

苦荞芦丁水解酶的最适作用条件及 Cu²⁺ 对酶活性的抑制

崔晓东, 王转花*

(化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西大学生物技术研究所, 山西 太原 030006)

摘要:干燥的苦荞麦种子粉碎后经 20mmol/L 的醋酸盐缓冲液抽提, Resource Q 和 Superdex G75 HR 10/300 凝胶柱分离纯化, 得到一种芦丁水解酶, 测定该酶的最适作用条件, 研究 Cu²⁺ 对该酶的抑制作用。结果表明: 苦荞芦丁水解酶的分子质量约 70kD, 最适作用 pH 值为 5.0。反应体系选择 20% 乙醇时, 可保留酶的活性不被抑制, 当乙醇体积分数大于 50% 时, 对酶的活性抑制率达 90% 以上, 表明可选用低体积分数乙醇作为芦丁的溶剂, 用于芦丁水解酶测活体系及后续槲皮素制备研究。荧光光谱表明, Cu²⁺ 与芦丁水解酶以物质的量比 1:1 的形成稳定的复合物, 可以使酶的荧光发生猝灭, 水解芦丁的活性降低。表明 Cu²⁺ 对芦丁水解酶有抑制作用。

关键词: 苦荞; 芦丁; 槲皮素; 芦丁水解酶; 荧光光谱

Optimum Reaction Conditions for Rutin-Hydrolysis Enzyme (RHE) from Tartary Buckwheat Seeds and Inhibitory Effect of Cu²⁺ on Its Activity

CUI Xiao-dong, WANG Zhuan-hua*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, Institute of Biotechnology,
Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: A rutin-hydrolysis enzyme (RHE) was isolated from *Fagopyrum tataricum* (tartary buckwheat) seeds by extraction with 20 mmol/L acetate buffer acetate buffer, ammonium acetate fractionation, anion exchange chromatography and size exclusion chromatography. The molecular weight of RHE, as determined by SDS-PAGE, was 70 kD. The optimum hydrolysis pH was 5.0. The activity was not inhibited by an ethanol concentration of 20% in the reaction system, but an inhibitory rate above 90% was observed when ethanol concentration was higher than 50%. Fluorescence spectroscopic analysis indicated that Cu²⁺ could be bound to RHE at a molar ratio of 1:1 to generate a stable complex without fluorescence. Meanwhile, Cu²⁺ revealed an obvious inhibitory effect on the activity of RHE. These investigations provided a theoretical basis for future enzymatic preparation of quercetin.

Key words: tartary buckwheat; quercetin; rutin-hydrolysis enzyme; fluorescence spectrum

中图分类号: Q556.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0223-05

槲皮素(quercetin), 化学名为 3,3',4',5,7 - 五羟基黄酮(结构式见图 1), 是人类膳食中常见的类黄酮化合物之一, 属于黄酮化合物中的黄酮醇, 广泛存在于各种植物体中^[1-2]。近年来研究表明, 槲皮素具有多种生物活性, 如抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗自由基以及保护血管等多种生物活性。这些生物活性与其清除自由基

能力密切相关^[3]。槲皮素多以苷的形式(芦丁)存在于多种植物中, 如槐米、银杏叶、荞麦等, 槲皮素和芦丁相比, 有更强的生物活性^[4]。

近年来农业、医学及食品营养学等方面的研究表明, 荞麦特别是苦荞麦, 其营养价值居所有粮食作物之首, 不仅营养成分丰富、营养价值高, 而且含有其

收稿日期: 2011-09-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970611; 31171659); 山西省科技攻关计划项目(20100321101);

太原市大学生创新创业人才项目(110148025)

作者简介: 崔晓东(1980—), 男, 博士研究生, 研究方向为蛋白质化学与工程。E-mail: cxdg1999@sohu.com

* 通信作者: 王转花(1956—), 女, 教授, 博士, 研究方向为蛋白质化学与工程。E-mail: zhwang@sxu.edu.cn

他粮食作物所缺乏和不具有的特种微量元素及药用成分^[5-6]。荞麦也是唯一含有黄酮类物质的粮食作物,而且主要以芦丁的形式存在^[7]。在研究过程中发现,当采用低体积分数乙醇提取荞麦中黄酮类物质时,得到的黄酮类物质主要是槲皮素,而采用高体积分数乙醇提取时,得到的黄酮类物质主要是芦丁。因此荞麦中也存在着降解芦丁的糖苷酶,用以调控黄酮类物质的代谢。因此,本实验从荞麦种子中纯化得到一种将芦丁专一性水解为槲皮素的芦丁水解酶(rutin-hydrolysis enzyme, RHE),可以将芦丁专一性水解为槲皮素,而且转化效率较高^[8]。荞麦中的特征微量元素 Cu^[9],对植物的化学成分,酶的活性以及黄酮类物质的代谢可能起着重要的调控作用,本实验就黄酮类物质代谢中的关键酶——芦丁水解酶的最适作用条件,以及 Cu²⁺ 是否对该酶有抑制作用等进行研究,旨在为芦丁水解酶的工业化应用和芦丁、槲皮素的提取提供理论基础。

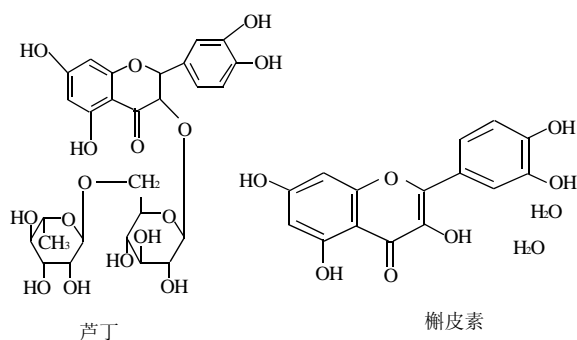


图1 芦丁和槲皮素的结构式
Fig.1 Structures of rutin and quercetin

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

苦荞麦种子为贵州威黑荞。

所用试剂均为分析纯。

Resource Q 柱、Superdex G75 HR 10/300 凝胶柱、ÄKTA™ Explore 美国 GE 公司; Gene Genius Bio Imaging System 美国 Syngene 公司; PAC200 电泳仪、Model 550 酶标仪 美国 Bio-Rad 公司; Mighty Small SE-245 型电泳槽 Amersham Pharmacia Biotech 公司; 立式高速冷冻离心机 日本三洋公司; 酸度计 德国 WTW 公司; 1525 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司。

1.2 芦丁降解酶的制备

将烘干的苦荞麦种子,脱壳粉碎后,称取 50g 粉末,加入 500mL 20mmol/L、pH5.0 的醋酸盐缓冲液,4℃抽提 24h,12000r/min 离心 20min 除去沉淀,在上清

中加入硫酸铵,使之饱和度达到 80%,在 4℃搅拌 4h。12000r/min 离心 20min,收集沉淀,用 30mL 20mmol/L、pH7.0 的 Tris-HCl 缓冲液重新溶解沉淀,并用同样缓冲液透析,除去硫酸铵,分装于 EP 管中于 -20℃ 的冰箱中保存备用。将上述制备的蛋白粗品上样于 Resource Q 柱,在 ÄKTA™ Explore 进行初步分离,收集洗脱峰并进行活性检测。将具有酶活性的蛋白样品,分批上样于 Superdex G75 HR 10/300 凝胶柱进一步分离纯化,采用 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱,控制流速在 0.5mL/min,收集各个洗脱峰进行酶活性分析。将纯化得到的芦丁水解酶进行蛋白浓度测定,分装于 1.5mL EP 管中备用。

1.3 SDS-PAGE 分析

按照 Laemmli 等^[10]的方法,用 SDS-PAGE 检测层析分离的各洗脱样品。分离胶为 12.5%,浓缩胶为 4%,以 Pharmacia 的低分子质量蛋白为标准,用考马斯亮兰 R-250 染色,据此可确定目的蛋白的分子质量。电泳结果采用 Gene Genius Bio Imaging System 拍照进行分析。

1.4 芦丁水解酶的最适作用条件

因为底物芦丁难溶于水,故采取不同体积分数的乙醇作为反应体系。将芦丁用无水乙醇溶解,配制成 1mg/mL 的芦丁储备液。反应体系总体积为 2mL,其中芦丁储备液 0.2mL,酶液 0.1mL,用蒸馏水或无水乙醇调节乙醇终体积分数为 10%~60%,在 37℃ 水浴中反应 10min 后,加入 2mL 无水乙醇终止反应,采用 HPLC 法测定槲皮素的生成量。另配制 pH3.0~10.0 的缓冲溶液(pH3.0~5.0 的醋酸盐缓冲液, pH6.0~7.0 的磷酸盐缓冲液, pH8.0~10.0 的 Tris-HCl 缓冲液),在 20% 乙醇条件中,37℃ 水浴中反应 10min, HPLC 测定槲皮素的生成量,确定芦丁水解酶的最适 pH 值。

HPLC 色谱条件: Waters 高效液相色谱仪, Breeze 工作站; 2487 紫外检测器; C₁₈ 柱(250mm × 4.6mm, 5μm); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸(体积比 50:50), 流速: 1mL/min, 进样体积: 20μL, 检测波长: 360nm, 柱温: 25℃。

1.5 荧光光谱分析

Cu²⁺ 与芦丁水解酶的结合实验在荧光光谱仪上进行,测定温度为 25℃ 和 37℃。吸取芦丁水解酶(0.1mg/mL) 700μL,加入 300μL Tris-HCl 缓冲液,配制成 1 × 10⁻⁶ mol/L 芦丁水解酶溶液。取 1mL 上述溶液于 1cm 石英比色池中,用微量加样器逐次加入 1~50μL 的 1 × 10⁻⁴ mol/L CuSO₄ 溶液进行荧光滴定,每次加入溶液后混合均匀,在相应温度下作用 2min,以 280nm 为激发波长,激发光狭缝为 10nm,发射光狭缝为 10nm,在荧光分光光度计上记录 295~500nm 波长范围内的发射光谱。实验中

所有的玻璃仪器及荧光比色皿均使用 1mol/L HNO_3 浸泡, 纯净水冲洗备用。按照王玲等^[11]描述的方法, 并以 338nm 波长处的荧光强度(F_0/F)与 Cu^{2+} 绘制 Stern-Volmer 图, 判定荧光猝灭类型。按照 Shi Yawei 等^[12]的方法, 将 338nm 波长处的荧光强度($F - F_0$)对 Cu^{2+} 与 RHE 物质的量比($[\text{Cu}^{2+}] / [\text{RHE}]$)作图, 判断 Cu^{2+} 与 RHE 的结合位点数。 F_0 为只有芦丁水解酶时反应体系的 338nm 波长处的荧光强度; F 为滴加 Cu^{2+} 后的反应体系在 338nm 波长处的荧光强度。

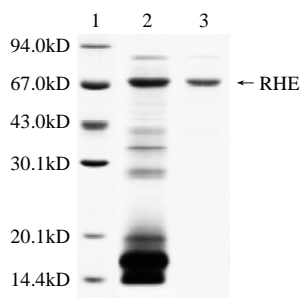
1.6 Cu^{2+} 对芦丁水解酶的抑制作用

Cu^{2+} 与芦丁水解酶分别按物质的量比 0.5:1、1:1 和 2:1, 在 37℃ 作用 10min, 然后加入到含有 20% 乙醇, pH5.0 的反应体系中, 在 37℃ 水浴中反应 10min, 加入和反应体系相同体积的无水乙醇终止反应, 应用 HPLC 法测定槲皮素的生成量, 根据槲皮素的生成量来计算 Cu^{2+} 对芦丁水解酶的抑制率。

2 结果与分析

2.1 芦丁水解酶的分子质量

经 20mmol/L 的醋酸盐缓冲液(pH5.0)抽提得到的蛋白粗提物, 进一步在 Resource Q 阴离子交换层析和 Superdex G75 分子筛层析两步分离后, 得到目的蛋白-芦丁水解酶。SDS-PAGE 分析结果显示(图 2), 芦丁水解酶的分子质量为 70kD 左右, 且纯化的芦丁水解酶纯度达到 95% 以上, 适合下一步的活性分析及性质鉴定。



1. 标准蛋白分子质量; 2. 芦丁水解酶粗品; 3. 纯化的芦丁水解酶。

图 2 SDS-PAGE 分析芦丁水解酶的分子质量

Fig.2 SDS-PAGE analysis of RHE

2.2 芦丁水解酶的最适作用条件

考虑到芦丁在水中的溶解度较低, 故选择不同体积分数的乙醇作为反应体系进行一系列实验。从图 3A 可以看出, 在 37℃、乙醇体积分数范围为 10%~20% 时, 乙醇对芦丁水解酶的活性几乎没有影响。当乙醇体积分数增至 30% 时, 相对酶活力为 85%; 乙醇体积分数达到 50% 时, 芦丁水解酶相对酶活性仅剩 10% 左右。说

明低体积分数乙醇对酶的活性没有影响, 高体积分数的乙醇对酶的活力有较强的抑制作用。图 3B 为不同 pH 值条件对芦丁水解酶的影响, 当 pH 值为 5.0 时, 芦丁水解酶的活性最强, 在 pH 值大于 5.0 或小于 5.0 的情况下, 芦丁水解酶的活性均有不同程度的降低, 当 pH 值大于 9.0 时, 芦丁水解酶的相对酶活力只有不到 10%。此结果表明芦丁水解酶的最适 pH 值为 5.0。

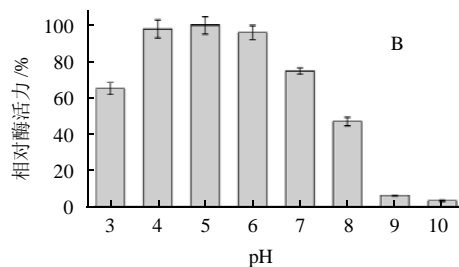
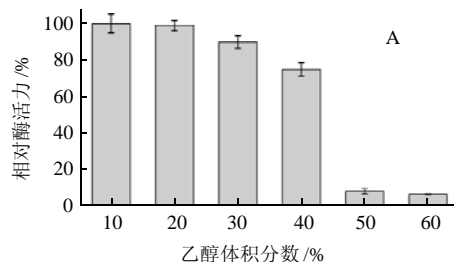
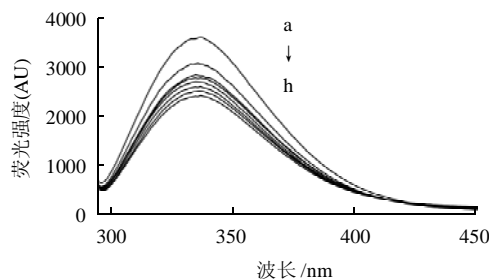


图 3 不同体积分数乙醇(A)和 pH 值(B)对芦丁水解酶活性的影响

Fig.3 Effects of ethanol concentration and pH on the activity of RHE

2.3 Cu^{2+} 与芦丁水解酶的相互作用

2.3.1 荧光光谱



a~h. Cu^{2+} 浓度分别为 0、 1.0×10^{-6} 、 2.0×10^{-6} 、 4.0×10^{-6} 、 8.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 、 1.5×10^{-5} 、 2.0×10^{-5} mol/L。

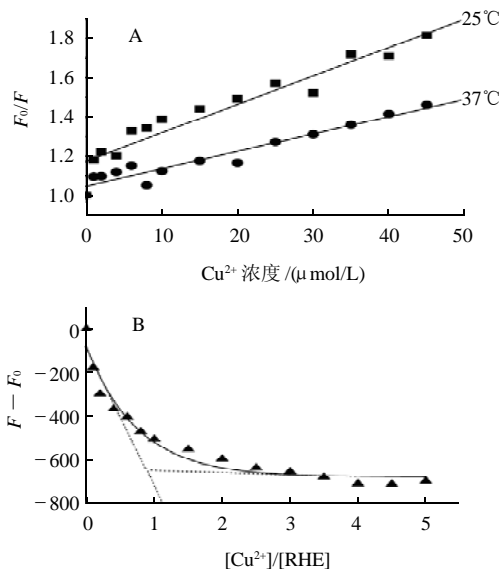
图 4 芦丁水解酶的荧光发射光谱

Fig.4 Fluorescence emission spectra of RHE in the presence of Cu^{2+}

以 280nm 为激发波长, 固定芦丁水解酶的荧光值, 逐渐增加 Cu^{2+} 的浓度, 由图 4 可知, 芦丁水解酶的

源荧光均有规律地降低,而荧光的最大发射峰位置未发生明显的位移。

2.3.2 猝灭机理判定及结合位点数的确定



A. 不同温度条件下 Cu^{2+} 对芦丁水解酶荧光猝灭 Stern-Volmer 图; B. Cu^{2+} 与芦丁水解酶结合位点数的确定。

图5 Cu^{2+} 对芦丁水解酶的荧光猝灭机理

Fig.5 Fluorescence quenching mechanism of RHE in the of Cu^{2+}

由图 5A 看出,随着温度的升高, RHE 与 Cu^{2+} 反应的猝灭曲线斜率降低,判定 Cu^{2+} 对 RHE 的猝灭过程为静态猝灭, Cu^{2+} 与 RHE 之间形成了稳定的复合物。由图 5B 可见,随着 Cu^{2+} 浓度的滴加,荧光强度在 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{RHE}] < 1$ 之前基本呈线性减小,表明在这部分的滴定中加入的 Cu^{2+} 完全与芦丁水解酶结合; $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{RHE}] > 1$ 后,荧光强度随着 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{RHE}]$ 的增加而减少的程度逐渐减低。当 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{RHE}] > 5$ 以后, Cu^{2+} 与 RHE 的结合达到饱和状态,起始的直线与饱和时的直线交于 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{RHE}] = 1.15$,表明 Cu^{2+} 与 RHE 之间形成物质的量比 1:1 的络合物。

2.4 Cu^{2+} 对芦丁水解酶的抑制作用

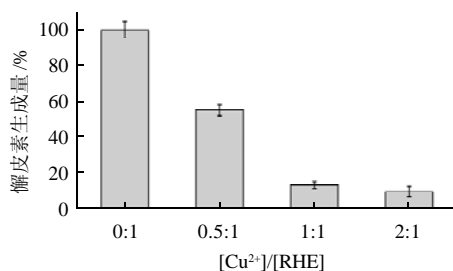


图6 Cu^{2+} 对芦丁水解酶的抑制作用

Fig. 6 Inhibitory effect of Cu^{2+} on the activity of RHE

由图 6 可知,当 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{RHE}]$ 为 0.5:1 时,槲皮素生成量为 55%,芦丁降解酶的活性被抑制达到 45%,当 $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{RHE}]$ 为 1:1 或者比例大于 1:1 时,槲皮素生成量仅为 10%,芦丁降解酶的活性被抑制达到 90%。结果表明, Cu^{2+} 对芦丁水解酶的活性有较强的抑制作用。

3 讨论

荞麦是一种药食同源的作物,而黄酮类物质是荞麦的主要药用成分。尤其是苦荞麦,其种子中所含的黄酮类物质是普通荞麦(甜荞)的 10 倍以上^[7]。芦丁水解酶可以特异的将芦丁水解为槲皮素,是荞麦种子中黄酮类物质降解代谢的关键酶,对荞麦种子的品质好坏起着重要的调控作用。体外研究芦丁水解酶的作用条件为芦丁及槲皮素的提取及应用提供了参考。荞麦中的槲皮素主要以苷的形式(芦丁)存在,芦丁水解酶的活性决定了提取的黄酮类物质的主要成分。当在高温,高体积分数的乙醇条件下,芦丁水解酶活性被抑制,提取到的黄酮类物质的主要成分是芦丁;当在低温,低体积分数的乙醇条件下,芦丁水解酶活性未被抑制,提取到的黄酮类物质的主要成分是槲皮素。芦丁和槲皮素的提取方法不尽相同,所以测定的芦丁和槲皮素的含量也差别较大。因为芦丁水解酶在不同的提取条件下活性差别很大,因此不同条件得到的芦丁或者槲皮素的含量不能真实反映其在种子中的含量。对芦丁水解酶的作用条件做详细的研究,将有助于理解黄酮类物质的代谢过程。

槲皮素是一种公认的具有抗癌活性的活性成分^[13]。但是槲皮素大多以其糖苷的形式存在。市场上已有的生产槲皮素的方法,大多采用化学的方法,将芦丁酸解为槲皮素,这些方法制备的槲皮素不仅产率低,而且纯度不高,不适于对其生物活性做进一步的研究以及医药方面的发展。目前,已有利用微生物对芦丁进行转化的报道,但是整体转化率不高^[14-15]。本实验通过研究苦荞芦丁水解酶的最适作用条件,确定反应体系为 20% 乙醇时,可保留酶的活性不被抑制,当乙醇体积分数大于 50% 时,酶的活性受到了不同程度抑制。同时也提示采用有机溶剂提取不同生物资源类黄酮时,可选用低体积分数的乙醇作为溶剂,不仅保留了芦丁水解酶的活性。而且可直接获得生物活性最强的槲皮素。采用该研究方法转化制备槲皮素,条件温和,环境污染少,研究内容可为酶法制备槲皮素提供理论支持。

参考文献:

- [1] HODEK P, TREFIL P, STIBOROVA M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450

- [J]. Chem Biol Interact, 2002, 139(1): 1-21.
- [2] HIDALGO M, SANCHEZ-MORENO C, PASCUAL-TERESA S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2010, 121: 691-696.
- [3] GABERSCIK A, VONCINA M, TROST T, et al. Growth and production of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) treated with reduced, ambient, and enhanced UV-B radiation[J]. J Photochem Photobiol B, 2002, 66 (1): 30-36.
- [4] HERRERA M C, LUQUE de CASTRO M D. Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 379(7/8): 1106-1112.
- [5] 王炜, 欧巧明, 杨随庄. 苦荞麦化学成分及生物活性研究进展[J]. 杂粮作物, 2010, 30(6): 419-423.
- [6] 许文涛, 张方方, 罗云波, 等. 荞麦水溶性多糖的分离纯化及其分子量的测定[J]. 食品科学, 2009, 30(13): 22-24.
- [7] FABJAN N, RODE J, KOSIR I J, et al. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(22): 6452-6455.
- [8] CUI Xiaodong, WANG Zhuanhua. Preparation and properties of rutin-hydrolyzing enzyme from tartary buckwheat seeds[J]. Food Chemistry, 2012, 132: 60-66.
- [9] 苟君波, 胡洪利, 吴琦, 等. 荞麦中金属元素的主成分和聚类分析[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 318-321.
- [10] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [11] 王玲, 屈凌波, 杨冉, 等. 槲皮素和芦丁与牛血清白蛋白相互作用研究[J]. 分析科学学报, 2006, 22(6): 719-722.
- [12] SHI Yawei, ZHANG Lei, YUAN Jingming, et al. Zinc binding site in PICK1 is dominantly located at the CPC motif of its PDZ domain[J]. J Neurochem, 2008, 106(3): 1027-1034.
- [13] OKAMOTA T. Safety of quercetin for clinical application[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2005, 16(2): 275-278.
- [14] HAY G W, WESTLAKE D W, SIMPSON F J. Degradation of rutin by *Aspergillus flavus*. Purification and characterization of rutinase[J]. Can J Microbiol, 1961, 7: 921-932.
- [15] HATTORI S, NOGUCHI I. Microbial degradation of rutin[J]. Nature, 1959, 184(Suppl 15): 1145-1146.