DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250908005
引用格式: 郑雅匀, 夏菠, 黎莹, 等. *α-L*-鼠李糖苷酶RhaB2的异源表达和转化芦丁研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 225–232.
ZHENG YY, XIA B, LI Y, *et al*. Heterologous expression and rutin conversion study of *α-L*-rhamnose glycosidase RhaB2 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 225–232. (in Chinese with English abstract).

α-L-鼠李糖苷酶 RhaB2 的异源表达和转化芦丁研究

郑雅匀, 夏　菠*, 黎　莹, 常云龙, 王靖涵

(湖南农业大学食品科学技术学院, 长沙　410128)

摘　要: 目的　探究 *α-L*-鼠李糖苷酶 RhaB2 诱导表达水平及转化芦丁的条件, 提高对芦丁转化异槲皮素的转化率。**方法**　本研究通过单因素实验探讨了诱导温度、诱导时间和诱导剂浓度对酶表达量的影响, 并研究 pH、温度、时间和加酶量 4 个方面对 RhaB2 转化芦丁条件的影响。**结果**　重组 *α-L*-鼠李糖苷酶 RhaB2 在大肠杆菌 BL21(DE3)中的最适表达条件为: 诱导温度 28 ℃; 诱导时间 20 h; IPTG 浓度 0.1 mmol/L。转化芦丁最适温度为 50 ℃, 最适 pH 为 5.0, 在此条件下反应 2 h, 加酶量与底物的质量比为 2:1 时转化率为 99.96%。**结论**　本研究成功构建了重组 *α-L*-鼠李糖苷酶 RhaB2 的高效异源表达体系。在酶与底物质量比为 2:1、反应 2 h 的工艺条件下, 芦丁转化率可达 99.96%, 实现了异槲皮素的高效定向制备。

关键词: *α-L*-鼠李糖苷酶; 芦丁; 异槲皮素; 异源表达; 蛋白浓度

Heterologous expression and rutin conversion study of *α-L*-rhamnose glycosidase RhaB2

ZHENG Ya-Yun, XIA Bo*, LI Ying, CHANG Yun-Long, WANG Jing-Han

(*College of Food Science and Technology*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*)

ABSTRACT: Objective　To investigate the conditions for inducing expression levels of *α-L*-rhamnose glycosidase RhaB2 and its conversion of rutin, thereby enhancing the conversion rate of rutin to isoquercitrin. **Methods**　Single-factor experiments examined the effects of induction temperature, duration and inducer concentration on enzyme expression levels. The effects of pH, temperature, incubation time and enzyme loading on RhaB2-mediated rutin conversion were also investigated. **Results**　Optimal expression conditions for recombinant *α-L*-rhamnose glycosidase RhaB2 in *Escherichia coli* BL21(DE3) were: Induction temperature 28 °C; induction time 20 hours; IPTG concentration 0.1 mmol/L. The optimal temperature for rutin conversion was 50 °C, with an optimal pH of 5.0. Under these conditions, a 2-hour reaction at a 2:1 enzyme-to-substrate mass ratio achieved

收稿日期: 2025-09-08
基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30299, 2022JJ30290)
第一作者: 郑雅匀(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为生物转化。E-mail: 2917740186@qq.com
***通信作者:** 夏菠(1980—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为生物转化与生物降解。E-mail: julinomber2@sina.com

a conversion rate of 99.96%. **Conclusion** In this study, a highly efficient heterologous expression system for recombinant *α-L*-rhamnosidase RhaB2 is successfully constructed. Under the technological conditions where the mass ratio of the enzyme to the substrate is 2:1 and the reaction time is 2 hours, the conversion rate of rutin can reach 99.96%, thus enabling the highly efficient and targeted preparation of isorhamnetin.

KEY WORDS: *α-L*-rhamnose glycosidase; rutin; isoquercitrin; heterologous expression; protein concentration

0 引 言

异槲皮苷，又称异槲皮素-3-O-葡萄糖苷[1]，具有多种生物活性，包括抗氧化[2]、抗肿瘤[3]、免疫调节[4]以及降血糖、降血脂[5]等，同时在抗抑郁药物开发中显示出应用潜力[6]。然而，该化合物在植物中的天然丰度极低，依靠传统提取方法难以实现大规模生产[7]。研究表明，芦丁与异槲皮苷具有相同的苷元结构，仅在三号位糖基的六号碳上多连接一分子鼠李糖。芦丁在多种植物中含量较高，如槐花米中的积累量可达 28%左右，但其生物利用度和药理活性普遍低于异槲皮苷[8]。因此，以芦丁为底物通过转化反应制备异槲皮苷成为一种可行策略。与化学法相比，生物转化法反应条件温和、环境友好、副产物少，逐渐成为大规模生产异槲皮苷的重要方向[9]。该工艺路线的核心在于获得高活力的 *α-L*-鼠李糖苷酶以专一性切割芦丁分子中的 *α*-1,6-糖苷键。

α-L-鼠李糖苷酶(EC 3.2.1.40)属于糖苷水解酶家族，可特异性水解非还原末端以 *α*-糖苷键连接的 *L*-鼠李糖基[10]。该酶在自然界的细菌和真菌中分布广泛。细菌来源的 *α-L*-鼠李糖苷酶可水解包括芦丁和槲皮苷在内的多种常见膳食黄酮苷。真菌中的该酶最初是从青霉和曲霉生产的粗酶制剂中分离纯化而得。近年来，土曲霉(*Aspergillus terreus*)和构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)也被用于该酶的生产[11−12]。*α-L*-鼠李糖苷酶在食品工业中已有诸多应用实例，例如应用于柑橘类果汁中的柚皮甙脱苦，或将其水解得到 *L*-鼠李糖和橘皮素苷，这两种糖甙都是制备高能甜味剂的关键原料此外，该酶还可水解萜烯糖苷，用于增强葡萄汁及饮料的香气特征[13]。

目前，该酶的生产主要采用液体发酵和固体发酵两种工艺。液体深层发酵易于规模放大和控制，是国际主流生产方式，但成本较高；固体发酵虽操作简单、成本低廉，但易染菌、产物稳定性较差。受限于现有技术条件，*α-L*-鼠李糖苷酶尚未实现大规模量产，导致其纯酶制剂价格居高不下，在很大程度上制约了该酶的推广应用[14]。本研究使用来自植物乳杆菌 NCC245 的 *α-L*-鼠李糖苷酶，通过研究得出该 *α-L*-鼠李糖苷酶可以在大肠杆菌中异源表达，且具有较好转化芦丁效果，有很好的研究前景，并对该酶的转化条件进一步探究优化。该研究成果不仅拓展了微生物来源糖苷酶的功能认知，也为天然产物生物转化及功能性糖苷制备提供了新的酶学工具，在食品、医药等领域的糖基化合物绿色制造中具有重要的理论意义与应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Lactobacillus plantarum NCC245 的 *α-L*-鼠李糖苷酶，GeneBank: ACR19005.1 并用 RhaB2 表示；pGB-RhaB2 质粒合成于深圳市博奥康生物科技有限公司；大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株购自天根生化科技(北京)有限公司。

高纯度质粒小提中量试剂盒、异丙基-*β-D*-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-*D*-thiogalactopyranoside, IPTG)(质量浓度 50 mg/mL，天根生化科技有限公司)；蛋白质分子量标准(10~150 kDa，非预染)、Bradford 蛋白质含量检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)；LB 肉汤(广东环凯微生物科技有限公司)；芦丁(分析纯，上海麦克林生化科技股份有限公司)；异槲皮苷(色谱纯，成都乐美天医药科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

Bio-Photometer 紫外可见分光光度计(上海艾本德国际贸易有限公司)；JY96-IIN 超声破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)；T100TM PCR 扩增仪(美国伯乐公司)；赛默飞 Vanquish Core 高效液相色谱仪[赛默飞世尔(中国)有限公司]；HyPURITY C_{18} 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、DYY-600C 电泳仪(北京东方瑞利电泳设备有限公司)；ZQPW 70 恒温振荡培养箱(天津莱玻特瑞仪器设备有限公司)；HR-T16M 台式高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司)；SW-CJ-1FD 超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 *α-L*-鼠李糖苷酶重组质粒的转化与诱导表达

采用热激法将携带 *α-L*-鼠李糖苷酶 *RhaB2* 基因的重组质粒导入表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3)中，之后将转化体系涂布于添加 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体平板培养基上进行筛选。对所得阳性克隆，委托上海生工生物工程科技有限公司实施 DNA 测序，以验证序列正确性。通过 Blastn 比对，筛选出与 RhaB2 基因序列完全一致(100%匹配)的菌株用于后续实验。将该验证正确的菌株按 3% (*V*/*V*)接种量接种至含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基

(20 mL)中, 于 37 ℃、振长至荡条件下培养。待菌液生对数中期(OD600 值介于 0.6~0.8)时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 于 28 ℃诱导表达 20 h[15]。

1.3.2　RhaB2 粗酶液的获取与蛋白纯化

取 10 mL 诱导后的细菌培养物, 于 4 ℃、6000 r/min 条件下离心 10 min, 弃去上清, 收集菌体沉淀。向沉淀中加入等体积的细菌蛋白提取裂解缓冲液(1×磷酸盐缓冲液, pH 7.4), 使用移液器反复吹打以充分重悬菌体。随后将菌悬液置于冰水浴中, 进行超声破碎处理, 参数设置为: 功率 250 W, 工作时间 2 s, 间歇时间 6 s, 总时长 20 min, 过程中控制温度不超过 28 ℃。将破碎后的裂解液于 4 ℃、10000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 即得 RhaB2 粗酶液, 该样品可用于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析及后续纯化实验[16]。

利用 BeyoGold-His 标签蛋白纯化试剂盒对目标蛋白进行纯化。具体步骤为: 取 4 mL RhaB2 粗酶液, 加入已平衡的 50% BeyoGold-His 标签纯化树脂, 轻柔混匀后置于冰浴环境中, 于脱色摇床中以轻柔振荡方式孵育 60 min, 使带 His 标签的重组蛋白有效吸附于镍填料。随后将混合液移入空的亲和层析柱, 收集穿流液(flow through)。继而采用 0.5 mL 非变性洗涤缓冲液清洗层析柱 4 次, 并分别收取洗涤流出液(标记为 W1~W4)。最后使用非变性洗脱缓冲液进行 5 轮洗脱, 分别收集各轮洗脱组分(标记为 E1~E5)。为评估纯化效果, 对所有收集样品进行了 SDS-PAGE 电泳分析[17]。

1.3.3　RhaB2 对芦丁的转化效果

将 RhaB2 与 10 mmol/mL 芦丁在 pH 5.0 和 60 ℃的柠檬酸钠缓冲溶液中孵育 1 h, 加入过量甲醇终止反应, 取 1 mL 混合液, 聚醚砜针式过滤器过滤, 4 ℃下避光保存, 每个反应设置 3 个平行。采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测产物含量, 色谱柱为 HyPURITY C_{18} 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流速为 0.80 mL/min, 进样量为 10.00 μL, 柱温为 40 ℃, 检测波长为 368 nm, 等度洗脱, 流动相为千分之一甲酸水(0.1%):甲醇=6:4 (*V*/*V*) [18]。以不同质量浓度芦丁及相对应的色谱峰面积绘制标准曲线, 为 Y=121.9X–41.58, 决定系数 r^2=0.9992。对芦丁转化率的计算见公式(1)。

$$转化率/\%=\frac{(C_0-C_t)}{C_0}\times 100\% \quad (1)$$

式中: C_0 为芦丁的初始浓度, mmol/mL; C_t 为 t 时刻芦丁的浓度, mmol/mL。

1.3.4　RhaB2 诱导表达条件优化

分别研究了诱导时间、诱导温度和 IPTG 诱导剂对 RhaB2 表达的影响。在含有 20 mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 在不同的温度和时间条件下以及不同的 IPTG 浓度下进行了诱导。最后, 通过 SDS-PAGE 电泳筛选出表达水平最高的条件[19]。

(1)诱导温度

将含有 RhaB2 的重组大肠杆菌接种于 20 mL 添加氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 分别在 16、28、37 和 45 ℃条件下, 以 0.1 mmol/L 终浓度 IPTG 诱导表达 20 h, 摇床转速设置为 100 r/min。诱导结束后, 取样 10 μL 菌液, 通过 SDS-PAGE 电泳对其表达产物进行分析。采用 Bradford 法(考马斯亮蓝染色法)对酶蛋白浓度进行定量测定。

(2)诱导时间

将重组表达 RhaB2 的大肠杆菌接种于 20 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 在 28 ℃、100 r/min 的条件下, 分别以 0.1 mmol/L 终浓度的 IPTG 诱导 4、8、12、16、20 及 24 h。各时间点收取 10 μL 菌液样本, 通过 SDS-PAGE 电泳分析目标蛋白表达情况, 并采用 Bradford 法(考马斯亮蓝染色法)对酶蛋白浓度进行定量测定。

(3) IPTG 浓度

将表达 RhaB2 的重组大肠杆菌接种于含氨苄青霉素的 20 mL LB 液体培养基中, 分别添加终浓度为 0.01、0.05、0.10、0.20、0.60 和 1.00 mmol/L 的 IPTG, 在 28 ℃、100 r/min 条件下诱导培养 20 h。每组取 10 μL 菌液样本, 通过 SDS-PAGE 电泳进行蛋白表达分析, 并采用 Bradford 法(考马斯亮蓝染色法)测定酶蛋白浓度。

1.3.5　不同条件对 RhaB2 转化芦丁的影响

(1)最适转化温度

构建 400 μL 的反应体系, 取 80 μL 10 mmoL/mL 芦丁, 加酶量 20 μL, 300 μL pH 5.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液。分别在 10~70 ℃(不同温度间隔 10 ℃)的水浴锅中反应 20 min 后, 加入 1 mL 甲醇终止反应, 使用 0.22 μm 滤膜过滤, HPLC 检测并计算其转化率, 确定最适转化温度。

(2)最适转化 pH

构建 400 μL 的反应体系, 取 80 μL 10 mmoL/mL 芦丁, 加酶量 20 μL, 分别加入 300 μL 0.1 mol/L pH 为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 50 ℃反应 20 min 后, 加入 1 mL 甲醇终止反应, 使用 0.22 μm 滤膜过滤, HPLC 检测并计算其转化率, 确定最适转化 pH。

(3)底物浓度与转化时间的关系

在最适转化温度、pH 和加酶量的条件下, 分别于 0、20、40、60、80、120、150、180 min 时取样, 加入 1 mL 甲醇终止反应, 样品于 4 ℃、6000 r/min 条件下离心 1 min 后, 由 0.22 μm 滤膜过滤后, HPLC 检测, 探究底物浓度与转化时间的关系。

(4)最适加酶量

在最适转化温度和 pH 下, 加入酶比底物质量比分别为 0.25:1、1:1、2:1, 反应 2 h 加入 1 mL 甲醇终止反应, 样

品于 4 ℃、6000 r/min 条件下离心 1 min 后，由 0.22 μm 滤膜过滤，后 HPLC 检测，确定最适加酶量。

1.4 数据处理

所有实验均设至少 3 次独立重复，以确保数据的可靠性。数据分析采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件完成，实验结果以均值±标准偏差表示，重复次数 n=3。组间比较采用单因素方差分析，若存在显著性差异，则进一步运用新复极差法进行多重比较[20]。

2 结果与分析

2.1 RhaB2 生物信息学特征和结构分析

通过 Expasy ProtParam 网站(https://web.expasy.org/protparam/)分析，RhaB2 酶是由 1575 bp 组成的开放阅读框，翻译成含有 525 个氨基酸的前体蛋白，其理论分子质量为 57.8 kDa；带负电荷的残基数为 66，带正电荷的残基数为 47；理论计算的等电点为 4.91；当最适 pH 位于或接近其等电点时，活性中心的静电环境最适于底物的结合与过渡态的形成，有利于酶促反应的进行[21]。如图 1，为 RhaB2 的三级结构图和静电势能图，使用 SignalP 5.0 网站预测信号肽的结果表明，RhaB2 不具有信号肽。因此可以直接用于克隆表达，无需进行信号肽切除[22]。

如图 2, RhaB2 存在一个明显的底物结合口袋，这与其高效的催化活性相符。此外，酶分子表面静电势能分布不均，活性中心附近呈现负电性特征，这与该酶在酸性条件(pH 5.0)下表现出最高活性的实验结果相一致，因为在酸性环境中该区域的电荷状态更利于底物的结合与催化[23]。

2.2 RhaB2 酶的诱导表达及分离纯化

如图 3 所示, SDS-PAGE 分析显示在约 65 kDa 处出现一条明显条带(L3)，与 RhaB2 的理论分子量(57.8 kDa)存在一定差距，略高于理论值可能由于翻译后修饰或电泳迁移偏差所致，这种表观分子量大于理论值的现象在重组蛋白表达中较为常见，可能的主要原因包括：(1)重组蛋白 N 端或 C 端融合的标签(如本研究使用的 His 标签)增加了额外的分子量；(2)蛋白质自身的特殊氨基酸组成：RhaB2 的酸性残基显著多于碱性残基，导致其在 SDS-PAGE 中与 SDS 的结合效率相对较低，迁移速率慢于同等大小的标准蛋白，从而表现出更高的表观分子量，这一现象在富含酸性氨基酸的蛋白中已被广泛报道[24]。沉淀组(L1)无此条带，诱导后菌液(L2)和粗酶液(L3)中均可见该条带，表明 RhaB2 成功在大肠杆菌 BL21(DE3)中实现诱导表达并且有相当一部分重组蛋白存在于可溶组分中；后续实验证实该粗酶液具备催化芦丁转化的活性，从而为后续的纯化与功能研究提供了基础。

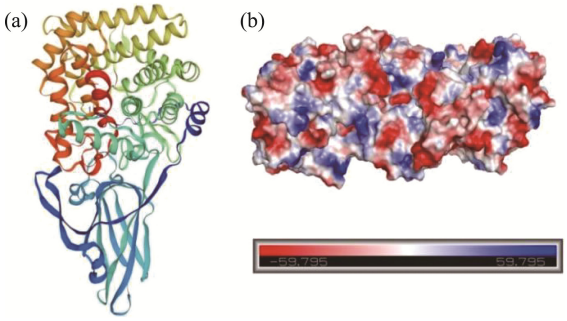


图 1 RhaB2 的三级结构图(a)和 RhaB2 的静电势能图(b)

Fig.1 Tertiary structure of RhaB2 (a) and electrostatic potential energy of RhaB2 (b)

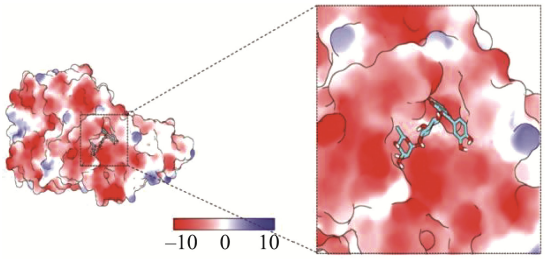
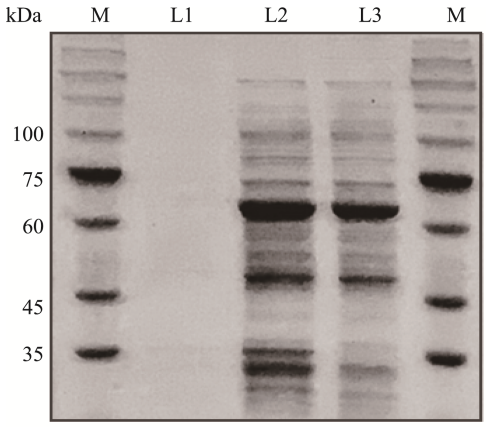


图 2 RhaB2 与芦丁分子对接

Fig.2 Molecular docking of RhaB2 with rutin



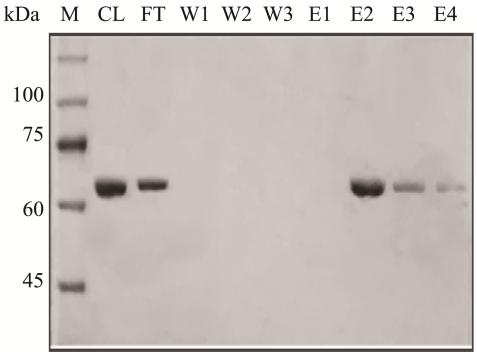
注: M. Maker; L1. 破碎后沉淀; L2. 诱导后菌液; L3. 粗酶液。

图 3 RhaB2 可溶性表达

Fig.3 Soluble expression of RhaB2

为获得高纯度的 His 标签重组 RhaB2 酶，本研究采用金属离子亲和层析(metal affinity chromatography, MAC)方法进行纯化。通过 SDS-PAGE 对洗脱组分及合并洗脱样品进行分析，以评估 His 标签重组蛋白的纯化程度。根据电泳图谱，选择含有目标蛋白的洗脱组分进行合并与保存。如图 4，通过镍柱亲和层析纯化后，洗脱组分 E2 中可见一条清晰且纯度较高的条带，表明 His 标签融合蛋白成功被特异性洗脱。洗涤组分 W1~W3 中几乎无目标条带，说明非特异性结合较少，纯化效率较高。FT 中仍有少量目标蛋白，提示部分蛋白未与镍柱结合，可能由于表达量过高或

结合条件未完全优化。总体而言，纯化策略有效，可获得较高纯度的 RhaB2 酶用于后续实验。



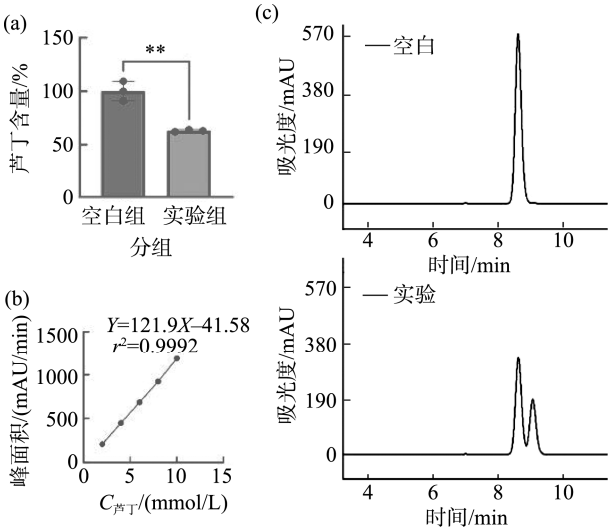
注: M. Maker; CL. 细菌裂解液(cell lysate); FT. 上样穿流液(flow through); W1~W3. 洗涤液 1~3; E1~E4. 洗脱液 1~4。

图 4　His 标签纯化后的 RhaB2 的 SDS-PAGE 图

Fig.4　SDS-PAGE plots of RhaB2 after His-tag purification

2.3　RhaB2 对芦丁的转化效果

图 5 显示，RhaB2 在 1 h 内对芦丁的转化率达到(37.0±0.1)%，表明该酶具备显著的催化活性。芦丁标准曲线线性良好(r^2=0.9992)，说明 HPLC 检测方法可靠。统计显著性(P<0.01)表明转化效果具有重复性和可靠性，为后续条件优化提供了基础。



注: a. RhaB2 对芦丁的降解率; b. 芦丁标准曲线; c. RhaB2 转化芦丁实验高效液相色谱图; **代表 P<0.01。

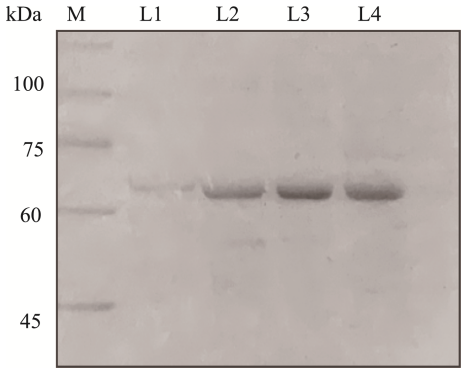
图 5　RhaB2 对芦丁的转化率

Fig.5　Conversion rate of RhaB2 to rutin

2.4　RhaB2 诱导表达优化

2.4.1　诱导温度对 RhaB2 表达量的影响

如图 6 所示，重组蛋白在大肠杆菌中的表达水平依赖于诱导温度，较低温度有助于防止包涵体形成，并降低质粒丢失的可能性[25]。SDS-PAGE 分析结果显示(图 6)，在 28 ℃诱导条件下，RhaB2 目标条带的强度最高，表明其表达量最大；与此同时，该条件下测得的总可溶性蛋白浓度也达到峰值(图 7)。这综合表明 28 ℃最有利于重组 RhaB2 的高水平可溶性表达。基于上述结果，本研究最终选择 28 ℃作为诱导温度用于后续实验。



注: M. Maker; L1. 45 ℃; L2. 37 ℃; L3. 28 ℃; L4. 16 ℃。

图 6　诱导温度对酶表达量的影响

Fig.6　Effects of different induction temperatures on enzyme expression quantity

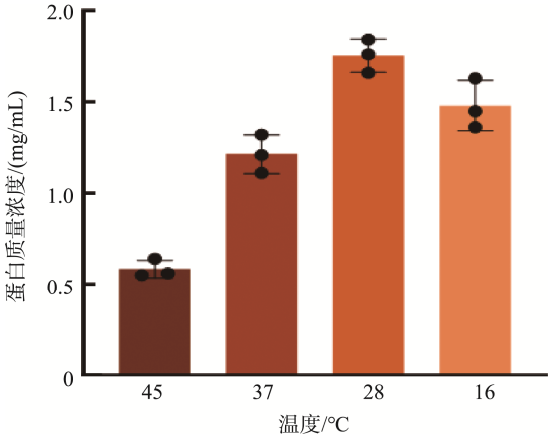


图 7　诱导温度对酶蛋白浓度的影响

Fig.7　Effects of induction temperatures on enzyme protein concentration

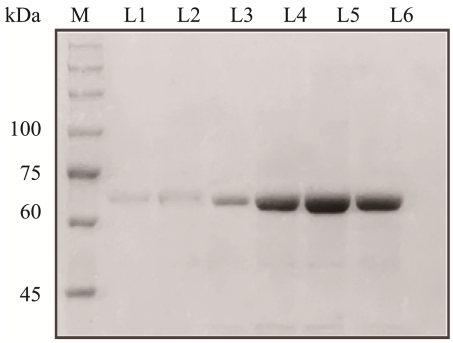
2.4.2　诱导时间对 RhaB2 表达量的影响

如图 8 所示，诱导时间对重组蛋白的高效表达具有重要影响[26]。结果显示，重组蛋白表达水平随诱导时间延长而逐渐升高，并在 20 h 达到最大值；进一步延长诱导时间并未引起表达量的明显增加。对应条件下的可溶性蛋白浓度也在 20 h 达到最大(图 9)，因此本研究最终选择 20 h 作为最佳诱导时间用做后续实验。

2.4.3　IPTG 浓度对 RhaB2 表达量的影响

诱导剂浓度的优化是异源蛋白表达过程中的关键参数。已有研究证实，当 IPTG 浓度处于 0~1 mmol/L 范围内时，对大肠杆菌的生长不产生显著毒性效应[27–29]。如图 10 所示，SDS-PAGE 图无法明显分辨蛋白表达量因此以蛋白

浓度作为选取条件。在 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 条件下，重组蛋白的表达量高于其他实验组；相应的可溶性蛋白浓度(图 11)也显著优较高于其他组别。因此，最终确定 IPTG 诱导浓度为 0.1 mmol/L，并应用于后续实验。



注: M. Maker; L1. 4 h; L2. 8 h; L3. 12 h; L4. 16 h; L5. 20 h; L6. 24 h。

图 8 诱导时间对酶表达量的影响

Fig.8 Effects of different induction times on enzyme expression quantity

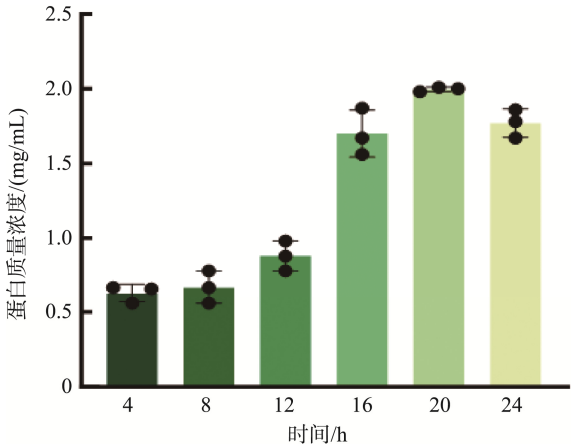
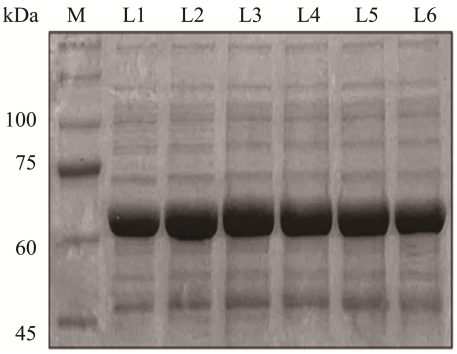


图 9 诱导时间对酶蛋白浓度的影响

Fig.9 Effects of induction times on enzyme protein concentration



注: M. Maker; L1. 0.01 mmol/L; L2. 0.05 mmol/L; L3. 0.10 mmol/L; L4. 0.20 mmol/L; L5. 0.60 mmol/L; L6. 1.00 mmol/L。

图 10 IPTG 浓度对酶表达量的影响

Fig.10 Effects of different IPTG concentration on enzyme expression quantity

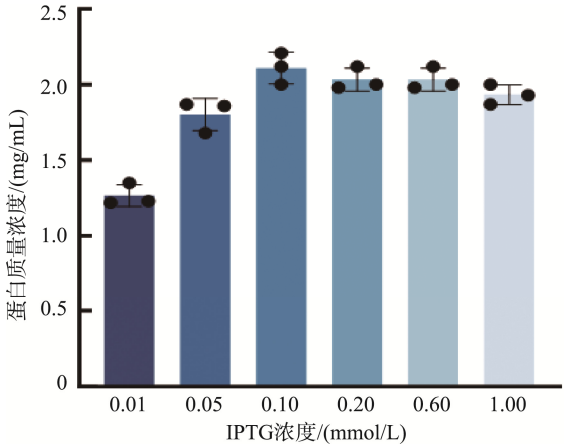


图 11 IPTG 浓度对酶蛋白浓度的影响

Fig.11 Effects of different IPTG concentration on enzyme protein concentration

2.5 不同条件对 RhaB2 转化芦丁的影响

图 12 显示温度和 pH 对 RhaB2 转化芦丁的影响。如图 12(a)所示，在 10 至 50 ℃范围内，芦丁转化率随温度升高而显著递增，并于 50 ℃时达到峰值，表明此温度为该酶的最适反应温度。当温度超过 50 ℃后，转化率呈明显下降趋势，这很可能源于高温对酶蛋白结构的不可逆破坏，导致其催化活性衰减。如图 12(b)所示，RhaB2 在 pH 4.0~5.0 范围内保持较高活性，并在 pH 5.0 时呈现最高转化效率；当 pH 升至中性及碱性范围(pH 7.0~8.0)时，酶活性急剧丧失。这一典型的酸性最适 pH 特征，与前述其理论等电点(pI 4.91)及活性中心静电势分析相吻合，共同印证了 RhaB2 为一种酸性糖苷水解酶[30−32]。在明确最适温度与 pH 的基础上，进一步考察反应时间与加酶量对转化过程的影响(图 13)。如图 13(a)所示，在最适条件下，芦丁转化率随反应时间延长而增加。反应初始阶段(0~60 min)转化率增长最为迅猛，体现出酶的高效催化特性；随后增速渐缓，至 180 min 时转化率达到 87%。为追求更高转化率，本研究继而优化了加酶量。结果(图 13b)明确显示，当酶与底物质量比从 0.25:1 提升至 2:1 时，最终转化率实现了大幅度跃升。在 2:1 的酶量下反应 2 h，转化率高达 99.96%

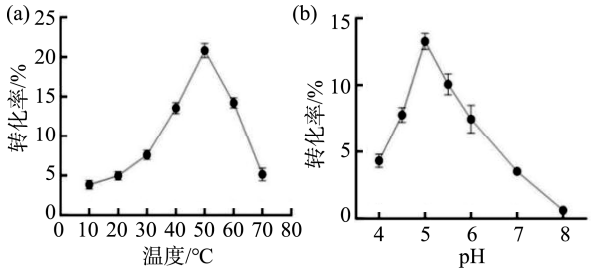


图 12 最适温度(a)和最适 pH(b)

Fig.12 Optimal temperature (a) and optimal pH (b)

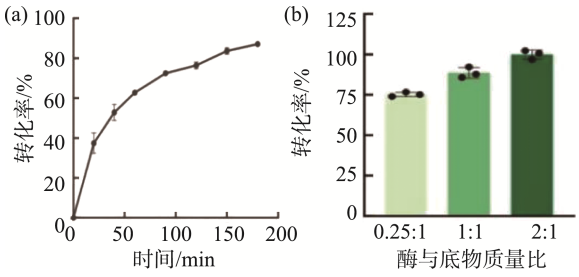


图 13　反应时间(a)和不同酶量(b)

Fig.13　Reaction time (a) and different enzyme quantities (b)

3　结 论

本研究成功构建了重组 *α-L*-鼠李糖苷酶 RhaB2 的表达体系, 并初步验证了该酶在芦丁转化方面的功能性, 系统优化了其诱导表达与芦丁转化的关键条件, 证实该酶在 50 ℃、pH 5.0 条件下具有优良的催化活性与操作稳定性。在酶与底物质量比为 2:1、反应 2 h 的工艺条件下, 芦丁转化率可达到 99.96%。上述结果为进一步将生物转化策略应用于异槲皮素的合成提供了理论依据。尽管已取得阶段性成果, 该酶的工业化应用潜力仍待通过更多研究予以评估和完善, 包括催化反应机理的系统解析。此类系统性的研究工作, 有望为 *α-L*-鼠李糖苷酶在工业化环境中的广泛应用提供坚实的理论依据与必要的技术支撑。

参考文献

[1] WANG DQ, ZHENG P, CHEN PC, *et al*. Immobilization of alpha-*L*-rhamnosidase on a magnetic metal-organic framework to effectively improve its reusability in the hydrolysis of rutin [J]. Bioresource Technology, 2021, 323: 124611.

[2] ARTI N, ENKHTAIVAN G, GYUN-SEOK P, *et al*. Novel insights on the multi-functional properties of flavonol glucosides from red onion (*Allium cepa* L.) solid waste: *In vitro* and *in silico* approach [J]. Food Chemistry, 2020, 335: 1–8.

[3] LI BC, LI X, PENG B, *et al*. Improving rutin biotransformation efficiency of *α-L*-rhamnosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 via targeted mutagenesis focused on general acid motif [J]. Catalysts, 2024, 14(8): 501.

[4] SHI YW, CHEN XY, LIU JX, *et al*. Isoquercetin improves inflammatory response in rats following ischemic stroke [J]. Frontiers in Neuroscience, 2021, 15: 1–14.

[5] GE L, LIU YY, ZHOU FM, *et al*. Heterologous expression and characterization of a thermostable *α-L*-rhamnosidase from *Thermoclostridium stercorarium* subsp. thermolacticum DSM 2910 and its application in the biotransformation of rutin [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023, 33(11): 1521–1530.

[6] FATMA TGD, MERT I, ESRA KA, *et al*. Identification of the main active antidepressant constituents in a traditional Turkish medicinal plant, *Centaurea kurdica* Reichardt [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 25(6): 1–11.

[7] LU CN, DONG YR, KE KX, *et al*. Modification to increase the thermostability and catalytic efficiency of *α-L*-rhamnosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* and high-level expression [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 158: 110040.

[8] XIE X, GUO ZW, CHEN BH, *et al*. Surface display and characterization of recombinant *α-L*-rhamnosidase from *Emiliania huxleyi* on *Pichia pastoris* [J]. Bioorganic Chemistry, 2025, 155: 108121.

[9] ZHANG SS, LU CN, CAO SP, *et al*. Efficient production of icariin and baohuoside I from Epimedium Folium flavonoids by fungal *α-L*-rhamnosidase hydrolysing regioselectively the terminal rhamnose of epimedin C [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 107.

[10] BAN YL, YANG HW, JIANG JX, *et al*. A *α-L*-rhamnosidase from *Echinacea purpurea* endophyte *Simplicillium sinense* EFF1 and its application in production of calceorioside B [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 270(Part1): 132090.

[11] 房仙颖, 章祎唯, 萧伟, 等. 异槲皮素的制备及研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(4): 708–717.
FANG XY, ZHANG YW, XIAO W, *et al*. Preparation and research progress of isoquercitrin [J]. Research and Development of Natural Products, 2020, 32(4): 708–717.

[12] LI LJ, LIAO H, YANG Y, *et al*. Improving the thermostability by introduction of arginines on the surface of *α-L*-rhamnosidase (r-Rha1) from *Aspergillus niger* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 14–21.

[13] LI LJ, WU ZY, YU Y, *et al*. Development and characterization of an *α-L*-rhamnosidase mutant with improved thermostability and a higher efficiency for debittering orange juice [J]. Food Chemistry, 2018, 45: 1070–1078.

[14] ZHANG R, ZHANG BL, LI GC, *et al*. Enhancement of ginsenoside Rg (1) in *Panax ginseng* hairy root by overexpressing the *α-L*-rhamnosidase gene from *Bifidobacterium breve* [J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(10): 2091–2096.

[15] PIROVICH DB, DA'DARA AA, SKELLY PJ. Multifunctional fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a therapeutic target [J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021, 8: 19.

[16] WU T, PEI JJ, GE L, *et al*. Characterization of a *α-L*-rhamnosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* with high catalytic efficiency of epimedin C [J]. Bioorganic Chemistry, 2018, 81: 461–467.

[17] 田红, 庞立, 杨文韬, 等. 分散泛菌 DJL-B 醇脱氢酶的重组表达与固定化研究[J]. 食品工业科技, 2025, 46(9): 176–184.
TIAN H, PANG L, YANG WT, *et al*. Recombinant expression and immobilization of *Pantoea dispersa* DJL-B alcohol dehydrogenase [J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(9): 176–184.

[18] 杨文韬, 庞立, 田红, 等. 分散泛菌胞内脱乙酰酶在大肠杆菌中重组表达条件优化及酶学特性[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(22): 190–199.
YANG WT, PANG L, TIAN H, *et al*. Optimization of expression conditions and enzymatic properties of intracellular deacetylase from *Pantoea dispersa* in *Escherichia coli* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(22): 190–199.

[19] 卢姗, 张珊珊, 邹康, 等. 极耐热 *α-L*-鼠李糖苷酶的性质及其在异槲皮

素制备中的应用研究[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(1): 102–111.
LU S, ZHANG SS, ZOU K, *et al*. Properties of an extremely heat-resistant *α-L*-rhamnose glycosidase and its application in the preparation of isoquercitrin [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(1): 102–111.

[20] 王婧涵, 庞立, 田红, 等. 可降解磺胺嘧啶的重组细菌漆酶诱导表达和酶学性质研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(6): 232–238.
WANG JH, PANG L, TIAN H, *et al*. Recombinant bacterial lacquerase induced expression and enzymatic properties of biodegradable sulfamethoxazole [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(6): 232–238.

[21] LIU Y, YANG Q. Functional and structural insights into a novel acidic chitinase with an extended pH activity profile [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 148: 109812.

[22] 智勇, 夏菠. 猕猴桃根部源分散泛菌葡萄糖异构酶异源表达研究[J]. 中国果菜, 2025, 45(4): 35–40.
ZHI Y, XIA B. Heterologous expression of grape glucose isomerase from the root meristem of *Actinidia chinensis* [J]. Chinese Journal of Fruit and Vegetable Science, 2025, 45(4): 35–40.

[23] TAUBER H, LYSENKO O, WEISHAUPT R, *et al*. The acidic optimum pH of the *α*-galactosidase from *Saccharomyces cerevisiae* is determined by electrostatic compensation in the active center [J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2023, 1871: 140914.

[24] 李汉芳, 黄珍, 路梦凡, 等. 乳及乳制品中乳铁蛋白含量的快速 SDS-PAGE 荧光检测方法[J]. 现代食品科技, 2024, 40(4): 296–302.
LI HF, HUANG Z, LU MF, *et al*. Rapid SDS-PAGE fluorescence detection method for lactoferrin content in milk and dairy products [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(4): 296–302.

[25] 姜红岩, 刘凌云, 檀鹏辉, 等. 日本结缕草 ZjNAC3 基因的克隆与功能分析[J]. 中国草地学报, 2021, 43(9): 14–22.
JIANG HY, LIU LY, TAN PH, *et al*. Cloning and functional analysis of the ZjNAC3 gene in Japanese St. Augustine grass [J]. Chinese Journal of Grassland Science, 2021, 43(9): 14–22.

[26] VIVEKANAND V, DWIVEDI P, SHARMA A, *et al*. Enhanced delignification of mixed wood pulp by *Aspergillus fu migatus* laccase mediator system [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24: 2799–2804.

[27] SELINHEIMO E, KRUUS K, BUCHERT J, *et al*. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheologi cal properties of wheat doughs [J]. Journal of Cereal Science, 2006, 56(14): 5732–5742.

[28] CANFORA L, IAMARINO G, RAO MA, *et al*. Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *Trametes versicolor* laccase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(4): 1398–1407.

[29] FAN F, ZHUO R, SUN S, *et al*. Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 w hich had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes [J]. Bioresource Technology, 2010, 102(3): 3126–3137.

[30] HAYAT SMG, FARAHANI N, GOLICHENARI B, *et al*. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What we need to know [J]. Current Pharmaceutical Design, 2018, 24(6): 718–725.

[31] 陈东启, 余勃, 陆豫. RACE 法克隆黑曲霉 NCU-317 中 *α-L*-鼠李糖苷酶基因与生物信息学分析[J]. 南昌大学学报(理科版), 2019, 43(5): 489–496.
CHEN DQ, YU B, LU Y. RACE cloning and bioinformatics analysis of *α-L*-rhamnosidase from *Aspergillus niger* NCU-317 [J]. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2019, 43(5): 489–496.

[32] 蔡雨晨, 曹博瀚, 巩建业, 等. 真核 *α-L*-鼠李糖苷酶的碳水化合物结合结构域功能架构分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(1): 156–162, 168.
CAI YC, CAO BH, GONG JY, *et al*. Functional and structural analysis of carbohydrate-binding module of eukaryotic *α-L*-rhamnosidase [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(1): 156–162, 168.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)