

· 食品生物技术 ·

## 苦荞籽粒芦丁降解酶的纯化、酶学性质及部分一级结构分析

张玉玮, 李洁, 袁勇, 顾继娟, 陈鹏

西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100

张玉玮, 李洁, 袁勇, 等. 苦荞籽粒芦丁降解酶的纯化、酶学性质及部分一级结构分析. 生物工程学报, 2017, 33(5): 796-807.  
Zhang YW, Li J, Yuan Y, et al. Purification, characterization and partial primary structure analysis of rutin-degrading enzyme in tartary buckwheat seeds. Chin J Biotech, 2017, 33(5): 796-807.

**摘要:** 芦丁降解酶催化芦丁降解为水溶性降低的槲皮素, 是形成苦荞苦味的主要因素。研究以榆 6-21 苦荞籽粒粉为材料, 通过硫酸铵分级沉淀、疏水层析、阳离子交换层析、凝胶过滤层析分离纯化芦丁降解酶, SDS-PAGE 显示纯化的芦丁降解酶为分子量 66 kDa 的单一一条带。芦丁降解酶的最适 pH 值为 5.0, 最适温度为 50 °C。对其催化特性研究表明, 该酶的  $K_m$  值为 0.27 mmol/L,  $V_{max}$  值为 39.68 U/mg。Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 和 EDTA 对其有不同程度的抑制作用。纯化的芦丁降解酶可耐受 50% (V/V) 的甲醇。Edman 降解法测定其 N 端序列为 TVSRSSFPDGFLFGL。MALDI-TOF-MS (基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱) 二级质谱获得了其 15 个内肽序列。该研究为从转录组数据中确定芦丁降解酶的候选基因及深入研究芦丁降解酶的生物学功能奠定了基础。

**关键词:** 苦荞, 芦丁降解酶, 纯化, 特性

**Received:** November 1, 2016; **Accepted:** January 20, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 30400282, 31171606).

**Corresponding author:** Peng Chen. Tel/Fax: +86-29-87091637; E-mail: pengchen@nwsuaf.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 30400282, 31171606) 资助。

网络出版时间: 2017-02-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170213.1404.001.html>

# Purification, characterization and partial primary structure analysis of rutin-degrading enzyme in tartary buckwheat seeds

Yuwei Zhang, Jie Li, Yong Yuan, Jijuan Gu, and Peng Chen

College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

**Abstract:** Rutin-degrading enzymes (RDE) can degrade rutin into poorly water soluble compound, quercetin, and cause the bitter taste in tartary buckwheat. In the present study RDE from Yu 6-21 tartary buckwheat seeds was purified by ammonium sulphate precipitation, followed by hydrophobic interaction chromatography on Phenyl Sepharose CL-4B, ion exchange chromatography on CM-Cellulose and gel filtration chromatography on Sephadex G-150. Purified RDE showed single band with molecular weight of 66 kDa on SDS-PAGE. The optimum pH and temperature of RDE were 5.0 and 50 °C respectively. The  $K_m$  was 0.27 mmol/L, and the  $V_{max}$  was 39.68 U/mg. The RDE activity could be inhibited by  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and EDTA, and showed tolerance to 50% methanol ( $V/V$ ). The N terminal sequence (TVSRSSFPDGFLGL) was obtained by Edman degradation method and 15 internal peptide sequences were determined by MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry). These results established the foundations for identification of the candidate gene of RDE *via* transcriptome data and further studying RDE biological function.

**Keywords:** tartary buckwheat, rutin-degrading enzyme, purification, characterization

荞麦, 属于蓼科 (Polygnaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum mill*)。荞麦中, 尤其是苦荞中含有芦丁、槲皮素和荞麦碱等重要的生理活性物质。苦荞中黄酮类化合物的含量比普通荞麦高 10–100 倍<sup>[1]</sup>, 芦丁是苦荞中重要的黄酮类化合物, 具有降低毛细血管通透性和脆性、保持及恢复毛细血管的正常弹性等功能。在辅助治疗高血压、糖尿病、视网膜出血等疾病中发挥着重要作用。

荞麦中存在的芦丁降解酶极大限制了芦丁的提取和加工, 并且高活性的芦丁降解酶成为高芦丁荞麦育种的重要障碍。目前对芦丁降解酶的研究主要集中于对其进行分离纯化和部分催化特性的分析。Yasuda 等<sup>[2]</sup>首次从苦荞籽粒中分离纯化出分子量约为 70 kDa 的芦丁降解酶的同工酶, 其  $K_m$  值分别为 0.12 mol/L 和

0.13 mol/L, 后续研究发现 20% ( $V/V$ ) 的水溶性溶剂如乙醇、DMSO 可提高芦丁降解酶活性<sup>[3]</sup>。王改玲等<sup>[4]</sup>从苦荞籽粒中分离出芦丁降解酶粗品, 并证明是一种高活性天然  $\beta$ -糖苷酶, 浓度高于 40% ( $V/V$ ) 的乙醇对其有明显的抑制作用。唐宇等<sup>[5]</sup>从野生荞麦籽粒中纯化出约 60 kDa 的芦丁降解酶, 其最适 pH 和最适温度分别为 5.0 和 40 °C。Cui 等<sup>[6]</sup>从苦荞籽粒中纯化出 70 kDa 的芦丁降解酶, 可特异性水解芦丁产生槲皮素, 提出利用芦丁降解酶酶解制备槲皮素的思路。本实验室 Li 等<sup>[7]</sup>建立了一种利用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 RDE 同工酶的方法, 并证明在苦荞种子中至少存在 5 种 RDE 同工酶。前人建立的芦丁降解酶纯化方法中, 多采用在硫酸铵分级沉淀之后采用透析除盐再进行后续层析分离纯化的方式, 造成蛋白透析中形成大量不可逆沉淀,

影响目标蛋白的回收。因此纯化方法有待进一步优化。

作为苦荞芦丁分解代谢的关键酶，迄今为止未见芦丁降解酶一级结构研究的相关报道，因此优化芦丁降解酶的纯化方法、分析其催化特性及部分一级结构，将为克隆芦丁降解酶的基因以及揭示芦丁降解酶在次生代谢物积累过程中的生物学功能奠定重要的基础，同时为体外条件下利用芦丁降解酶的催化特性进行生物催化研究提供基础资料。本研究在引入疏水层析纯化芦丁降解酶并在分析其催化特性的基础上，利用 N 端测序和质谱技术，获得其成熟蛋白 N 端序列及内肽序列，以期为结合苦荞籽粒发育期转录组数据确定芦丁降解酶的候选基因、深入研究芦丁降解酶的生物学功能及培育高芦丁含量的苦荞品种奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 苦荞

苦荞粉，榆 6-21，由陕西省榆林农业学校提供，储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

#### 1.1.2 主要试剂

芦丁 (国药集团化学试剂有限公司, BR); 槲皮素 (国药集团化学试剂有限公司, BR); 硫酸铵 (AR); 无水乙酸钠 (AR); 冰乙酸 (AR); 甲醇 (AR);  $\text{MnCl}_2$  (AR);  $\text{AlCl}_3$  (AR);  $\text{ZnCl}_2$  (AR);  $\text{CuSO}_4$  (AR); EDTA (AR); 蔗糖 (AR)。疏水层析介质 (Phenyl Sepharose CL-4B)、CM-纤维素、Sephadex G-150 均为 GE 公司产品。

### 1.2 芦丁降解酶的制备与纯化

#### 1.2.1 制备芦丁降解酶粗酶液

脱脂苦荞粉与 15 倍体积  $0.2\text{ mol/L}$  乙酸缓

冲液 ( $\text{pH } 4.0$ ) 混匀,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  提取过夜,  $11\ 500\text{ r/min}$  冷冻离心  $15\text{ min}$ , 上清即为芦丁降解酶粗酶液, 测定其蛋白质含量和芦丁降解酶活力。

#### 1.2.2 硫酸铵分级沉淀分离

粗酶液进行硫酸铵分级沉淀, 收集  $60\% - 90\%$  硫酸铵饱和度区段的沉淀蛋白, 溶于含  $1.4\text{ mol/L}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的  $0.07\text{ mol/L}$  乙酸缓冲液 ( $\text{pH } 4.0$ ) 中, 测定其蛋白质含量和芦丁降解酶活力。

#### 1.2.3 疏水层析分离

硫酸铵沉淀的溶解液上样于经平衡液 I ( $1.2\text{ mol/L}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的  $\text{pH } 4.0$ 、 $0.06\text{ mol/L}$  乙酸缓冲液) 平衡的 Phenyl Sepharose CL-4B 柱 ( $1.8\text{ cm} \times 11.5\text{ cm}$ ), 用平衡液 I 洗脱至  $A_{280} < 0.02$ , 蒸馏水洗脱结合蛋白, 收集芦丁降解酶活性洗脱峰, 于透析液 ( $\text{pH } 4.0$ ,  $0.02\text{ mol/L}$  乙酸缓冲液) 中透析过夜。测定其蛋白质含量和芦丁降解酶活力。

#### 1.2.4 阳离子交换层析分离

疏水层析活性峰收集液稀释 2 倍后上样经平衡液 II ( $\text{pH } 4.0$ ,  $0.1\text{ mol/L}$  乙酸缓冲液) 平衡过的 CM-纤维素柱 ( $1.8\text{ cm} \times 12\text{ cm}$ ), 平衡液 II 洗脱至  $A_{280} < 0.02$ , 线性梯度 ( $\text{NaCl}$  浓度梯度为  $0.1 - 0.4\text{ mol/L}$ ) 洗脱结合蛋白, 收集活性洗脱峰。用 PEG 10 000 浓缩收集液, 测定其蛋白质含量和芦丁降解酶活力。

#### 1.2.5 凝胶过滤层析分离

平衡液 III (含  $0.4\text{ mol/L}$   $\text{NaCl}$  的  $\text{pH } 4.0$ ,  $0.2\text{ mol/L}$  乙酸缓冲液) 充分平衡柱子, 将经浓缩的蛋白样品上样于 Sephadex G-150 层析柱, 用平衡液 III 洗脱并收集活性洗脱峰, 经 PEG 10 000 浓缩后获得纯化的芦丁降解酶, 测定其蛋白质含量和酶活力, 并于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 蛋白质含量和酶活的测定

粗酶液和每一次层析柱的洗脱液均进行蛋白含量和酶活性测定。蛋白质含量测定采用 Bradford 法<sup>[8]</sup>,以牛血清白蛋白为标准蛋白。芦丁降解酶活性测定参照 Chen 等<sup>[9]</sup>的等吸收波长分光光度法,酶活测定体系为:160  $\mu\text{L}$  0.1%的芦丁溶液(含 80 mmol/L、pH 4.0的乙酸缓冲液,20%甲醇)中加入 40  $\mu\text{L}$  酶液,迅速混匀,40  $^{\circ}\text{C}$  准确保温 3 min,立即加入 800  $\mu\text{L}$  甲醇终止反应,再加入 4 倍体积测定稀释液(含 20 mol/L、pH 4.0的乙酸缓冲液,80%甲醇),混匀后测定 372 nm 和 344.5 nm 光吸收并计算差值  $\Delta A$ 。对照组以等体积乙酸缓冲液(pH 4.0、0.1 mol/L)代替酶液。以 3 min 光吸收的差值  $\Delta A$  变化 0.01 定义为一个酶活力单位(1 U)。酶的总活力(Total activity)及比活力(Specific activity)的计算参考刘国琴等<sup>[10]</sup>的方法。

### 1.4 芦丁降解酶分子量的测定

参照 Laemmli UK<sup>[11]</sup>的方法,将纯化的芦丁降解酶进行 SDS-PAGE。取纯化的酶液加入等体积 2 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液并沸水浴处理 5 min,离心后取上清进行 SDS-PAGE 分析,浓缩胶浓度为 3.3%,分离胶浓度为 12%。经考马斯亮蓝 R-250 染色后于脱色液中脱色至条带清晰,拍照记录结果。

### 1.5 Native-PAGE 分析芦丁降解酶

参照 Li 等<sup>[7]</sup>的方法进行芦丁降解酶的 Native-PAGE 分析和活性染色。纯化的酶液中加入等体积含溴酚蓝的 40%蔗糖溶液,上样于 10% 分离胶的 Native-PAGE。电泳结束后分离胶置于 0.1 mol/L 乙酸缓冲液(pH 4.0)中平衡 40 min,然后置于 30 mL、0.1%芦丁溶液(含 80 mmol/L、

pH 4.0的乙酸缓冲液,20%甲醇)中 50  $^{\circ}\text{C}$  反应至凝胶出现明显的黄色条带,倾去反应液用蒸馏水洗涤凝胶数次,置紫外灯下观察记录结果。

### 1.6 芦丁降解酶 N 端氨基酸测序

转移 SDS-PAGE 凝胶中分离的芦丁降解酶条带于 PVDF 膜,送样至北京大学利用 EDMAN 降解法(Procise 491, Applied Biosystems)测定芦丁降解酶 N 端 15 个氨基酸序列。

### 1.7 芦丁降解酶质谱分析

纯化的芦丁降解酶送至上海厚基生物科技有限公司进行质谱分析。蛋白质样品用胰蛋白酶水解后的产物通过 MALDI-TOF/TOF 质谱仪分析得到酶解多肽的肽指纹图谱(PMF)。选择 15 个强度较高的肽离子作为母离子进行 MALDI-TOF-MS(基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱)二级质谱分析,获得二级质谱图。

用 ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl/cgi/profound.exe>) 提交 PMF 数据,与 NCBI nr 数据库比对,并将二级质谱图进行 *de novo* 解析获得内肽序列。

### 1.8 芦丁降解酶的催化特性分析

#### 1.8.1 pH 对芦丁降解酶活性和稳定性的影响

pH 对芦丁降解酶活性的影响:将纯化的芦丁降解酶分别用 pH 3.0、pH 4.0、pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0、pH 8.0 的 0.2 mol/L 乙酸缓冲液 4  $^{\circ}\text{C}$  透析过夜,参照本文 1.3 的方法测定芦丁降解酶的活性。各测定样设置 3 次重复。

pH 对芦丁降解酶稳定性的影响:将纯化的芦丁降解酶分别用 pH 3.0、pH 4.0、pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0 和 pH 8.0 的 0.2 mol/L 乙酸缓冲液 4  $^{\circ}\text{C}$  透析过夜,于 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴保温 2 h,参照本文 1.3 的方法测定芦丁降解酶的活性。各测定样设置 3 次重复。

### 1.8.2 温度对芦丁降解酶活性和稳定性的影响

温度对芦丁降解酶活性的影响：参照本文 1.3 的方法分别在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C 和 70 °C 温度条件下，测定芦丁降解酶的活性。各测定样设置 3 次重复。

温度对芦丁降解酶稳定性的影响：将纯化的芦丁降解酶分别在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C 和 70 °C 水浴中保温 2 h 后，参照本文 1.3 的方法测定芦丁降解酶的活性。各测定样设置 3 次重复。

### 1.8.3 测定芦丁降解酶的 $K_m$ 值和 $V_{max}$ 值

采用双倒数作图法测定芦丁降解酶的  $K_m$  值和  $V_{max}$  值。分别在 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 和 0.6% 的底物浓度条件下（底物溶于 80 mmol/L、pH 4.0 的乙酸缓冲液，20% 甲醇）测定芦丁降解酶的活性。每测定设置 3 次重复。

### 1.8.4 金属离子及 EDTA 对芦丁降解酶活性的影响

用 pH 4.0、0.1 mol/L 乙酸缓冲液分别配制 1 mmol/L、10 mmol/L 两种浓度的  $MnCl_2$ 、 $ZnCl_2$ 、 $CuSO_4$  和 EDTA 溶液。取 50  $\mu$ L 纯化的芦丁降解酶于 1 mL 各溶液中 50 °C 保温 2 h，参照本文 1.3 的方法测定处理前后各溶液中芦丁降解酶的活性。每种测定样设置 3 次重复。

### 1.8.5 甲醇对芦丁降解酶活性的影响

向芦丁降解酶液中加入预冷的甲醇，使甲醇终浓度分别为 10%、20%、30%、40%、50%、60% 和 70%。-20 °C 静置 1 h，10 000 r/min 冷冻离心 20 min，取上清测定芦丁降解酶的活性。各测定样设置 3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 芦丁降解酶的纯化

经过硫酸铵分级沉淀、疏水层析、阳离子

交换层析和凝胶过滤层析纯化的芦丁降解酶在 SDS-PAGE 上显示单一条带，分子量约为 66 kDa（图 1）。纯化过程中在硫酸铵分级沉淀之后引入疏水层析，有效克服了透析除盐步骤导致的沉淀对纯化的负面影响，酶的比活力由 1.58 U/mg 提高到 20.84 U/mg，纯化倍数达到 13.19 倍，回收率达到 7.39%（表 1）。比唐宇等<sup>[5]</sup>报道的纯化方法的纯化倍数（11.3 倍）和回收率（3.5%）有所提高。纯化的芦丁降解酶经 Native-PAGE 分离及活性染色，借助于槲皮素的紫外吸收特性，可检测到凝胶上单一的槲皮素沉积的条带（图 2），证明纯化的蛋白为芦丁降解酶。

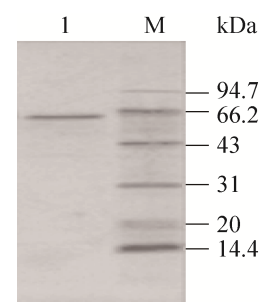


图 1 纯化芦丁降解酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified RDE. 1: purified RDE; M: molecular weight marker.



图 2 Native-PAGE 鉴定芦丁降解酶的活性（泳道 1, 2 为重复样品）

Fig. 2 Identification of the activity of purified RDE by native-PAGE. Lane 1 and Lane 2 were duplicate samples.

## 2.2 芦丁降解酶 N 端氨基酸测序

将纯化的芦丁降解酶利用 EDMAN 降解法 (Procise 491, Applied Biosystems) 测定其 N 端 15 个氨基酸序列, 测序结果为 :N-Thr Val Ser Arg Ser Ser Phe Pro Asp Gly Phe Leu Phe Gly Leu(TVSRSSFPDGFLFGL)。利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 在线分析, 未发现报道的相似序列。

## 2.3 芦丁降解酶质谱分析

### 2.3.1 芦丁降解酶肽指纹图谱分析

对芦丁降解酶进行 MALDI-TOF/TOF 质谱

分析, 得到其肽指纹图谱 (PMF) (图 3)。用在线分析软件 ProFound 进行数据分析, 未发现类似的蛋白质质谱数据。

### 2.3.2 芦丁降解酶二级质谱分析

选择芦丁降解酶 PMF 质荷比分别为 1 751.82、937.5、1 658.8、1 675.864、1 170.643 3、1 227.67、1 732.89、1 085.66、2 207.728 9、1 453.616、1 562.8、1 022.5、1 186.556、1 365.68 和 999.656 3 的 15 个肽段作为母离子进行 MALDI-TOF-MS (基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱) 二级质谱分析, 并进行 *de novo* 测序, 获得的

表 1 芦丁降解酶的分离纯化

Table 1 Purification of RDE from tartary buckwheat seeds

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification fold
Crude extract of RDE	1 072.00±53.60 a	1 701.34±85.07 a	1.58±0.08 a	100.00±5.03 a	1.00±0.05 a
Extract from 60%–90% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	510.23±25.51 b	1 465.12±73.26 b	2.83±0.14 b	86.10±4.31 b	1.79±0.09 b
Extract from phenyl Sepharose CL-4B	102.51±5.13 c	1 185.90±59.29 c	11.50±0.58 c	70.70±3.54 c	7.26±0.36 c
Extract from CM-Sepharose	31.47±1.57 d	588.78±29.44 d	18.67±0.93 d	34.60±1.73 d	11.79±0.59 d
Extract from Sephadex G-150	6.01±0.30 de	125.69±6.28 e	20.84±1.04 e	7.39±0.37 e	13.19±0.66 e

Different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ) in each column.

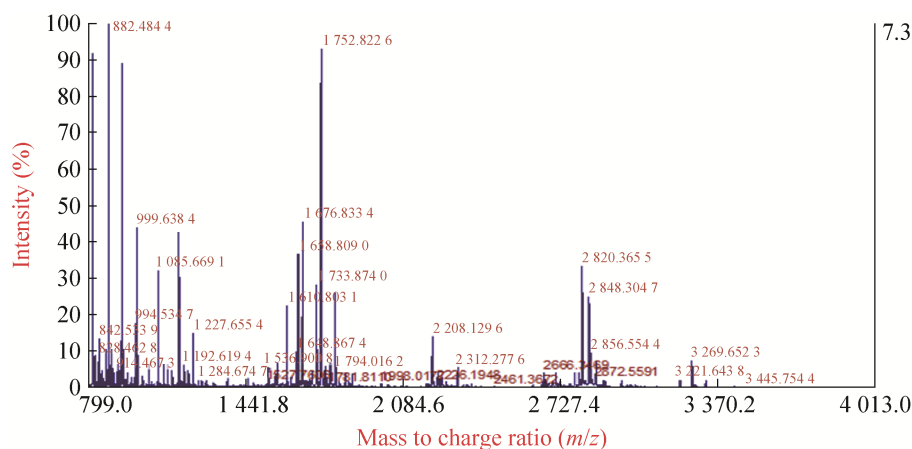


图 3 芦丁降解酶肽指纹图谱

Fig. 3 The peptide mapping fingerprint of RDE.

15 段芦丁降解酶内肽序列为：ETGL(I)NTFR，MTPVVYGEYPESMR，NGFTFVDYDNNL(I)TR，L(I)TYHSGHL(I)DK，GL(I)TYHSGHL(I)DK，L(I)SYTTDNHATTSFFK，L(I)SGGL(I)NQL(I)GVK，ETYNNPAVV(L)TENG，AL(I)PVVYGEY，VADDFYHR，QYEGAAFTDGK，QSYEQLAEKNR 和 SL(I)GL(I)FPPL(I)R。芦丁降解酶一级结构的信息至今尚无报道，本研究获得的 N 端序列以及内肽序列为借助于转录组数据确定目标基因奠定了基础。

## 2.4 芦丁降解酶酶学性质研究

### 2.4.1 pH 对芦丁降解酶活性和稳定性的影响

如图 4 所示，pH 对芦丁降解酶活性有显著的影响。在 pH 3.0–8.0 范围内芦丁降解酶均有活性且活性呈先增高后降低的规律，在 pH 5.0 时酶活性最大。pH 是影响酶储存稳定性的重要参数，将处于 pH 3.0–8.0 的缓冲液的芦丁降解酶 40 °C 保温 2 h 后在最适催化条件下测定其残余活性，发现 pH 对芦丁降解酶稳定性的影响与其活性影响的趋势一致。最适 pH 和最稳定 pH 为芦丁降解酶的分离纯化、催化反应及保存条件的选择提供了基础资料。本研究结果与唐宇等<sup>[5]</sup>和 Bourbouze 等<sup>[12]</sup>纯化的芦丁降解酶的最适 pH 值基本一致。

### 2.4.2 温度对芦丁降解酶活性和稳定性的影响

温度是影响酶活性的重要因素。如图 5 所示，芦丁降解酶在 20–70 °C 温度范围内均有活性，且活性呈先增高后降低的规律，在 50 °C 时活性最高，高于 50 °C 芦丁降解酶活性急剧下降。稳定性分析显示，预保温温度在 20–50 °C 范围内芦丁降解酶的活性无明显的变化，但当温度超过 60 °C 时酶的稳定性急剧下降，70 °C

预保温 2 h 酶的活性仅残留约 45%。唐宇等<sup>[5]</sup>和 Bourbouze 等<sup>[12]</sup>从荞麦籽粒中纯化的芦丁降解酶的最适温度分别为 40 °C 和 30 °C，与本实验结果存在较大的差异，很可能是由于研究对象属于不同的芦丁降解酶同工酶。

### 2.4.3 芦丁降解酶的 $K_m$ 值和 $V_{max}$ 值

测定芦丁降解酶在梯度底物浓度条件下的反应速度，根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算其  $K_m$  值和  $V_{max}$  值分别为 0.27 mmol/L 和 39.68 U/mg (图 6)。Baumgertel 等<sup>[13]</sup>报道的芦丁降解酶的  $K_m$  值和  $V_{max}$  值分别为 0.561  $\mu$ mol/L 和 44.69 U/mg，Yasuda 等<sup>[2]</sup>从苦荞籽粒中纯化的两种芦丁降解酶同工酶的  $K_m$  值分别为 0.12 mol/L 和 0.13 mol/L。该研究与前人报道的结果存在较大的差异，很可能是由于研究对象分别属于不同的芦丁降解酶同工酶。

### 2.4.4 金属离子和 EDTA 对芦丁降解酶活性的影响

金属离子对芦丁降解酶活性的影响与离子的种类和浓度有关 (表 2)。低浓度的金属离子即可对芦丁降解酶活性产生抑制，其中 10 mmol/L  $ZnCl_2$  对芦丁降解酶的抑制作用最强，残余酶活仅为 54.36%±2.70%；1 mmol/L  $CuSO_4$  对芦丁降解酶的抑制作用最弱，残余酶活为 89.47%±3.60%。此外，EDTA 对芦丁降解酶也有抑制作用。

### 2.4.5 甲醇对芦丁降解酶活性的影响

如图 7 所示，甲醇终浓度在 10%–50% (V/V) 范围内芦丁降解酶的活性几乎无明显变化，当甲醇终浓度大于 50% 时酶活性迅速下降，表明芦丁降解酶能够耐受 50% (V/V) 的甲醇，对甲醇有良好的耐受性。与陈芳霞<sup>[14]</sup>研究的芦丁降解酶对甲醇耐受性的结果相似。

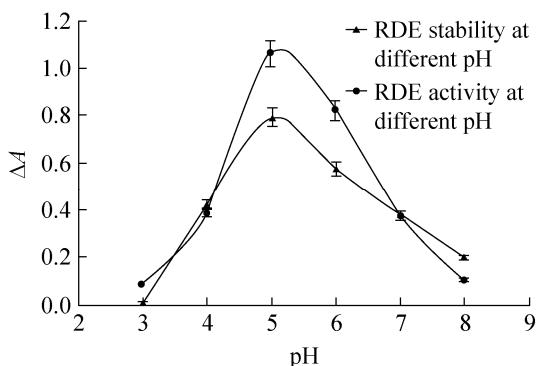


图4 pH对芦丁降解酶活性和稳定性的影响  
Fig. 4 Effect of pH on the RDE activity and stability.

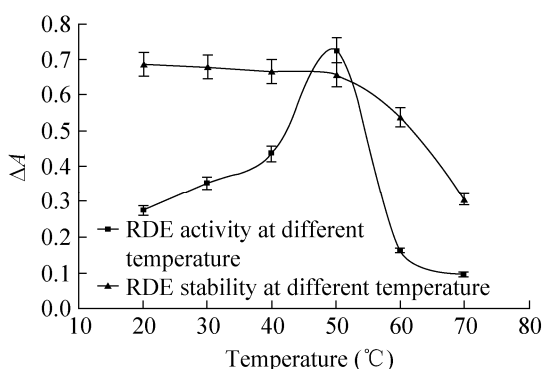


图5 温度对芦丁降解酶活性和稳定性的影响  
Fig. 5 Effect of temperature on RDE activity and stability.

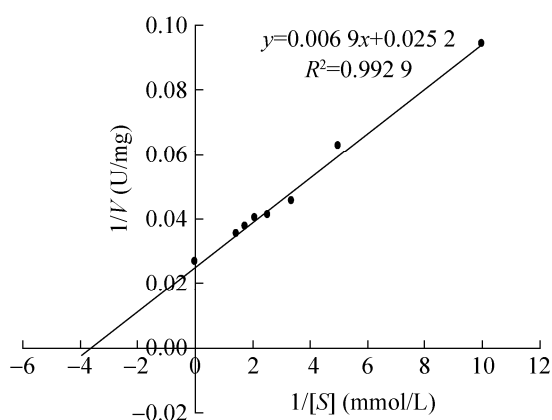


图6 Lineweaver-Burk 双倒数作图法测定芦丁降解酶的  $K_m$  和  $V_{max}$   
Fig. 6 Determination of the  $K_m$  and  $V_{max}$  of RDE by Lineweaver-Burk reciprocal plot graphic method.

表2 不同金属离子和 EDTA 对芦丁降解酶活性的影响

Table 2 Effect of different metal ions and EDTA on the RDE activity

Metal ion/ EDTA	Residual activity	
	Concentration 1 (1 mmol/L)	Concentration 2 (10 mmol/L)
MnCl <sub>2</sub>	74.01%±4.60%**	73.68%±5.30%**
ZnCl <sub>2</sub>	69.23%±3.90%**	54.36%±2.70%**
CuSO <sub>4</sub>	89.47%±3.60%*	83.87%±4.50%**
EDTA	76.32%±2.10%**	69.54%±1.40%**

Analysis of significant difference between enzyme activity with T test. Control: the activity of untreated RDE. \*: significant difference ( $P<0.05$ ); \*\*: extremely significant difference ( $P<0.01$ ).

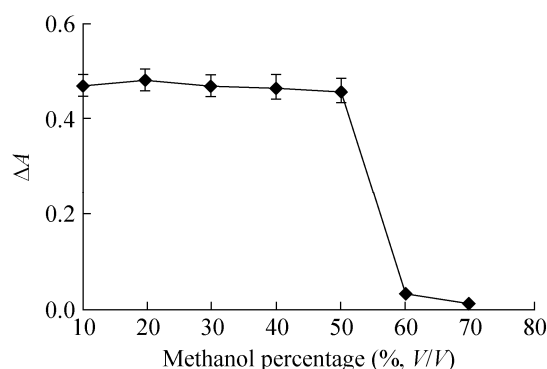


图7 甲醇对芦丁降解酶活性的影响  
Fig. 7 Effect of methanol on the activity of RDE.

### 3 讨论

芦丁降解酶是荞麦中重要的内源性糖苷酶，其特异性水解芦丁，是苦荞苦味的重要来源之一。Yasuda等<sup>[15]</sup>首先报道苦荞中的芦丁降解酶主要分布在子叶和种皮中，苦荞中芦丁降解酶的活性较普通荞麦高 680 倍。与荞麦芦丁代谢相关的酶的表达调控已有少量的文献报道。Suzuki 等对苦荞中的 3-黄酮醇-葡萄糖苷酶



活性及黄酮类化合物的含量进行了一系列研究,发现在苦荞和普通荞麦种子成熟过程中,3-芦丁-葡萄糖苷酶和3-异槲皮苷-葡萄糖苷酶活性增大,在完全成熟的种子中活性略有降低。芦丁和异槲皮苷浓度随种子成熟而增加,芦丁在完全成熟的种子中保持较高浓度<sup>[16]</sup>。UV-B辐射、干旱和低温胁迫的苦荞,其叶片中3-芦丁-葡萄糖苷酶活性分别增加了363%、158%和190%,芦丁含量变化分别为增加了122%、129%和无明显变化<sup>[17]</sup>。苦荞种子萌发后其子叶和种皮中的黄酮醇-3-葡萄糖苷酶活性下降,种子萌发12 d内芦丁含量逐渐增大,而槲皮素含量在种子萌发后立即增大,萌发后第4天达到峰值并在4–12 d基本保持不变<sup>[18]</sup>。国内王改玲<sup>[19]</sup>研究表明,苦荞籽粒萌发过程中芦丁含量增高,芦丁降解酶活性被抑制。陈鹏等<sup>[20]</sup>研究发现苦荞籽粒萌发过程中总黄酮含量增加,籽粒萌发3 d内种胚中的芦丁降解酶活性无明显变化,从第4天开始迅速下降,至胚被子叶完全吸收其活性消失,内种皮中的芦丁降解酶则在籽粒萌发过程中一直保持较高活性。周小理等<sup>[21]</sup>用磁场影响苦荞种子萌发,发现磁场处理3 d内芦丁降解酶的活性受磁场影响而增加,第4–7天其活性基本不受磁场影响,苦荞籽粒中类黄酮的含量也随磁场对芦丁降解酶(RDE)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和查尔酮异构酶(CHI)活性的影响而增加。以上研究显示,芦丁降解酶与苦荞次生代谢物的累积有着密切的关系。

Yasuda等<sup>[2]</sup>首次从苦荞种子中纯化了分子量为70 kDa的芦丁降解酶。国内唐宇等<sup>[5]</sup>和Cui等<sup>[6]</sup>从苦荞种子中纯化了分子量分别为60 kDa和70 kDa的芦丁降解酶。本实验室采用非变性

电泳结合Western blotting的方法证明在苦荞种子中至少存在5种芦丁降解酶的同工酶<sup>[7]</sup>。 $K_m$ 和 $V_{max}$ 以及温度和pH是表征酶特征的重要参数。唐宇等<sup>[5]</sup>和Bourbouze等<sup>[12]</sup>纯化的芦丁降解酶最适pH值和最适温度分别为pH 5.0、40 °C和pH 4.8、30 °C,且Baumgartel等<sup>[13]</sup>纯化的芦丁降解酶的 $K_m$ 值和 $V_{max}$ 值分别为0.561  $\mu\text{mol/L}$ 和44.69 U/mg。Yasuda等分离的芦丁降解酶粗酶液在pH 3.0–7.0范围内有活性,并在温度高于70 °C时失活<sup>[15]</sup>,其纯化的两种芦丁降解酶 $K_m$ 值分别为0.12 mol/L和0.13 mol/L<sup>[2]</sup>。本研究纯化的66 kDa芦丁降解酶最适pH值和最适温度分别为pH 5.0、50 °C,在pH 3.0–8.0和20–70 °C有活性, $K_m$ 值和 $V_{max}$ 值分别为0.27 mmol/L、39.68 U/mg。

已有的芦丁降解酶研究证明在苦荞中存在芦丁降解酶的同工酶形式,但研究并未获得芦丁降解酶的一级结构信息。本研究在纯化获得芦丁降解酶的基础上,通过N端测序和质谱分析获得了芦丁降解酶N端的氨基酸序列和15个内肽段的序列,为克隆芦丁降解酶的基因以及深入研究芦丁降解酶的生物学功能奠定了基础,也为通过分子手段培育高芦丁荞麦品种奠定了基础。

有机溶剂特别是极性有机溶剂是酶的强变性剂。不同酶对有机溶剂的敏感性存在较大的差异。Yasuda等<sup>[3]</sup>研究表明20% (V/V)的水溶性溶剂如乙醇、DMSO可提高芦丁降解酶活性。徐宝才等<sup>[22]</sup>研究发现芦丁降解酶在20%乙醇中活性最高。王改玲等<sup>[4]</sup>发现浓度高于40% (V/V)的乙醇对芦丁降解酶有明显的抑制作用。陈芳霞<sup>[14]</sup>研究发现芦丁降解酶在10%–40%的甲醇中活性

变化不明显, 50% (V/V) 的甲醇使其活性降低。本研究纯化获得的芦丁降解酶可以耐受 50% 的甲醇, 这种对有机溶剂的耐受性在酶学研究中鲜有报道, 对从蛋白质结构的角度深入探讨芦丁降解酶对有机溶剂耐受性的内在机制有着重要的理论价值, 同时为非水相体系中芦丁降解酶的催化活性的应用奠定基础。非水酶学是酶学发展的重要分支, 在非水相条件下一些酶可以完成水相条件下不能实现的催化反应, 并已展现出显著的生物催化优势。夏咏梅等<sup>[23]</sup>研究发现无溶剂非水相中脂肪酶能够高效催化葵酸偏甘油酯的合成, 且操作性和经济性远高于其他类型的葵酸偏甘油酯合成反应。Kansal 等<sup>[24]</sup>研究维斯假丝酵母 *Candida viswanathii* 全细胞参与的转化反应时, 发现加入异丙醇可使底物溶解度和转化率增大, 70 mmol/L 底物反应 1 h, 转化率增加了 81%。利用酶在微水有机溶剂、离子性液体和反胶束体系等非水相体系中催化生产食品添加剂, 如酸酯、糖酯和维生素等, 能够简化合成步骤, 降低成本和分离纯化的复杂性, 促进了食品添加剂的快速和可持续发展<sup>[25]</sup>。利用脂肪酶在有机溶剂中催化制备手性药物中间体, 可以完成在水相化学合成中难以进行的反应, 并且反应成本低、安全性好, 产物收率高、有良好的化学性能<sup>[26]</sup>。非水相条件下生物催化剂的活性及稳定性下降是酶的非水酶学应用的最大障碍, 筛选和提高耐有机溶剂的酶是非水相体系实践应用的重要前提<sup>[27]</sup>。本研究纯化获得的芦丁降解酶对极性有机溶剂表现出优异的耐受性, 对其非水相条件下催化特性的深入分析, 将有助于其在糖苷类次生代谢物转化中的应用, 特别是用于自然界稀有次生代谢物

的转化和合成。

本研究优化建立了苦荞籽粒 66 kDa 芦丁降解酶的纯化方法, 其  $K_m$  值和  $V_{max}$  分别为 0.27 mmol/L 和 39.68 U/mg, 最适 pH 和最适温度分别为 pH 5.0 和 50 °C。Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 和 EDTA 对其有不同程度的抑制作用。纯化的芦丁降解酶可耐受 50% (V/V) 的甲醇。获得了芦丁降解酶 N 端 15 个氨基酸序列和 15 个内肽段序列。部分一级结构的获得为确定芦丁降解酶的候选基因以及深入研究芦丁降解酶的生物学功能奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Fabjan N, Rode J, Košir IJ, et al. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(22): 6452–6455.
- [2] Yasuda T, Nakagawa H. Purification and characterization of the rutin-degrading enzymes in tartary buckwheat seeds. *Phytochemistry*, 1994, 37(1): 133–136.
- [3] Yasuda T, Shinoyama H. The activity of rutin-degrading enzyme in the presence of water-soluble organic solvents. *Nipp. Shok. Kaga Koga Kaishi*, 1995, 42(12): 1012–1018.
- [4] Wang GL, Zhou L, Liang R, et al. Effect of different extraction conditions on rutin hydrolysis of *fagopyrum tataricum* seeds. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2005, 25(5): 1035–1038 (in Chinese).  
王改玲, 周乐, 梁冉, 等. 不同提取条件对苦荞籽粒中芦丁降解的影响. *西北植物学报*, 2005, 25(5): 1035–1038.
- [5] Tang Y, Shao JR, Luo QL, et al. Purification of rutin degrading enzyme from wild buckwheat kernels. *J Sichuan Agric Univ*, 2011, 29(3): 391–396 (in Chinese).

- 唐宇, 邵继荣, 罗庆林, 等. 野生荞麦籽粒中芦丁降解酶的分离纯化. 四川农业大学学报, 2011, 29(3): 391–396.
- [6] Cui XD, Wang ZH. Preparation and properties of rutin-hydrolyzing enzyme from tartary buckwheat seeds. Food Chem, 2012, 132(1): 60–66.
- [7] Li YP, Deng DD, Zhang XB, et al. Direct detection of rutin-degrading isozymes with polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem, 2013, 443(2): 240–242.
- [8] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [9] Chen P, Gu JJ. A rapid measurement of rutin-degrading enzyme activity in extract of tartary buckwheat seeds. Food Bioprod Process, 2011, 89(1): 81–85.
- [10] Liu GQ, Wu W, Chen P. Current Experimental Techniques for Protein. Beijing: China Agricultural University Press, 2011: 138–142 (in Chinese).  
刘国琴, 吴玮, 陈鹏. 现代蛋白质实验技术. 北京: 中国农业大学出版社, 2011: 138–142.
- [11] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227(5259): 680–685.
- [12] Bourbouze R, Pratviel-Sosa F, Percheron F. Purification, properties and specificity of heteroglycosidase from buckwheat granis. Biochimie, 1974, 56: 1305–1313.
- [13] Baumgertel A, Grimm R, Eisenbeiß W, et al. Purification and characterization of a flavonol 3-O- $\beta$ -heterodisaccharidase from the dried herb of *Fagopyrum esculentum* Moench. Phytochemistry, 2003, 64(2): 411–418.
- [14] Chen FX. Gene polymorphisms, expression and characterization of rutin degrading enzyme from tartary buckwheat [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2016 (in Chinese).
- 陈芳霞. 苦荞芦丁降解酶基因多态性分析和蛋白重组表达及催化特性分析 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.
- [15] Yasuda T, Masaki K, Kashiwagi T. An enzyme degrading rutin in tartary buckwheat seeds. Nipp. Shok. Kaga Koga Kaishi, 1992, 39(11): 994–1000.
- [16] Suzuki T, Honda Y, Funatsuki W, et al. Purification and characterization of flavonol 3-glucosidase, and its activity during ripening in tartary buckwheat seeds. Plant Sci, 2002, 163(3): 417–423.
- [17] Suzuki T, Honda Y, Mukasa Y. Effects of UV-B radiation, cold and desiccation stress on rutin concentration and rutin glucosidase activity in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) leaves. Plant Sci, 2005, 168(5): 1303–1307.
- [18] Suzuki T, Kim SJ, Takigawa KS, et al. Changes in rutin concentration and flavonol-3-glucosidase activity during seedling growth in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). Can J Plant Sci, 2007, 87(1): 83–87.
- [19] Wang GL. Study on rutin and rutin-degrading enzymes in the seed of buckwheat[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2005 (in Chinese).  
王改玲. 苦荞籽粒中芦丁及芦丁降解酶的应用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [20] Chen P, Hou ZF. Metabolic profiles of rutin-degrading enzyme during seed germination process of tartary buckwheat. Acta Agric Boreal-Occident Sin, 2010, 19(7): 48–52 (in Chinese).  
陈鹏, 侯智法. 苦荞种子萌发过程芦丁降解酶的代谢规律. 西北农业学报, 2010, 19(7): 48–52.
- [21] Zhou XL, Fang X, Zhou YM, et al. Effect of magnetic field stimulation on flavonoid synthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) sprouts. Food Sci, 2012, 33(21): 20–23 (in Chinese).  
周小理, 方向, 周一鸣, 等. 磁场对苦荞种子萌

- 发过程中黄酮类物质的诱导效应. 食品科学, 2012, 33(21): 20–23.
- [22] Xu BC, Ding XL. Study on the extraction process of flavonoids from tartary buckwheat shell. *Sci Technol Food Ind*, 2002, 23(8): 40–43 (in Chinese).
- 徐宝才, 丁霄霖. 苦荞壳中黄酮提取工艺的研究. *食品工业科技*, 2002, 23(8): 40–43.
- [23] Xia YM, Fang Y, Zhang KC, et al. Synthesis of partial glycerol caprates by using lipase in nonaqueous media. *Chin J Biotech*, 2002, 18(6): 735–739 (in Chinese).
- 夏咏梅, 方云, 章克昌, 等. 非水相酶促合成癸酸偏甘油酯的研究. *生物工程学报*, 2002, 18(6): 735–739.
- [24] Kansal H, Banerjee UC. Enhancing the biocatalytic potential of carbonyl reductase of *Candida viswanathii* using aqueous-organic solvent system. *Bioresour Technol*, 2009, 100(3): 1041–1047.
- [25] Yu SL, Yu L, Yu B, et al. Advances in application of non-aqueous phase enzymatic catalysis in food additive production. *Agric Sci Technol*, 2013, 14(1): 169–175.
- [26] Zhao SX. Research progress of nonaqueous phase lipase in preparing chiral drug intermediates. *Chin Adhes*, 2015, 24(10): 53–58 (in Chinese).
- 赵世霞. 非水相中脂肪酶制备手性药物中间体的研究进展. *中国胶粘剂*, 2015, 24(10): 53–58.
- [27] Yang ZY, Ni Y, Sun ZH. Recent trend of nonaqueous enzymology and biocatalysis in nonaqueous media. *Chin J Biotech*, 2009, 25(12): 1779–1783 (in Chinese).
- 杨仲毅, 倪晔, 孙志浩. 非水酶学和非水相生物催化研究进展. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 1779–1783.

(本文责编 郝丽芳)