

大豆异黄酮糖苷酶的纯化及性质研究

Purification and Properties of Isoflavone-glucosidase

谢明杰^{1*} 宋 明¹ 邹翠霞¹ 徐春华¹ 芦明春² 金凤燮²

XIE Ming-Jie^{1*}, SONG Ming¹, ZOU Cui-Xia¹, XU Chun-Hua¹, LU Ming-Chun² and JIN Feng-Xie²

1 辽宁师范大学生命科学学院,大连 116029

2 大连轻工业学院食品工程与生物工程学院,大连 116001

1 College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

2 College of Food and Fermentation Technology, Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116001, China

摘 要 利用 *Absidia* sp. R 菌株,通过液体发酵的方法,得到了一种高活性的大豆异黄酮糖基水解酶。该酶经硫酸铵分级沉淀、DEAE-Cellocus(DE-52)离子交换层析纯化,被纯化了 11 倍,收率为 10.9%。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得该酶的分子量为 53kD,该酶的最适反应温度为 50℃,最适 pH 为 5.0,温度低于 60℃,pH 在 5.0~7.0 范围内该酶较稳定,Co²⁺、Ca²⁺ 对该酶有激活作用;Ag⁺、Cu²⁺ 对该酶有抑制作用。当以染料木甙为底物时该酶的米氏常数(K_m)为 1.3×10⁻² mol/L。等电聚焦电泳测得其等电点为 3.2。

关键词 大豆异黄酮糖基水解酶,纯化,性质

中图分类号 Q814.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0635-04

Abstract A high activity isoflavone-glucosidase, which hydrolysis glycosides, was obtained using liquid fermentation from *Absidia* sp. R strain. The isoflavone-glucosidase was purified 11 folds with yielding rate of 10.9% after ammonium sulfate precipitation and DEAE-Cellocus(DE-52) ion exchange chromatography. SDS-PAGE results showed that the molecular weight is 53kD. And the optimum temperature, the optimum pH, K_m and pI of the enzyme are 50℃, 5.0, 1.3×10⁻² mol/L and 3.2, respectively. The isoflavone-glucosidase is also rather stable under 60℃ and in pH range from 5.0 to 7.0. The enzyme can be activated by Co²⁺ and Ca²⁺, and be inhibited by Ag⁺ and Cu²⁺.

Key words soybean isoflavone-glucosidase, purification, properties

近年来,随着人们对大豆及其制品的营养作用和保健功效研究的深入,发现大豆除了含有丰富的蛋白质和油脂外,还含有许多有益的生物活性物质。在这些生物活性物质中,大豆异黄酮因具有明显的生物学活性已越来越引起社会和学术界的普遍关注。它与人类的健康密切相关,具有许多生理功能,如抗肿瘤作用、对血管的防护作用、抗氧化活性、类

似女性雌激素作用及抗激素作用和预防骨质疏松症等^[1-4]。迄今为止,已知大豆中的异黄酮共有 12 种异构体,分为游离型的甙元(Aglycon)和结合型的糖甙(Glucosides)两类,天然状态下大豆异黄酮主要以糖甙形式存在,占总量的 97%~98%,甙元占总量的 2%~3%^[5]。近年来的研究表明,天然甙类的分子结构并不是活性的最佳状态,大豆异黄酮的

Received: November 11, 2005; Accepted: March 23, 2006.

This work was supported by the grant from the National Natural Science Foundation of China(No.20076007).

* Corresponding author. Tel 86-411-84258306 E-mail xmj1222@sina.com

国家自然科学基金资助(No.20076007)

生理活性主要是其甙元的活性,大豆异黄酮甙须被酶水解成甙元形式才能发挥药效,因此获得高活性的大豆异黄酮糖苷酶对开发富含大豆异黄酮甙元的保健食品意义重大。但目前国内外高活性的水解大豆异黄酮糖甙的酶还在研制阶段,有关酶法转化大豆异黄酮糖甙为大豆异黄酮甙元的系统研究也尚未见报道。本文利用从酒曲中分离筛选到的 *Absidia* sp. R 菌株,通过液体发酵的方法得到了能水解大豆异黄酮糖甙的酶并对该酶的性质进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: *Absidia* sp. R 由大连轻工业学院食品发酵菌种保藏所提供。

1.1.2 液体发酵培养基(%) 麸皮 2.5, 硝酸钠 0.5; 蛋白胨 0.5, pH 7; 121℃ 灭菌 20min。

1.1.3 染料木甙和染料木素标准品: 购自美国 Sigma 公司, 含量为 99.99%。

1.1.4 DEAE-Cellulose(DE-52): Whatman 公司。

1.1.5 标准蛋白 北京鼎国生物技术发展中心。

1.1.6 薄层层析板 硅胶板 Kieselgel 60 F-254 德国 Merck 公司。

1.2 方法

1.2.1 液体发酵方法与粗酶液的制备: 在液体培养基中按照 10% 接种量加入 *Absidia* sp. R 孢子悬液(孢子含量为 10^6 /mL), 30℃, 160r/min 下培养 84h, 然后 8000r/min 离心 10min, 上清液即为粗酶液。

1.2.2 硫酸铵沉淀: 在 0℃ 条件下, 将粗酶液用 40% 饱和度硫酸铵除杂蛋白, 用 65% 饱和度硫酸铵析出大豆异黄酮糖苷酶, 然后将沉淀溶于醋酸缓冲液中, 透析、浓缩后, 进一步纯化。

1.2.3 DEAE-Cellulose(DE-52)离子交换层析^[6]: 将脱盐浓缩后的酶液加到预先用 pH 5.0, 20mmol/L HAC-NaAC 缓冲液平衡的 DE-52 阴离子交换柱($\phi 2.0\text{cm} \times 12\text{cm}$)。先用同样的缓冲液洗脱至 OD_{280} 值不变后, 再用 0~240 mmol/L KCl 溶液进行线性梯度洗脱, 紫外检测器自动检测, 流出液用自动部分收集器收集于试管中, 流速为 0.4mL/min, 每试管收集 3mL。将提纯后的酶液进行真空冷冻干燥, 制成冻干酶粉, 用于酶的性质研究。

1.2.4 酶的纯化及其分子量测定^[7]: 采用不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定。

1.2.5 米氏常数(K_m)的测定: 分别配制不同浓度

的染料木甙底物溶液(5.782~28 mmol/L) 将底物溶液与提纯酶液按照等体积混合, 50℃, pH5.0 下反应 1h, 测定反应速度 v 。通过双倒数作图法, 求出 K_m 。

1.2.6 等电点的测定: 通过等电聚焦电泳(凝胶浓度 7.5%)测定。

1.2.7 酶活测定方法: 取 0.1mL 的染料木甙底物溶液(用 0.02mol/L pH5.0 HAC-NaAc 缓冲液将底物配制成浓度为 15mg/mL), 加入 0.1mL 酶液(冻干酶粉溶于 0.02mol/L pH5.0 HAC-NaAc 缓冲液)等比例混合, 50℃ 下反应 2h 后, 加 2 倍体积的乙酸乙酯进行萃取, 取萃取物 10 μ L 作薄层层析(TLC), 展开剂为乙酸乙酯: 丁酮: 甲醇: 水(10:7:1:1), 展开约 6cm, 挥干溶剂, 用双波长薄层扫描仪扫描。根据斑点面积的积分值计算染料木素的生成量。在上述条件下, 每小时水解释放 1nmol 的染料木素的酶量定义为一个酶活力单位(u)。

2 结果与讨论

2.1 大豆异黄酮糖苷酶的分离与纯化

大豆异黄酮糖苷酶经 DE-52 离子交换层析所得的梯度洗脱曲线见图 1。由图可知, 在粗酶液中的蛋白质成分较多, 其中有 3 个明显的蛋白洗脱峰, 它们分别在 27~34 管、42~49 管和 56~63 管。收集各峰值处的试管, 测定其染料木甙的酶活力, TLC 的检测结果见图 2。由图可知, 在 120~180 mmol/L KCl 浓度下洗脱的酶蛋白, 具有较高的大豆异黄酮糖基水解酶活性, 其中第 45 管酶活最高。粗酶液经各步提纯后的实验结果见表 1。由表可知, 该菌所

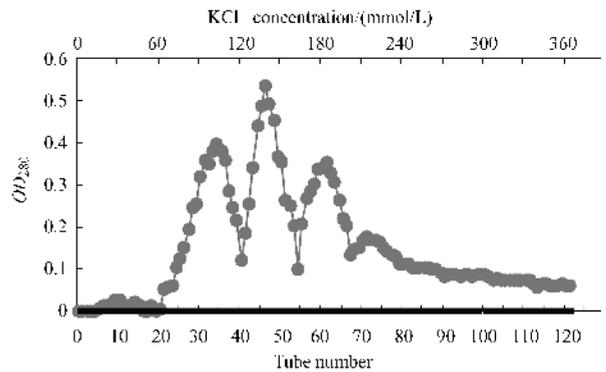


图 1 DEAE-纤维素 DE-52 纯化大豆异黄酮糖苷酶

Fig. 1 Purification of isoflavone-glucosidase on DEAE-Cellulose(DE-52)

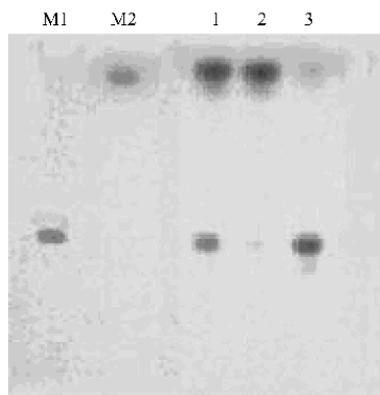


图2 大豆异黄酮糖苷酶解染料木素的 TLC 图谱

Fig.2 TLC results of genistin hydrolysis by isoflavone-glucosidase

M1 :genistin ;M2 :genistin ;1 :30th tube ;2 :45th tube ;3 :59th tube ;
Developing solution :C₂H₅COOC₂H₅ :CH₃COC₂H₅ :MeOH :H₂O = 10 :7 :1 :1.

产的大豆异黄酮糖苷酶经上述各步提纯后,被纯化了11倍,收率为10.9%。

2.2 酶的基本性质

2.2.1 提纯酶分子量的测定 将经 DEAE-52 离子交换层析提纯的第 30 管和第 45 管冷冻干燥酶粉,作 SDS-PAGE 电泳结果见图 3。由图可知,第 30 管含有多条蛋白带,未被完全分离纯化,而酶活最高的第 45 管酶液达到了电泳纯。根据标准蛋白分子量曲线计算该酶的分子量约为 53kD。

2.2.2 酶的底物专一性 提纯酶对不同底物的水解结果见表 2。由表可以看出,该酶能水解大豆异黄酮苷的 7-β-D-葡萄糖苷键使其转化成相应的甙元形式,但几乎不水解 pNP-β-D-Glc,也不水解人参皂苷 Rd,说明本实验提取的大豆异黄酮糖苷酶对大豆异黄酮甙有较强的专一性。

表 1 酶的提纯结果

Table 1 Purification summary for isoflavone-glucosidase

Step	Volume/mL	Total activity/u	Total protein/mg	Specific activity(u/mg)	Yield/ %	Fold purified
Crude enzyme extract	100	1175	207	5.7	100	1.0
65% (NH ₄) ₂ SO ₄ saturation fraction	10.0	603	61.5	9.8	51.3	1.7
DEAE-Cellulose 45 th tube	3.0	128	2.04	62.7	10.9	11

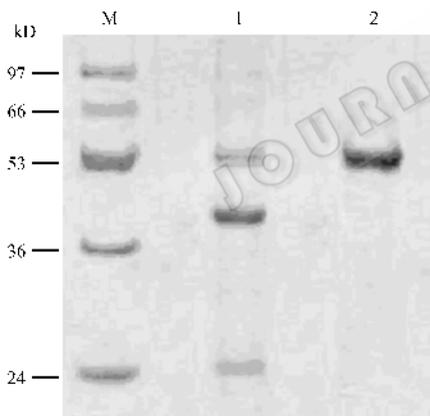


图3 提纯酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.3 SDS-PAGE electrophoretogram of purified enzymes
M :phosphorylase (97kD), albumin (66kD), glutamic dehydrogenase (53kD), glyceraldehyde-3-phosphate (36kD), trypsinogen (24kD); 1 :30th tube ;2 :45th tube.

2.2.3 pH 对酶活力的影响 反应体系同酶活测定,在不同 pH 下测定酶活力。结果表明,该酶最适 pH 为 5.0。在 pH5.0~7.0 的范围内,酶活力较高且稳定。当反应 pH≤4.0 或 pH≥7.0 时,酶活力有很大程度的降低。

2.2.4 温度对酶活力的影响 反应体系同酶活测定,在不同温度下测定酶活力。结果表明,在本实验条件下,该酶的最适反应温度为 50℃。当反应温度超过 55℃后,酶活力有很大程度的降低。

2.2.5 金属离子对酶活力影响 在酶反应液中分别加入不同浓度(0~50mmol/L)不同种类金属离子(均为金属氯化物),以未加金属离子的酶活力为 100%,实验重复 3 次,结果见表 3(3 次实验的平均值)。由表可知,Co²⁺、Ca²⁺ 对该酶有激活作用,Ag⁺、Cu²⁺ 对该酶有明显的抑制作用,3 次实验的结果误差不大。

表 2 大豆异黄酮糖基水解酶对不同底物的水解

Table 2 Enzymatic hydrolysis of isoflavone-glucosidase of different substrates

Substrate	Enzyme activity(u/mL)
Daidzin	130
Genistin	134
p-Nitrophenyl-β-D-Glucoside	-
Ginsenosides-Rd	-

" - " : undetected activity.

表 3 金属离子对酶活力的影响

Table 3 Effect of metallic ion on enzyme activity

Concentration(mmol/L)	Ca ²⁺	Ag ⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺
0	100	100	100	100	100
5	100	90	100	101	81
10	101	85	100	102	78
50	105	80	102	108	74

值通过 Lineweaver-Burk 作图(图 4)计算,为 1.3×10^{-2} mol/L。

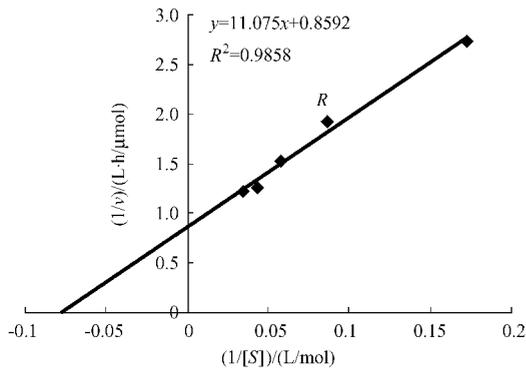


图 4 酶催化反应的双倒数曲线

Fig.4 Double-reciprocal plots of enzyme catalytic reaction

2.2.7 等电点的测定:由聚焦后酶蛋白在凝胶上的位置,从 pH 距离图上查得其等电点为 3.2。

3 结论

本文利用 *Absidia* sp. R 菌株,通过液体发酵的方法,得到了一种高活性的大豆异黄酮糖基水解酶,由于大豆异黄酮甙的主要成分为染料木甙,因此本文以染料木甙作为测定酶活的底物。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,该酶的分子量为 53kD,最适反应温度为 50℃,最适 pH 为 5.0,温度低于 60℃,pH 在 5.0~7.0 范围内该酶较稳定, Co^{2+} 、 Ca^{2+} 对该酶有激活作用; Ag^{+} 、 Cu^{2+} 有明显的抑制作用;当以染料木甙为底物时该酶的 K_m 为 1.3×10^{-2} mol/L 等

电点为 3.2。该酶与传统的 β -葡萄糖苷酶在水解底物上存在差异,如作用对硝基苯酚基- β -D-葡萄糖苷时不表现活性,但对水解大豆异黄酮甙具有较强的专一性。关于该酶与传统的 β -葡萄糖苷酶在其它方面的差别,还需要进一步的研究。此酶的获得对今后开发富含大豆异黄酮甙元的保健食品具有重要的意义。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Holder CL, Churchwell MI, Doerge DR. Quantification of soy isoflavones, genistein and daidzein, and conjugates in rat blood using LC/ES-MS. *Agric Food Chem*, 1999, **47**(9): 3764-3770
- [2] Wang T (王陶), Wang H (王辉). The effect of phytoestrogen on human beings. *Hunan Guiding Journal of TCM* (湖南中医药导报), 1999, **5**(2): 14-16
- [3] Li YM (李咏梅), Li SG (厉曙光). Anti-cancer action of soybean isoflavones. *Journal of Tongji University (Medical Science)* (同济大学学报医学版), 2002, **23**(4): 351-353
- [4] Lamartiniere CA. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *Am J Clin Nutr*, 2000, **71**(6): 1705-1707
- [5] Zhou L (周玲), Su LH (苏黎红), Hou JL (侯金玲). A general situation in studies of soybean isoflavone. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research* (时珍国医国药), 2001, **12**(2): 157-158
- [6] Zhang Chunzhi, Yu Hongshan, Bao Yongming et al. Purification and characterization of ginsenoside- α -arabinofuranase hydrolyzing ginsenoside Rc into Rd from the fresh root of Panax. *Process of Biochemistry*, 2002, **37**: 793-798
- [7] Chrambach A, Rodbard D. Polyacrylamide gel electrophoreses. *Science*, 1971, **172**: 440-451

治禽流感的酶及其商品化前景

禽流感病毒主要在禽类之间流行传播,易造成禽类大量死亡,形成瘟疫。一般不在人类之间传染流行,但也得高度警惕。饲养者直接接触病禽已有发生感染的情况。该病毒一旦发生变异传染给人,则会对人类构成生命威胁。这类非细胞形态致病因子有随着不同因素的变化而发生变异的可能性。在现实生活中多加注意是可以避免的,需防与治相结合。首先,此病毒要有适宜的受体才能生存繁衍(复制),并发挥作用。禽流感病毒通过某种载体物进入口中而感染肺部,其下端细胞表面的糖链正是它的侵染受体。有研究者通过实验证明,可以利用酶把这种糖链切掉,阻止该病毒进一步传染。美国一家 NexBio 公司余芒博士(华裔)研制出一种新酶叫流感酶(flydase),并将其开发成一种新药(系一种蛋白药物),它能有效切断患者肺部下端细胞表面的糖链,阻止病毒进一步扩散,从而达到防病、治病的目的。在美国疾病控制中心(CDC)已进行了安全试验(临床试验)验证,预计在3年内此产品有望进入市场,价格将低于“达菲”(tamiflu)药物。而且,该病毒也有可能对“达菲”特别是那些仿制品产生抗药性,一旦产生抗药性,这些药物则失去作用。所以开发新药非常有必要。第二,流感酶的重要性在于它能像“炸药”那样把入侵病毒受体的“桥”炸断,从而阻止该病毒入侵,不论其如何变异也无法深入机体到达目的部位,研究者已将这种酶研制成“粉雾剂”产品,当患者将此“剂”直接吸入受体部位,则可迅速切断受体细胞表面的糖链,该病毒则失去入侵扩散到达目的部位的能力。第三,流感酶对禽流感病毒有显著的效能,它有很强的广谱性(可以抗多种流感病毒包括禽流感毒株 H5N1),是经动物试验证实的,效果很好。为了进一步扩大生产,实现产业化,最为理想的办法是将流感酶基因转移到高表达受体菌如毕赤酵母中,有可能获得更高的酶蛋白表达量,这样为流感酶产品商业化、扩大再生产开辟了新途径。

(柯 为)