDS-PAGE 分析见图 3, 由图 3

可知, EaRha1 的实际蛋白分子量约为 130 kDa (图 3 方框标示), 在咪唑浓度为 100 mmol/L 时洗脱, 目标条带单一、清晰, 150–300 mmol/L 咪唑洗脱液未洗脱出蛋白。

2.3 重组 α -L-鼠李糖苷酶的酶学性质

2.3.1 最适 pH 和最适温度的测定

由图 4A 可知, EaRha1 的最适 pH 为 7.0, 在 pH 4.0–8.0 时能检测到 60% 以上酶活, 在 pH 9.0 和 pH 10.0 时酶活不到 10%, 说明 EaRha1 在酸性条件下更能发挥作用。由图 4B 可知, EaRha1 的最适温度为 50 °C; 在温度为 40–60 °C 时, EaRha1 仍能检测到 60% 以上酶活, 说明 EaRha1 比较耐高温。

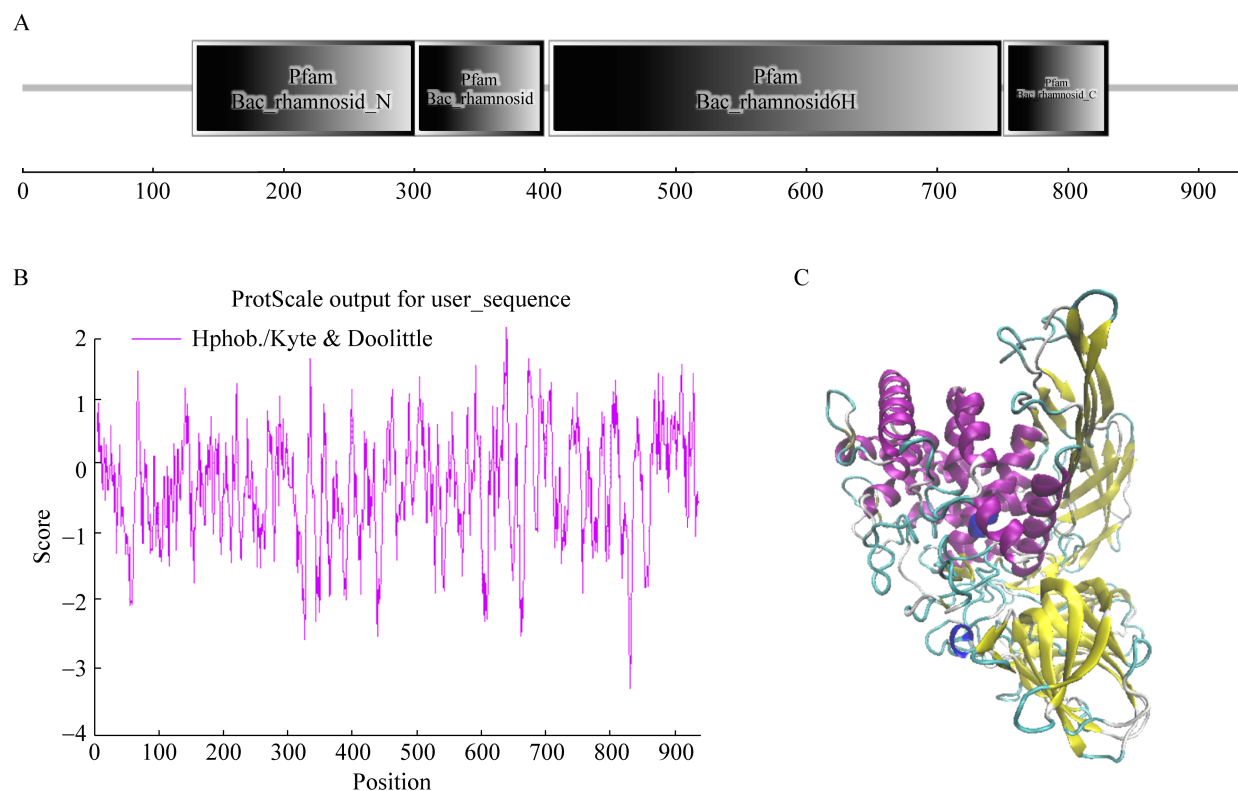


图 2 EaRha1 的保守结构域预测、疏水性分析和三级结构预测 A: EaRha1 的保守结构域预测; B: EaRha1 的疏水性分析; C: EaRha1 的三级结构预测结果

Figure 2 Conserved domain prediction, hydrophobicity analysis and tertiary structure prediction of EaRha1. A: Conservative domain prediction of EaRha1; B: Hydrophobicity analysis of EaRha1; C: The tertiary structure prediction results of EaRha1.

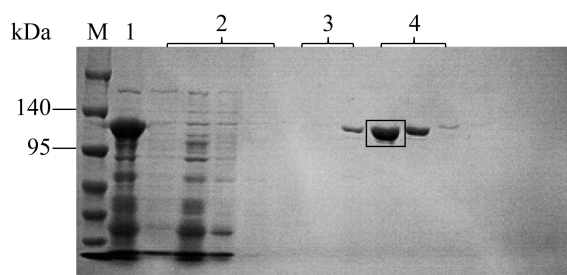


图 3 EaRha1 合并组分 SDS-PAGE 分析 M: 10–190 kDa 蛋白 Marker; 1: 未纯化 EaRha1; 2–4: 20、50、100 mmol/L 洗脱蛋白

Figure 3 SDS-PAGE analysis of the combined components of EaRha1. M: 10–190 kDa protein Marker; 1: Unpurified EaRha1; 2–4: 20, 50, 100 mmol/L elution protein.

2.3.2 pH 稳定性和温度稳定性的测定

由图 5A 可知, EaRha1 在 pH 6.0 时稳定性最好, 4 °C 时在 pH 5.0–8.0 仍能检测到 40% 酶活, 50 °C 时只在 pH 6.0 时能检测到酶活, 其他 pH 条件下酶活力几乎完全丧失。由图 5B 可知, EaRha1 在 40 °C 时温度稳定性最好, 在 25–35 °C 仍能检测到 80% 以上酶活, 45–70 °C 时酶活力几乎完全丧失。

2.3.3 酶动力学常数的测定

以 pNPR 为底物分析 EaRha1 的酶动力学常数, 由图 6 可知, EaRha1 对 pNPR 的酶动力学常数 K_m 和 V_{max} 分别为 0.35 mmol/L 和 4.20 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ ($R^2=0.999$)。

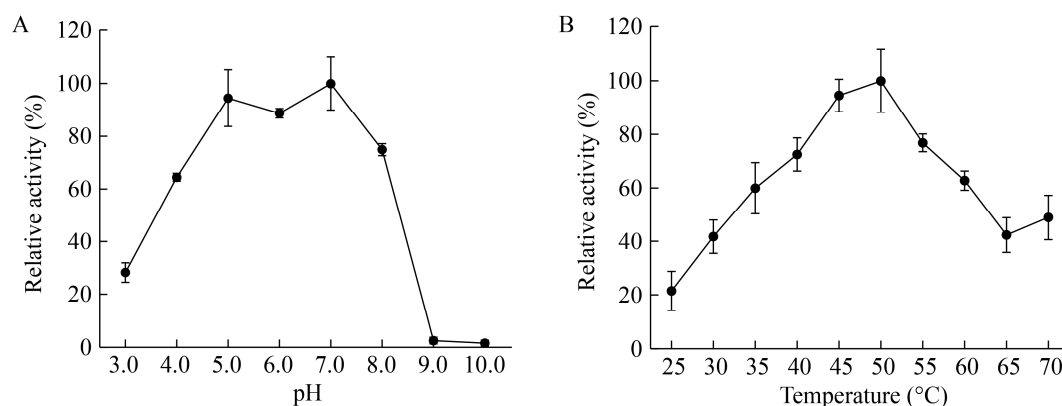


图4 EaRha1 最适 pH 和最适温度的测定 A: EaRha1 最适 pH 的测定; B: EaRha1 最适温度的测定
Figure 4 Determination of optimum pH and temperature of EaRha1. A: Optimal pH determination of EaRha1; B: Determination of optimum temperature of EaRha1.

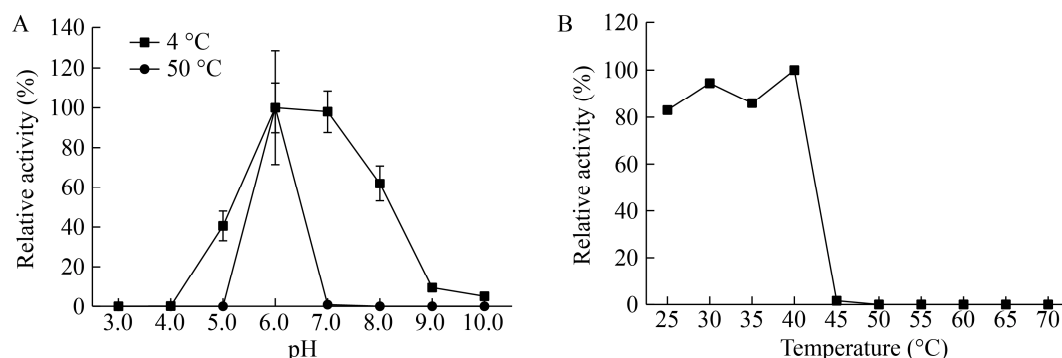


图5 EaRha1 pH 稳定性和温度稳定性的测定 A: EaRha1 pH 稳定性的测定; B: EaRha1 温度稳定性的测定

Figure 5 Determination of pH stability and temperature stability of EaRha1. A: Determination of pH stability of EaRha1; B: Determination of temperature stability of EaRha1.

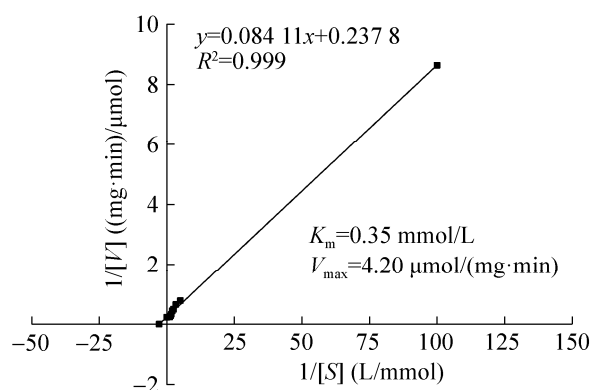


图6 EaRha1 酶动力学常数的测定
Figure 6 Determination of enzyme kinetic constants of EaRha1.

2.3.4 金属离子和甲醇浓度对酶活性的影响

由表 1 可知, 金属离子对酶活力有不同程度的抑制或促进作用。由图 7A 可知, K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 对 EaRha1 的促进作用较弱, Mn^{2+} 和 Fe^{3+} 对 EaRha1 有中等程度的促进作用, Ca^{2+} 和 Co^{2+} 对 EaRha1 有较强的促进作用, Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Al^{3+} 对 EaRha1 有不同程度的抑制作用, 其中, Al^{3+} 对 EaRha1 几乎完全抑制。

由图 7B 可知, 甲醇对 EaRha1 的酶活力有抑制作用, 并且抑制作用随着甲醇浓度的增大而增强。

表 1 金属离子对 EaRha1 酶活性的影响

Table 1 The effects of metal ions on the EaRha1 enzyme activity

金属离子 Metal ions	相对酶活力 Relative activity (%)
H ₂ O	100.00±11.23
K ⁺	109.80±1.24
Na ⁺	104.49±2.17
NH ₄ ⁺	108.65±1.14
Ca ²⁺	171.18±13.37
Co ²⁺	175.33±14.63
Fe ²⁺	68.64±4.96
Mn ²⁺	137.76±8.61
Cu ²⁺	52.15±8.86
Zn ²⁺	37.38±10.15
Fe ³⁺	120.84±4.22
Al ³⁺	0

2.3.5 底物特异性的测定

EaRha1 对不同底物的水解作用结果见表 2。由表 2 可知, EaRha1 重组蛋白能催化水解含有 α -1,2 糖苷键的新橙皮苷、柚皮苷及含有 α -1,6 糖苷键的芦丁, 不能水解含有 α -1,6 糖苷键的橙皮苷、含有 α -1,2 糖苷键的朝藿定 C 和人参皂苷-Rg2, 以及苷元与糖基之间直接相连的杨梅苷和槲皮苷。

3 讨论

在碳水化合物活性酶(carbohydrate active enzyme, CAZy)数据库(www.cazy.org)中, 根据氨基酸序列相似性将 α -L-鼠李糖苷酶分为 3 个糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)家族, 即 GH28 家族、GH78 家族和 GH106 家族。其中, GH78 家族 α -L-鼠李糖苷酶基因表征得较多^[26], GH106 家族表征得较少^[10], 又以真菌来源的 α -L-鼠李糖苷酶基因表征得最多^[6,27]。本实验对鸟肠球菌来源的 α -L-鼠李糖苷酶进行了表达纯化及表征, 该酶属于 GH78 鼠李糖苷酶家族。

本研究中纯化并表征的重组 α -L-鼠李糖苷酶具有可以水解含有 α -1,2 糖苷键的新橙皮苷、柚皮苷及含有 α -1,6 糖苷键的芦丁的特性, 而 Alvarenga 等从海洋微生物中纯化得到一种可以将柚皮苷的 α -1,2 糖苷键水解的 α -L-鼠李糖苷酶^[28], Miake 等从 *Pseudomonas paucimobilis* FP2001 中提取并纯化出一种可以将柴胡皂苷 C 中的 α -1,4 糖苷键水解的 α -L-鼠李糖苷酶^[29]。Wu 等^[30]首次证实了 α -L-鼠李糖苷酶能够水

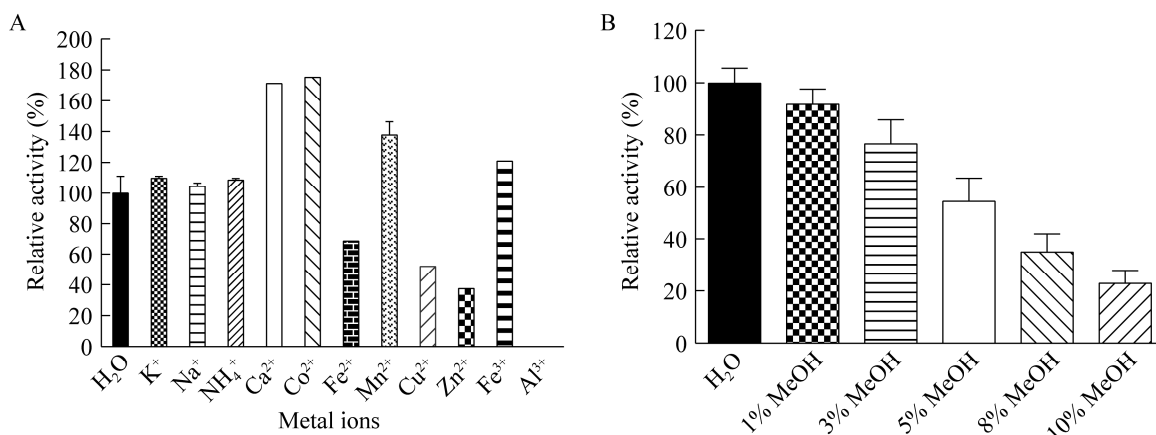


图 7 金属离子(A)和甲醇(B)对 EaRha1 酶活性的影响

Figure 7 Effect of metal ions (A) and methanol (B) on the enzyme activity of EaRha1.

表 2 EaRha1 的底物特异性分析

Table 2 Substrate-specific analysis of EaRha1

底物 Substrates	糖苷键 Glycosidic bond	水解结果 Hydrolysis results
槲皮苷 Quercitrin	苷元与糖基之间直接相连 A glycosidic bond directly linked to a glycosyl group	—
杨梅苷 Myricetin	苷元与糖基之间直接相连 A glycosidic bond directly linked to a glycosyl group	—
橙皮苷 Hesperidin	α -1,6	—
芦丁 Rutin	α -1,6	+
新橙皮苷 Neohesperidin	α -1,2	+
柚皮苷 Naringin	α -1,2	+
朝藿定 C Epimedin C	α -1,2	—
人参皂苷-Rg2 Ginsenoside-Rg2	α -1,2	—

注：—：不能水解；+：可以水解

Note: —: Can not hydrolyze; +: Can hydrolyze.

解鼠李糖苷和鼠李糖苷之间的 α -1,2 糖苷键。Li 等表征了一种可以水解 α -1,2、 α -1,3、 α -1,4、 α -1,6 这 4 种糖苷键的重组 α -L-鼠李糖苷酶^[31]。这说明 α -L-鼠李糖苷酶的底物特异性较强，不同来源的 α -L-鼠李糖苷酶催化位点也不同。大多数情况下， α -L-鼠李糖苷酶只能单一水解 α -1,2、 α -1,3、 α -1,4、 α -1,6 及苷元与糖基之间直接相连的糖苷键^[32]。因此，充分了解和认识不同来源的 α -L-鼠李糖苷酶，对其在生产实践中的应用至关重要。

重组蛋白 EaRha1 在以 pNPR 为底物时的 K_m 值为 0.35 mmol/L，而 Wu 等^[30]于大肠杆菌中克隆并表达的拟杆菌 VPI-5482 中 α -L-鼠李糖苷酶水解 pNPR 的 K_m 值为 2.87 mmol/L。说明不同来源的 α -L-鼠李糖苷酶对 pNPR 的催化能力的不同，该酶在以 pNPR 为底物时的 K_m 值也不同，据统计，其范围约为 0.057–11.000 mmol/L^[12]。

对 EaRha1 的 pH 稳定性和温度稳定性进行研究，结果表明，在 4 °C 条件下的 pH 稳定性比最佳温度下(50 °C)更好。EaRha1 的热稳定性较差，在实际应用中需要考虑低温储存。

然而 Li 等^[33]在大肠杆菌中异源过表达了拟杆菌 VPI-5482 中一个 GH78 家族 α -L-鼠李糖苷酶基因 *BtRha78A*，并对重组 BtRha78A 的酶学性质进行了详细的表征；重组 BtRha78A 能有效水解 pNPR，具有良好的 pH 稳定性和较高的热稳定性并可以耐受低浓度的醇类。说明不同来源的 α -L-鼠李糖苷酶的 pH 稳定性和温度稳定性有较大差异。

4 结论

本研究完成了 *E. avium* 中 α -L-鼠李糖苷酶基因 *EaRha1* 的克隆及原核表达，并通过对重组蛋白 EaRha1 酶学性质的研究，确定了蛋白对黄酮类化合物的水解特性，为黄酮类化合物的生物转化提供了理论基础和指导作用。

随着国内外学者对 α -L-鼠李糖苷酶的深入研究，该酶在各个方面潜在的研究价值和应用前景被发现，但由于该类酶底物催化特异性强、生产成本高等特点，使其在工业应用上受到了一些限制，因此，对 α -L-鼠李糖苷酶的开发和应用还需进行更深入的探索和研究。

REFERENCES

- [1] Li LJ, Gong JY, Wang S, Li GL, Gao T, Jiang ZD, Cheng YS, Ni H, Li QB. Heterologous expression and characterization of a new clade of *Aspergillus* α -L-rhamnosidase suitable for citrus juice processing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(10): 2926-2935
- [2] Hall DH. A new enzyme of the glycosidase type[J]. Nature, 1938, 142(3586): 150
- [3] Qian S, Yu HS, Zhang CZ, Lu MC, Wang HY, Jin FX. Purification and characterization of dioscin- α -L-rhamnosidase from pig liver[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2005, 53(8): 911-914
- [4] 王红英, 钱斯日古楞, 鱼红闪, 臧姝, 金凤燮. 羊肝源穿山龙薯蓣皂苷- α -L-鼠李糖苷酶的分离及其动力学特性[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(4): 663-667
Wang HY, Qian S, Yu HS, Zang S, Jin FX. Isolation and kinetic properties of dioscin- α -L-rhamnosidase from sheep liver[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2007, 28(4): 663-667 (in Chinese)
- [5] 郭子彬, 李大伟, 陆豫. 一株产 α -L-鼠李糖苷酶菌株的分析与鉴定[J]. 南昌大学学报(理科版), 2016, 40(4): 346-350, 359
Wu ZB, Li DW, Lu Y. Analysis and identification of a α -L-rhamnosidase producing strain[J]. Journal of Nanchang University: Natural Science, 2016, 40(4): 346-350, 359 (in Chinese)
- [6] 于越, 倪辉, 李利君, 陈月龙, 朱艳冰, 肖安风, 蔡慧农, 苏文金. 一种棘孢曲霉 α -L-鼠李糖苷酶的结构及性质特征研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(12): 82-92
Yu Y, Ni H, Li LJ, Chen YL, Zhu YB, Xiao AF, Cai HN, Su WJ. Characterization of structure and properties of α -L-rhamnosidase from *Aspergillus aculeatus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(12): 82-92 (in Chinese)
- [7] 王艳君. 肠球菌中 α -L-鼠李糖苷酶的分离纯化及酶学性质研究[D]. 济南: 山东轻工业学院硕士学位论文, 2011
Wang YJ. Purification and characterization of α -L-rhamnosidase in *Enterococcus duerans*[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Polytechnic University, 2011 (in Chinese)
- [8] 吉亚茹. 多形拟杆菌 α -L-鼠李糖苷酶资源挖掘及其结构分析[D]. 太原: 山西大学硕士学位论文, 2018
Ji YR. Discovery of novel α -L-rhamnosidases from *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 and structural analysis[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Shanxi University, 2018 (in Chinese)
- [9] Hashimoto W, Nankai H, Sato N, Kawai S, Murata K. Characterization of α -L-rhamnosidase of *Bacillus* sp. GL1 responsible for the complete depolymerization of gellan[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999, 368(1): 56-60
- [10] Mensitieri F, De Lise F, Strazzulli A, Moracci M, Notomista E, Cafaro V, Bedini E, Sazinsky MH, Trifuoggi M, Di Donato A, et al. Structural and functional insights into RHA-P, a bacterial GH106 α -L-rhamnosidase from *Novosphingobium* sp. PP1Y[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2018, 648: 1-11
- [11] Ávila M, Jaquet M, Moine D, Requena T, Peláez C, Arigoni F, Jankovic I. Physiological and biochemical characterization of the two α -L-rhamnosidases of *Lactobacillus plantarum* NCC245[J]. Microbiology (Reading), 2009, 155(Pt 8): 2739-2749
- [12] 董德源. 黑曲霉中 α -L-鼠李糖苷酶基因的调取、克隆和初步表达[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2019
Dong DY. Extraction, cloning and preliminary expression of α -L-rhamnosidase gene from *Aspergillus niger*[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2019 (in Chinese)
- [13] 王艳君, 刘同军, 曹涛, 张浩忠. α -L-鼠李糖苷酶的研究进展[J]. 中国酿造, 2010, 29(10): 11-15
Wang YJ, Liu TJ, Cao T, Zhang HZ. Research progress of α -L-rhamnosidase[J]. China Brewing, 2010, 29(10): 11-15 (in Chinese)
- [14] Xu L, Liu XH, Yin ZH, Liu Q, Lu LL, Xiao M. Site-directed mutagenesis of α -L-rhamnosidase from *Alternaria* sp. L1 to enhance synthesis yield of reverse hydrolysis based on rational design[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(24): 10385-10394
- [15] Rojas NL, Voget CE, Hours RA, Cavalitto SF. Purification and characterization of a novel alkaline α -L-rhamnosidase produced by *Acrostalagmus luteo albus*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(9): 1515-1522
- [16] 张晓萌, 王圆圆, 王洪晶. 中药材黄酮类化合物的研究进展[J]. 广东化工, 2020, 47(24): 55-56
Zhang XM, Wang YY, Wang HJ. Research progress on flavonoids of Chinese medicines[J]. Guangdong Chemical Industry, 2020, 47(24): 55-56 (in Chinese)
- [17] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J].

- Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [18] Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(D1): D493-D496
- [19] Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3381-3385
- [20] 高红宁, 潘雨柔, 殷奕, 毛春芹, 陆兔林. HPLC 法测定枳椇颗粒中黄酮类成分的含量[J]. 中国医药科学, 2021, 11(1): 79-82
- Gao HN, Pan YR, Yin Y, Mao CQ, Lu TL. Determination of flavonoids content in Zhiqin granules by HPLC method[J]. China Medicine and Pharmacy, 2021, 11(1): 79-82 (in Chinese)
- [21] 夏叶. 蛇葡萄属药用植物 DNA 分子鉴定及化学成分分析[D]. 武汉: 湖北中医药大学硕士学位论文, 2016
- Xia Y. Study of medicinal plants of *Ampelopsis* by DNA molecular identification and chemical composition analysis[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University of Chinese Medicine, 2016 (in Chinese)
- [22] 彭瑶, 曾嵘, 吴尚洁, 雷思, 孙智娜, 何秀琴, 李娟, 李顺祥. 一测多评法测定藏族药烈香杜鹃中 5 种黄酮类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(9): 2229-2236
- Peng Y, Zeng R, Wu SJ, Lei S, Sun ZN, He XQ, Li J, Li SX. Determination of five flavonoids in Tibetan medicine *Rhododendron anthopogonoides* by quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS)[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(9): 2229-2236 (in Chinese)
- [23] 李彩凤, 胡欣, 金鹏飞, 李清, 孙淑汀, 毕开顺, 付宏征. HPLC 法同时测定三叶青块根中 6 个黄酮类成分的含量[J]. 中国药房, 2019, 30(13): 1755-1758
- Li CF, Hu X, Jin PF, Li Q, Sun SD, Bi KS, Fu HZ. Simultaneous determination of 6 flavonoids in the roots of *Tetrastigma hemsleyanum* by HPLC[J]. China Pharmacy, 2019, 30(13): 1755-1758 (in Chinese)
- [24] 宋军妹, 朱云芳, 许伟. 一测多评法测定五味健脑合剂中 7 种成分的含量[J]. 西北药学杂志, 2020, 35(6): 807-813
- Song JM, Zhu YF, Xu W. Determination of 7 components in Wuwei Jiannao mixture by QAMS[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2020, 35(6): 807-813 (in Chinese)
- [25] 杨艳文, 孟凡双, 郜玉钢, 张连学. 高效液相色谱法同时测定人参制剂中 20 种人参皂苷方法的建立[J]. 食品科学, 2016, 37(22): 131-135
- Yang YW, Meng FS, Gao YG, Zhang LX. Simultaneous determination of twenty ginsenosides in ginseng preparations by HPLC[J]. Food Science, 2016, 37(22): 131-135 (in Chinese)
- [26] 巩建业, 吴喆瑜, 李利君, 倪辉. GH78 家族真菌 α -L-鼠李糖苷酶分子系统进化关系分析[J]. 现代食品科技, 2017, 33(10): 13-20
- Gong JY, Wu ZY, Li LJ, Ni H. Analysis of evolutionary relationship of GH78 fungal α -L-rhamnosidase[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(10): 13-20 (in Chinese)
- [27] Koseki T, Mese Y, Nishibori N, Masaki K, Fujii T, Handa T, Yamane Y, Shiono Y, Murayama T, Iefuji H. Characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its gene[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(6): 1007-1013
- [28] Alvarenga AE, Romero CM, Castro GR. 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
- [29] Miake F, Satho T, Takesue H, Yanagida F, Kashige N, Watanabe K. Purification and characterization of intracellular α -L-rhamnosidase from *Pseudomonas paucimobilis* FP2001[J]. Archives of Microbiology, 2000, 173(1): 65-70
- [30] Wu T, Pei JJ, Ge L, Wang ZZ, Ding G, Xiao W, Zhao LG. Characterization of a α -L-rhamnosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* with high catalytic efficiency of epimedin C[J]. Bioorganic Chemistry, 2018, 81: 461-467
- [31] Li LJ, Yu Y, Zhang X, Jiang ZD, Zhu YB, Xiao AF, Ni H, Chen F. Expression and biochemical characterization of recombinant α -L-rhamnosidase r-Rha1 from *Aspergillus niger* JMU-TS528[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 85: 391-399
- [32] Zhang T, Yuan WB, Li ML, Miao M, Mu WM. Purification and characterization of an intracellular α -L-rhamnosidase from a newly isolated strain, *Alternaria alternata* SK37.001[J]. Food Chemistry, 2018, 269: 63-69
- [33] Li BC, Ji YR, Li YQ, Ding GB. Characterization of a glycoside hydrolase family 78 α -L-rhamnosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 and identification of functional residues[J]. 3 Biotech, 2018, 8(2): 1-12