

## 淫羊藿苷糖苷酶的纯化及其酶学性质的研究\*

杨宇, 韩冰, 金凤燮, 鱼红闪

(大连工业大学 生物与食品工程学院, 辽宁 大连, 116034)

**摘要** 对由菌株 *Absidia* sp. E9r 在发酵培养中产生的淫羊藿苷糖苷酶进行了分离纯化并对其酶性质进行了研究。结果表明, 该酶的分子质量约为 65 ku, 酶反应的最适温度和 pH 值分别为 50℃ 和 4.0, 在 20~60℃, pH3.0~6.0 条件下稳定性较好; 金属离子  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  对酶反应的影响不大, 而  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  对其有很明显的抑制作用; 酶反应动力学研究,  $V_{\max}=3.012 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ,  $k_m=58.59 \text{ mmol/L}$ 。

**关键词** 淫羊藿苷, 淫羊藿苷糖苷酶, 酶学性质

淫羊藿(*Epimedium grandiflorum* Morr.), 别名仙灵脾, 是小檗科植物的地上部分。《神农本草经》称其具有补肝肾, 强筋骨之功效。近代研究表明, 淫羊藿除具有强筋骨, 益精气, 补腰膝, 强心力的药效外还能够提高人体免疫力、促进骨细胞分化、抗肿瘤、抗衰老等<sup>[1~4]</sup>。

淫羊藿的天然成分为淫羊藿黄酮苷。它是由黄酮苷元与糖基形成, 这种结构很大程度上影响了苷元的生物活性。人体摄入后需经体内微生物将其转化为低糖基苷或苷元才能吸收<sup>[5]</sup>。因此, 如何将多糖基的淫羊藿苷转化为低糖基苷或苷元成为一个新的课题。已报道, Liggins 及 Bluck 等利用纤维素酶将淫羊藿苷水解制备出淫羊藿素<sup>[6]</sup>。国内匡莹及姜晓野等分别利用曲霉和细菌将多糖基淫羊藿苷水解成低糖基淫羊藿苷<sup>[7,8]</sup>。本研究自主筛选出 1 株 *Absidia* sp. E9r 菌株, 该菌种通过液态发酵可得到一种能够水解淫羊藿苷定向生成淫羊藿苷 I 的糖苷酶, 笔者对这种糖苷酶进行了分离纯化, 并对该酶的性质进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

菌种 *Absidia* sp. E9r, 由大连工业大学生物与食品工程学院菌种保藏室提供; 薄层层析板 Silica, 德国 Merck 公司; 淫羊藿苷, 大连绿峰天然生物制品有限公司; 其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 培养基的配制

第一作者: 硕士研究生(鱼红闪教授为通讯作者)。

\* 国家自然科学基金项目(20476017), 辽宁省高等学校优秀人员支持计划项目(RC204205), 辽宁省科学技术基金项目(20042132)

收稿日期: 2008-09-26, 改回日期: 2008-11-03

称取淫羊藿粉 100g 倒入烧杯中, 加入 600 mL 水, 温火加热, 熬煮 7h(熬煮过程中注意补水)。然后用纱布过滤, 滤液于 8 000 r/min 下离心 10 min。取上清液, 为淫羊藿浸出液, 补水至 300 mL 备用。

取 20 mL 的淫羊藿浸出液与 6 °Brix 的麦芽汁 80 mL 混匀, 制成淫羊藿苷糖苷酶液态发酵培养基, 待用。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 淫羊藿苷糖苷酶产酶菌株的发酵及粗酶液的制备

无菌条件下, 用接种针分别于液态发酵培养基中接菌 2~3 环, 并置 32℃ 恒温培养箱中培养 4~5 d。

将发酵培养好的发酵液, 在 8 000 r/min 下离心 15 min, 取上清液在磁力搅拌条件下加入适量硫酸铵粉末调饱和度至 75%, 放入 4℃ 冰箱静置 12h 后在 13 000 r/min 下离心 20 min。弃上清液, 将沉淀用 20 mmol/L pH5.0 醋酸-醋酸钠缓冲液溶解, 倒入透析袋中, 在缓冲液中透析 24 h。透析结束后, 取出液体在 13 000 r/min 下冷冻离心 10 min, 上清液即为粗酶液放入冰箱内保存备用。

#### 1.2.2 酶液的提纯

取粗酶液 8 mL, 通过 DEAE-Cellulose DE-52 阴离子交换柱( $\varphi 2.0 \text{ cm} \times 11.5 \text{ cm}$ )进行分离纯化<sup>[9]</sup>。先用 50 mL 20 mmol/L pH5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液洗脱, 然后依次用 60、120、180、240、300、400、500 mmol/L 的 KCl 溶液(以 20 mmol/L pH 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液为溶剂配制)各 50 mL 进行梯度洗脱。利用自动分步收集器收集洗脱液, 每 3 min 收集 1 管, 每管收集 3 mL, 紫外分光光度计 280 nm 下测定各管的紫外吸光值(OD), 确定其蛋白含量。

#### 1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定酶蛋白的

## 分子质量

样品经处理后,采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法<sup>[10]</sup>测定酶的纯度与分子质量。所选用标准蛋白为:磷酸酶 b(97.2 ku)、牛血清蛋白(66.4 ku)、卵清蛋白(44.3 ku)、碳酸酐酶(29.0 ku)、胰蛋白酶抑制剂(20.1 ku)、溶菌酶(14.3 ku)

### 1.2.4 酶活力的测定

用 20 mmol/L pH5.0 醋酸-醋酸钠缓冲液溶解淫羊藿苷,制成 20 mg/mL 标准品溶液作为酶反应作用的底物。取 0.1 mL 淫羊藿苷溶液与 0.1 mL 酶液,于 50℃下反应 20 h,加入 0.2 mL 水饱和正丁醇终止反应,振荡,离心,取上层液作薄层层析检测,点样量为 10 μL,展开剂展开,展开剂的配比为 V(乙酸乙酯):V(丁酮):V(甲醇):V(水)=10:1:1:1,紫外显色。应用 Band-scan 工具软件,进行产物含量分析。每小时转化 1 nmol 淫羊藿苷底物所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 淫羊藿苷糖苷酶的分离及纯化

粗酶液依方法 1.2.3 经 DEAE-Cellulose DE-52 分离纯化,洗脱曲线如图 1 所示。

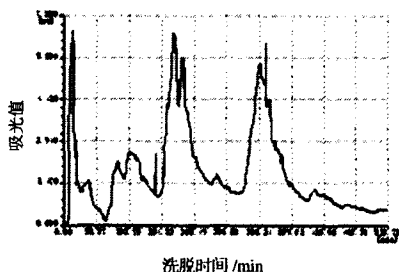


图 1 淫羊藿苷糖苷酶洗脱曲线图

由图 1 可以看出,粗酶液中蛋白种类较杂,组分较多。整理收集各个组分每隔 2 管采用 TLC 法检测酶活力发现,39~66 管具有酶活力,且酶活力呈由弱到强,再由强转弱态势分布。在 52~57 管附近酶活力达到最强。因此,在此范围内依次取每管做酶活力测定,TLC 检测结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出,第 53~58 管对淫羊藿苷都有较明显的酶解作用。根据提纯酶的活力情况,选取以上几管的提纯酶液进行酶的纯度检测及分子量测定的试验。

### 2.2 淫羊藿苷糖苷酶分子质量的测定

53~58 号管样品经处理后,用 SDS-聚丙烯酰胺

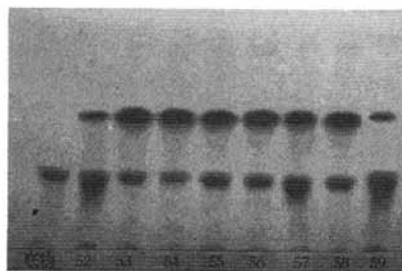


图 2 提纯酶的酶活力测定

图 2 中从左至右为底物淫羊藿苷,52 号,53 号,54 号,55 号,56 号,57 号,58 号,59 号

凝胶电泳法来对其进行纯度及分子质量检测,结果如图 3 所示。

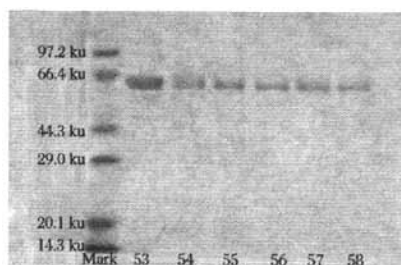


图 3 淫羊藿苷糖苷酶的提纯酶 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

图 2 中从左至右为 Mark;磷酸酶 b(97.2 ku)、牛血清蛋白(66.4 ku)、卵清蛋白(44.3 ku)、碳酸酐酶(29.0 ku)、胰蛋白酶抑制剂(20.1 ku)、溶菌酶(14.3 ku);53、54、55、56、57、58 为提纯所得的淫羊藿苷糖苷酶的电泳条带

综合分析图 2 和图 3 可知,53 号管中虽然有较高的酶活力,但是由图 3 可以看出含有少量杂蛋白不是纯酶液。而 54~58 号管则是明显的单带且酶活较高,达到了分离纯化的目的,认定为淫羊藿苷糖苷酶纯酶。以图 3 上标准蛋白为依据,绘制出蛋白质分子质量标准曲线如图 4,得回归方程为:  $\text{Log}Y = 5.15373 - 0.97692X$ ,计算出淫羊藿苷糖苷酶的分子质量为 65。

### 2.3 淫羊藿苷糖苷酶性质的研究

#### 2.3.1 pH 值对酶反应的影响

在温度为 50℃,反应 20h 的条件下,测定反应 pH 分别为 2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 时的酶活力,结果如图 5 所示。

由图 5 可以看出,淫羊藿苷糖苷酶的酶反应在 pH 值为 4.0 时酶反应的转化率最高,在 pH3.0~6.0 相对酶活力达到 75%以上,而在 pH 小于 3.0 或大于 6.0 时相对酶活力都有明显减退。因此,确定其

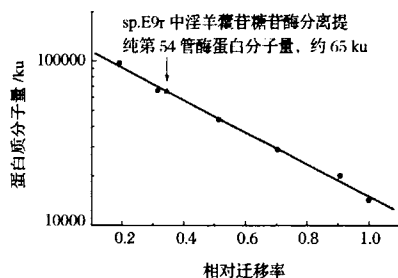


图4 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳中淫羊藿苷糖苷酶的分子质量

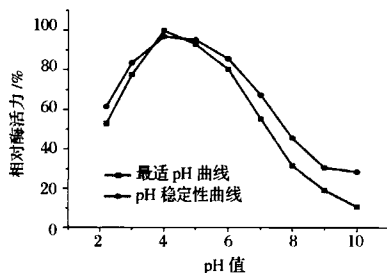


图5 最适 pH 及 pH 稳定性

反应最适 pH 为 4.0, 在 pH3.0~6.0 相对稳定。

### 2.3.2 温度对酶反应的影响

将酶液分别在 20~80℃ 不同温度下热处理 30 min 后, 迅速冷却到室温, 然后用处理后的酶液在最适的测活体系 (pH4.0, 50℃) 中检测酶的剩余活力, 结果如图 6 所示。

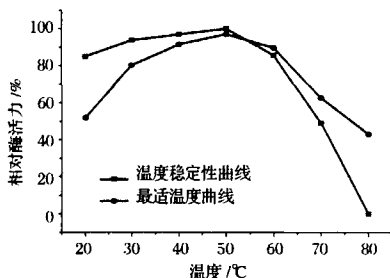


图6 最适温度及温度稳定性

随着温度的升高, 酶活力逐渐增大, 50℃ 时, 酶活达到最大值, 其后酶活力迅速下降, 80℃ 时, 酶活力完全丧失。因此, 确定淫羊藿苷糖苷酶的最适反应温度为 50℃, 在 20~60℃ 下稳定性较好。

### 2.3.3 金属离子对酶反应的影响

以淫羊藿苷为酶反应底物, 选用 7 种不同的金属离子 ( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ ) 以不同浓度加入酶反应体系, 于 pH4.0, 底物浓度 20 mg/mL, 反应温度 50℃ 的条件下反应 20 h。用薄层层析法检验, 测定金属离子对淫羊藿苷糖苷酶的激活与抑

制作用, 结果见表 1。

表1 金属离子对淫羊藿苷糖苷酶的影响

| 金属离子             | 相对酶活力/%                                     |      |       |       |       |       |
|------------------|---|------|-------|-------|-------|-------|
|                  | 加入金属离子浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ |      |       |       |       |       |
|                  | 2   | 5    | 10    | 50    | 100   | 200   |
| $\text{Na}^+$    | 95.2  | 96.3 | 96.5  | 97.1  | 97.2  | 98.3  |
| $\text{K}^+$     | 98.2  | 99.5 | 101.2 | 103.3 | 105.2 | 107.2 |
| $\text{Mg}^{2+}$ | 97.2  | 98.1 | 98.5  | 100.2 | 102.3 | 105.2 |
| $\text{Zn}^{2+}$ | 92.3  | 93.5 | 96.7  | 97.8  | 99.2  | 101.2 |
| $\text{Ca}^{2+}$ | 95.3  | 96.2 | 97.5  | 98.3  | 100.2 | 102.3 |
| $\text{Fe}^{3+}$ | 20.2  | 10.3 | 0     | 0     | 0     | 0     |
| $\text{Cu}^{2+}$ | 63.2  | 60.1 | 52.5  | 43.2  | 30.1  | 21.2  |

由表 1 可知,  $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  对酶反应的影响不大; 而  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  对淫羊藿苷糖苷酶有很明显的抑制作用且随着浓度的提高抑制作用明显增强。

### 2.3.4 反应动力学常数 $k_m$ 及最大反应速度 $V_{\max}$

配制不同浓度底物, 在 pH4.0, 50℃ 条件下酶反应 20h, 测定酶活力依据测定结果, 采用 Lineweaver-Burk 法作图, 结果如图 7 所示。

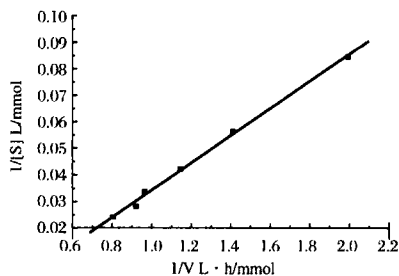


图7 淫羊藿苷糖苷酶的 Lineweaver-Burk 图

由图 7, 可得米氏方程:  $1/V = 19.452/S + 0.332$ , 最大反应速度  $V_{\max}$  为 3.012 mmol/(L · h), 米氏常数  $k_m$  为 58.59 mmol/L。

## 3 结语

通过对菌株 *Absidia* sp. E9r 的发酵培养, 得到了一种糖苷酶, 该酶能将淫羊藿苷水解, 生成低糖基淫羊藿苷 I。该酶的分子质量约为 65 ku, 酶的最适 pH 值为 4.0, 在 pH3.0~6.0 较稳定; 最适温度为 50℃, 在 20~60℃ 稳定性较好; 金属离子  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  对酶反应的影响不大, 而  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  对其有很明显的抑制作用; 酶反应动力学研究:  $V_{\max} = 3.012 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ,  $k_m = 58.59 \text{ mmol}/\text{L}$ 。

据文献报道<sup>[5]</sup>, 天然苷类转化成低糖皂苷后生物活性有所提高。本文利用菌种 *Absidia* sp. E9r 所产

的糖苷酶将天然淫羊藿苷水解成低糖基的淫羊藿苷 I, 但是其生理活性是否有显著提高以及所生成产物的药理、药效在临床应用中是否存在一定的毒副作用, 还有待进一步的深入研究。

## 参 考 文 献

- 1 刘素彩, 孔德娟. 淫羊藿苷对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(8): 28~30
- 2 杨静玉, 于庆海, 李爽, 等. 淫羊藿总黄酮对免疫功能低下小鼠的免疫增强作用[J]. 沈阳药科大学学报, 1998, 15: 94~97
- 3 Pzeherit C, Chanteranne B, Bennetau P, et al. Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomized rat[J]. Br J Nutr, 2001, 85: 307~316
- 4 Alekei DL, Gennain AS, Petersoncr, et al. Isoflavone rich

soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 72: 844~852

- 5 Li Wenkui. Phytochemistry[J]. Chin Chem Lett, 1996, 7(1): 23
- 6 Liggins J, Bluck L J C, Runswick S. Daidzein and genistein contents of vegetables[J]. Br J Nutr, 2000, 84: 717~725
- 7 匡莹, 鱼红闪. 淫羊藿苷糖苷酶产生菌的筛选及其酶反应条件[J]. 大连轻工业学院学报, 2006, 25(2): 89~92
- 8 姜晓野, 金学年, 金成哲, 等. 高产淫羊藿苷酶菌种的筛选[J]. 大连轻工业学院学报, 2007, 26(4): 298~301
- 9 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1984. 240
- 10 李建武, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994. 216

## Purification of Icariin-glycosidase and Its Enzymatic Characteristics

Yang Yu, Han Bing, Jin Fengxie, Yu Hongshan

(College of Bio. & Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

**ABSTRACT** The Icariin-glycosidase which produced by a strain named *Absidia* sp. E9r was purified and part of its characteristics were studied in this paper. The result indicated that its molecular weight is about 65 ku. The optimal temperature and pH for enzyme reaction were 50°C and 4.0 respectively. Under the conditions of temperature 20~60°C, pH 3.0~6.0, the enzyme is stable.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ions had no effect on the enzyme activity, while  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  inhibited the enzyme activity. The  $V_{\max}$  and  $K_m$  of the enzyme are 3.012mmol/(L·h) and 58.59mmol/L.

**Key words** Icariin, Icariin-glycosidase, enzymatic characteristics

信  
息  
食

## 普通食品、无公害食品、绿色食品、有机食品的区别

食用安全无污染、高品质的食品已成为众多消费者的共识和追求, 因此有机食品、绿色食品、无公害食品应运而生。与普通食品相比, 有机食品、绿色食品、无公害食品都是安全食品, 安全是这3类食品突出的共性, 它们从种植、收获、加工生产、储藏及运输过程中都采用了无污染的工艺技术, 实行了从土地到餐桌的全程质量控制, 保证了食品的安全性。但是3种又有许多不同点。

(1) 概念不同。有机食品是指完全不含人工合成的农药、肥料、生长调节素、催熟剂、家畜禽饲料添加剂的食品; 绿色食品是指遵循可持续发展原则, 按着特定生产方式, 经专门机构认定, 许可使用绿色食品标识商标的食品。无公害食品是指产地环境、生产过程和终端产品符合无公害食品标准及规范, 经过专门机构认定, 许可使用无公害食品标识的食品。

(2) 价格不同。绿色食品70%为加工产品, 30%为初级农产品, 有机食品和无公害食品都以初级农产品为主。有机食品的价格高于普通食品50%至几倍, 绿色食品的价格高于普通食品10%~20%, 无公害农产品的价格略高于一般农产品。

(3) 执行标准不同。就有机食品而言, 不同的国家, 不同的认证机构, 其标准不尽相同。有机食品的认证标准由国家认证认可监督管理委员会制定; 绿色食品标准是由中国绿色食品发展中心组织指定的统一标准, 依据我国具体国情其标准分为A级和AA级。

(4) 标识不同。有机食品标识在不同国家和不同认证机构是不同的; 绿色食品的标识在我国是统一的, 由3个部分组成, 即上方是太阳, 下方是叶片, 中心是蓓蕾, 正圆形, 意为保护; 无公害食品的标识在我国由于认证机构不同而形式不同。