

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201903024

张睿哲, 徐龙权, 宋建国, 等. 人参皂苷 Rb3 糖基水解酶的纯化及其反应特性 [J]. 广西植物, 2020, 40(5): 706–714.
ZHANG RZ, XU LQ, SONG JG, et al. Purification and reaction characteristics of hydrolyzed ginsenoside Rb3-glycosylase [J]. Guihaia, 2020, 40(5): 706–714.

人参皂苷 Rb3 糖基水解酶的纯化及其反应特性

张睿哲, 徐龙权, 宋建国, 鱼红闪*

(大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要: 人参皂苷 Rb3 是三七茎叶皂苷的主要成分。为了充分利用廉价的三七茎叶皂苷, 该研究以微生物 *Aspergillus* sp. P90r 菌为对象, 综合运用生物转化的方法, 经过提取、分离纯化和酶活力测定等步骤, 最终以确定酶反应途径的方式得到了所产的特异性人参皂苷 Rb3 糖基水解酶的相关性质和动力学等反应特性。结果表明: 该酶比 *Absidia* sp. GRB3-X8r 菌产酶活力高 15%~25%, SDS-PAGE 电泳结果测得分子量约为 65.6 ku, 纯化后酶蛋白的含量为 $0.237 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 蛋白比活力可达到 $169 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 纯化倍数为 13.70, 回收率为 9.39%。人参皂苷 Rb3 糖基水解酶在 pH=5.0 的偏酸性环境下酶活力很高, 最适反应条件: pH=3.0~5.0, 温度 45 °C, 其中在 pH=4.0~6.0 范围内相对稳定。该酶在 20 min 时进入混合级反应, 酶反应米氏常数 K_m 值为 $8.77 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, V_{\max} 为 $57.44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 在 60 min 时反应速度达到最大, V_{\max} 趋于稳定, 为 $66.63 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。通过对酶的催化特性研究表明, 该酶先水解 Rb3 的 20-O-木糖基, 其次水解 3-O-葡萄糖基, 最终催化反应产物中有 F2 和 C-K 生成。综上结果, 微生物 *Aspergillus* sp. P90r 菌酶具有能水解人参皂苷 Rb3 木糖基和葡萄糖基的特异性。

关键词: 人参皂苷 Rb3, 人参皂苷 Rb3 糖基水解酶, 酶学性质, 酶分离纯化, 酶促反应动力学

中图分类号: Q814.1 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)05-0706-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Purification and reaction characteristics of hydrolyzed ginsenoside Rb3-glycosylase

ZHANG Ruizhe, XU Longquan, SONG Jianguo, YU Hongshan*

(College of Biology Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China)

Abstract: Hydrolyzed ginsenoside Rb3 is the main component of *Panax notoginseng* stem and leaf saponins. In order to make full use of cheap *P. notoginseng* stem and leaf saponins, the microorganism *Aspergillus* sp. P90r was studied, and we used the biotransformation methods comprehensively. Related properties, kinetics and other reaction characteristics of the specific ginsenoside Rb3-glycosylase were produced by determining the way of enzymatic reaction through extraction, separation, purification, enzyme activity determination and other steps. The results were as follows: This enzyme activity

收稿日期: 2019-04-30

基金项目: 国家高端外国专家项目(GDT20152100019) [Supported by the National Foreign Expert Program(GDT20152100019)].

作者简介: 张睿哲(1993-), 男, 辽宁锦州人, 硕士研究生, 主要从事天然产物生物转化研究, (E-mail) 445903705@qq.com。

*通信作者: 鱼红闪, 教授, 博士研究生导师, 主要从事天然产物生物转化研究, (E-mail) hongshan@dipu.edu.cn。

was 15%–25% higher than the enzyme by *Absidia* sp. GRB3-X8r. The result of the molecular weight of enzyme protein was 65.6 ku by SDS-PAGE electrophoresis. The content of enzyme protein was $0.237 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ after purification, the specific activity of the protein was attainable as $169 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, the purification factor was 13.70 and the recovery rate was 9.39%. And the enzyme activity of ginsenoside Rb3-glycosylase was higher in the pH 5.0 of acidic environment. The enzyme was suitable condition in the range of pH 3.0–5.0, in the temperature of $45 \text{ }^\circ\text{C}$, and it was relative stable in the range of pH 4.0–6.0. The enzyme entered the mixed-order reaction at 20 min, and the results of the enzyme reaction kinetics showed that the K_m value was $8.77 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and V_{\max} was $57.44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. The reaction rate reached the maximum at 60 min, and the speed tended to be stable, and V_{\max} was $66.63 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. The results on catalytic properties of enzymes showed that the enzyme firstly hydrolyzes 20-*O*-xylose of ginsenoside Rb3, secondly hydrolyzes 3-*O*-glucosyl, eventually which the catalytic reaction products include the formed substance of F2 and C-K. In summary, the microbial *Aspergillus* sp. P90r enzyme has the specificity to hydrolyzed ginsenoside Rb3-xylose and Rb3-glucose.

Key words: hydrolyzed ginsenoside Rb3, hydrolyzed ginsenoside Rb3-glycosylase, enzyme properties, isolation and purification, enzyme kinetics

我国高产量的人参属植物是人参 (*Panax ginseng*)、三七 (*P. notoginseng*)、西洋参 (*P. quinquefolus*) 等, 其人参属植物中化学成分比较复杂, 主要的有效活性物质是人参皂苷 (宋亚会和姜晓军, 2009)。其主要活性成分为人参皂苷 Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、Re、Rg1 等 (金凤燮, 2009)。目前, 已分离鉴定出 182 种人参皂苷 (Kim et al., 2017)。现代药理学研究发现, 某些稀有人参皂苷具有很好的药理和临床方面的疗效。因此, 利用生物转化法, 用含量较高的人参皂苷为底物, 获得产量大、纯度高的稀有人参皂苷, 具有非常重要的科研意义和社会价值 (张怡轩等, 2008; 吴红金和刘宇娜, 2008; Jia, 2009; Jin et al., 2012; 居乃香和孙静, 2014; 韩淑娴和游云, 2016; 毛柳璐, 2017)。

三七茎叶皂苷以 Rb3 为主, Rb3 分子带有 20-*O*-Xyl-Glc-糖链和 3-*O*-Glc-Glc-糖链, 活性低、难吸收, 因此三七茎叶利用率低 (金凤燮, 2009)。为了提高三七茎叶皂苷的利用价值, 将 Rb3 转化为高活性、低糖基的 F2、C-K 皂苷, 是提高三七茎叶皂苷利用度的可行途径。为此, 本实验室研究了 Rb3 的生物转化, *Aspergillus niger* g.48 菌产人参皂苷酶 I 型 (分子量为 74 kD), 同时水解 Rb3 的 20-*O*-木糖基和 3-*O*-葡萄糖基, 通过 Rb3→C-Mx1→C-Mx→C-K 途径和 Rb3→Rd→F2→C-K 的两个途径水解 Rb3 (Liu et al., 2014); 还有 *A. niger* g.848 菌所产的人参皂苷酶 I 型 (分子量为 75kD), 水解 Rb3 的糖基, 生成 Rd、F2、C-K 等皂苷 (Liu et al.,

2015); 但上述两种 *A. niger* 所产的人参皂苷酶水解的三七茎叶皂苷主要生成人参皂苷 C-Mx 和 C-K, 并有越南参皂苷 R7 和三七参皂苷 Fc 残留, 说明 *A. niger* 菌产酶与三七茎叶复合皂苷反应时, 很难水解 C-Mx 或 Rb3 皂苷的 20-*O*-末端木糖基, 对 R7 和 Fc 皂苷的 3-*O*-末端木糖基无水解作用, 影响了高活性皂苷 C-K 的产率。为了解决酶很难水解三七茎叶皂苷的木糖基问题, 赵信平等 (2018) 研究了 *Absidia* sp. GRB3-X8r 菌产特异性人参皂苷 Rb3 木糖苷酶 (分子量 66.7 kDa), 但是该酶仅能水解 Rb3 的 20-*O*-木糖基, 欠缺进一步水解 3-*O*-葡萄糖基生成 F2 的酶活力。因此, 本文利用生物转化法研究另一种微生物 *Aspergillus* sp. P90r 菌所产的人参皂苷 Rb3 糖基水解酶, 以期获得纯酶的相关性质和动力学等反应特性。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂和仪器

Aspergillus sp. P90r 菌, 本实验室从大曲中筛选分离得到。人参皂苷 Rb3、Rd、F2、C-K, 由天乐集团提供。标准蛋白 (齐威等, 2005), 购于大连宝生物公司。柠檬酸、过硫酸铵为天津市大茂化学试剂厂产品; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺为北京化工厂产品; 甘氨酸、溴酚蓝、考马斯亮兰 G250、四甲基乙二胺 (TEMED) 购置于国药集团化学试剂有限公司; 十二烷基硫酸钠为北京鼎国生物技术发

展中心产品;以上试剂均为分析纯试剂。

薄层层析板 Silica gel 60-F254, 德国 Merck 公司产品; DEAE-Cellulose DE-52, 英国 Whatman 公司产品; CS930 双波长薄层扫描仪购置于日本津岛公司; BSZ-160 自动部分收集器由上海金生达生化仪器有限公司提供; 蛋白质电泳仪购置于 Bio-Rad 公司; Waters 2695 高效液相色谱仪; Waters 2996 PDA 光电二极管阵列检测器; Knauer C18 色谱柱 (5 μm , 3 mm \times 250 mm)。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的制备 *Aspergillus* sp. P90r 菌接种于含 5% 的麦汁、1% 的三七茎叶浸出液, pH = 6.6 的察氏培养基中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 5~6 d; 离心除菌体, 上清液中缓慢加入已研磨好的硫酸铵粉末至 80% 饱和度, 摇匀, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 6 h; 离心收集蛋白质沉淀。将沉淀溶于少量的 0.01 mol \cdot L⁻¹ pH=3.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 透析, 每 2 h 更换一次缓冲液, 透析 20 h; 离心除杂, 沉淀溶于 0.02 mol \cdot L⁻¹ pH3.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中, 即为粗酶液。

1.2.2 酶活力的测定 取 0.1 mL 的 0.2% 的人参皂苷 Rb3 (0.02 mol \cdot L⁻¹, pH3.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液) 与 0.1 mL 粗酶液混合, 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 24 h, 加入 0.2 mL 水饱和正丁醇终止酶反应, 取上层有机相作 TLC 薄层层析或 HPLC 检测。酶活力单位, 定义为每小时降解 1 mmol Rb3 酶量为一个酶活力单位。

1.2.3 薄层层析 (TLC) 酶水解人参皂苷 Rb3 生成产物用 TLC 方法测定。展开剂为 V(氯仿): V(甲醇): V(水) 的比例为 7:3:0.5, 展开后用 10% H₂SO₄ 水溶液, 于 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热显色。TLC 检测图中的各组分的百分含量, 利用 Bandscan 分析软件分析 (Liu et al., 2015)。

1.2.4 高效液相色谱 (HPLC) 色谱条件: 色谱仪, Waters 2695 高效液相色谱分析仪, Waters 2996 PDA 光电二极管阵列检测器及 Empower 色谱工作站进行检测。色谱柱: Knauer C18 柱; 流动相: 乙腈 (A)-水 (B); 0~20 min, 20% A 等度; 20~31 min, 20% A~32% A 线性梯度; 31~40 min, 32% A~43% A 线性梯度; 40~70 min, 43% A~100% A 线性

梯度; 进样量: 10 μL ; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 体积流速: 0.6 mL \cdot min⁻¹; 检测波长: 203 nm。

1.2.5 酶的分离纯化 先向 DEAE-cellulose DE52 阴离子交换柱中缓慢上样 6 mL 粗酶液, 进行分离提纯。再配制由 20 mmol \cdot L⁻¹ pH3.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲体系溶液溶解的浓度为 40、50、60、70、80、90、100 mmol \cdot L⁻¹ 的 KCl 溶液, 对上样后的粗酶液进行梯度洗脱, 每一梯度洗 100 mL, 控制流速为 1 mL \cdot min⁻¹, 用自动部分收集器, 大约每 3 mL 收集 1 试管洗脱液; 收集酶液与 0.1% Rb3 反应, TLC 检测, 筛选出含有 Rb3 糖基水解酶活力的洗脱液。

1.2.6 蛋白质分子量的测定 将含有酶活力的洗脱液, 做 SDS-PAGE 电泳, 确定产生单一条带的试管, 同时计算人参皂苷 Rb3 糖基水解酶的分子量 (李建武, 1997)。SDS 聚丙烯酰胺凝胶的浓缩胶和分离胶分别为 5% 和 12%, 电压分别为 60 V 和 120 V。

1.2.7 人参皂苷 Rb3 糖基水解酶最佳反应条件 测定最佳 pH: 分别配制 pH 值为 1.3、2.2、3、4、5、6、7、8、9、10 的缓冲溶液, 将 0.1% 的人参皂苷 Rb3 溶于不同 pH 值的缓冲溶液中, 每个 pH 值底物溶液与同 pH 值的酶液等体积均匀混合, 在适宜的条件下做酶促反应, 用 TLC 法检测人参皂苷 Rb3 的水解情况。确定 pH 稳定性: 取纯化酶液与不同 pH 值的缓冲液等量混合, 室温下放置 30 min, 加入人参皂苷 Rb3 底物溶液, 于酶的最适 pH 值反应体系中检测酶活力, 以未经处理过的酶活力作为 100% 计算相对酶活力。确定最佳反应温度: 在上述反应条件下, 采用 35、40、45、50、55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行酶催化反应。确定最佳反应时间: 在最佳反应温度下, 将酶液与底物溶液分别反应 1/6、1/3、1/2、1、2、4、8、12、24 h, 用 TLC 法检测人参皂苷 Rb3 的水解情况。

1.2.8 酶反应动力学 配制浓度分别为 14.3、16.7、20.0、25.0、33.0、50.0 mmol \cdot L⁻¹ 的 Rb3 底物溶液与等体积纯酶液混合, 最终浓度分别为 7.15、8.35、10.0、12.5、16.5、25.0 mmol \cdot L⁻¹ 的 Rb3 底物溶液; 于 45 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5、10、20、40、60、90、120、180 min 后, 对 Rb3 反应产物做 TLC 检测, 利用分析

TLC 版皂苷斑点中 Rb3 的降解量, 确定 Rb3 各底物浓度在 5、10、20、40、60 min 时的 Rb3 酶反应初速度 (平均值)。根据酶反应初速度, 作 Lineweaver-Burk 曲线 (齐崑等, 2001; 张华新等, 2006; 陈娇娇等, 2011; 史刘辉等, 2012):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

通过所得到的直线方程可以得到横轴的截距 $-1/K_m$, 纵轴的截距 $1/V_{\max}$, 即可计算出 K_m 和 V_{\max} 值, 将结果代入得 Michaelis-Menten 方程。此为酶反应工程设计提供依据。

1.2.9 以 pNP 为底物的酶活性测定 以对硝基苯酚单糖苷 (pNP- α -D-Gal、pNP- β -L-Ara、pNP- α -L-Rha、pNP- β -D-Xyl、pNP- β -D-Glu) 为底物, 含有 400 μ L 的 0.08 mmol \cdot L⁻¹ 的 pNP 底物溶液, 与酶样品 100 μ L 混合, 45 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后加入 5 mL 1 mol \cdot L⁻¹ Na₂CO₃ 终止反应, 测定 405 nm 下的吸光值。酶活力定义为单位时间内释放 1 μ mol 硝基苯酚的酶量为一个酶活力单位。

2 结果与分析

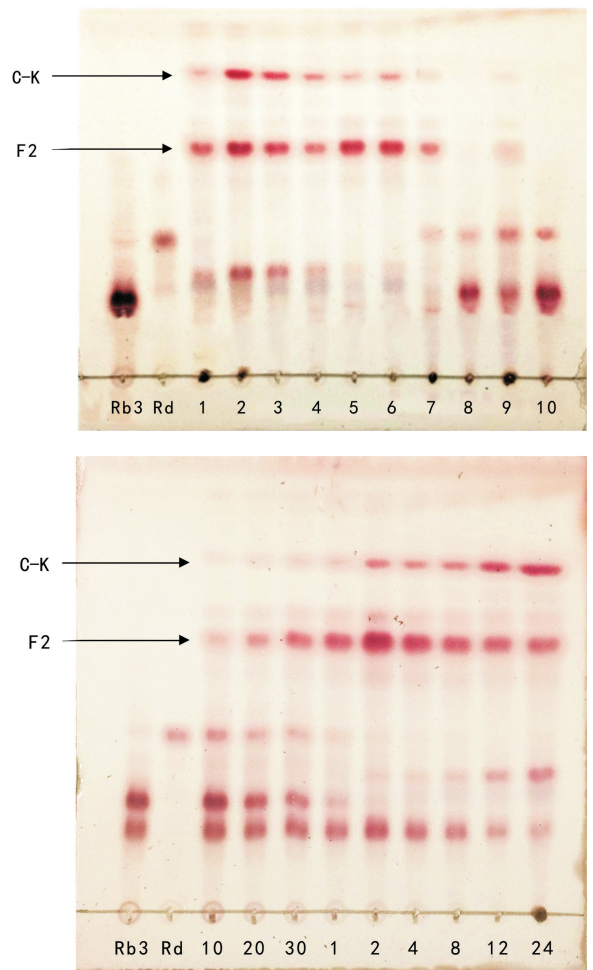
2.1 粗酶液的制备

由 *Aspergillus* sp. P90r 菌接种得到的粗酶液, 在 Rb3 浓度 0.01% ~ 0.5% 范围内, 均能转化为 Rd、F2 和 C-K。最佳反应温度为 45 $^{\circ}$ C, 最佳反应时间 2 h, pH 值在 1.3 至 6.0 的状态下反应效果较好, 酶反应最佳 pH 为 3.0 ~ 5.0, 而在 pH4.0 ~ 6.0 范围内相对稳定, 其中在 pH5.0 的偏酸性环境下稳定性最高, 如图 1 和图 2 所示。

经三次实验结果表明, *Aspergillus* sp. P90r 菌产酶活力, 在相同条件下比文献中的 *Absidia* sp. GRB3-X8r 菌产酶活力, 提高了 15% ~ 25%。

2.2 酶的分离纯化

将上述粗酶液经 DEAE-Cellulose DE52 离子交换柱洗脱, 收集的第 81、93、94、95 试管, 具有将人参皂苷 Rb3 水解生成人参皂苷 Rd、F2 和 C-K 的高酶活力。因此对第 81、93、94、95 管的酶液进行 PAGE 电泳, 结果第 93、94 管酶基本为电泳单带; 将上述电泳单带的酶蛋白切胶回收, 进一步采用



Rb3, Rd, Rb1, F2, C-K. 人参皂苷标准品; 1-10. pH 值; 10-24. 反应时间。

Rb3, Rd, Rb1, F2, C-K. Hydrolyzed ginsenoside standard; 1-10. Value of pH; 10-24. Reaction time.

图 1 pH 和时间对人参皂苷 Rb3 糖基水解酶粗酶液反应的影响

Fig. 1 Effects of pH and time on hydrolyzed ginsenoside Rb3-glycosylase enzymatic reaction

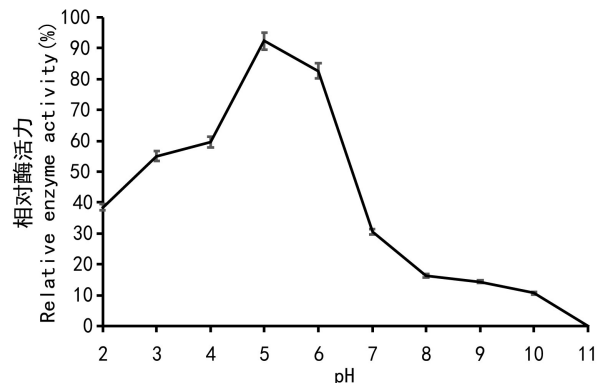


图 2 人参皂苷 Rb3 糖基水解酶 pH 值稳定性

Fig. 2 Stability of pH value of the hydrolyzed ginsenoside Rb3-glycosylase

表 1 人参皂苷 Rb3 糖基水解酶纯化结果

Table 1 Purification result of hydrolyzed ginsenoside Rb3-glycosylase

样品 Sample	体积 Volume (mL)	总酶活性 Total enzyme activity (U)	总蛋白含量 Total protein content (mg)	提纯倍数 Purification multiple	回收率 Recovery rate (%)
粗酶液 Crude enzyme solution	100	1 320	129.60	1.00	100.00
硫酸铵沉淀后酶液 Enzyme solution precipitated by ammonium sulfate	10	490	39.72	1.21	37.12
DEAE-Cellulose DE52 处理后酶液 Enzyme solution treated with DEAE-Cellulose DE52	6	248	1.42	13.70	9.39

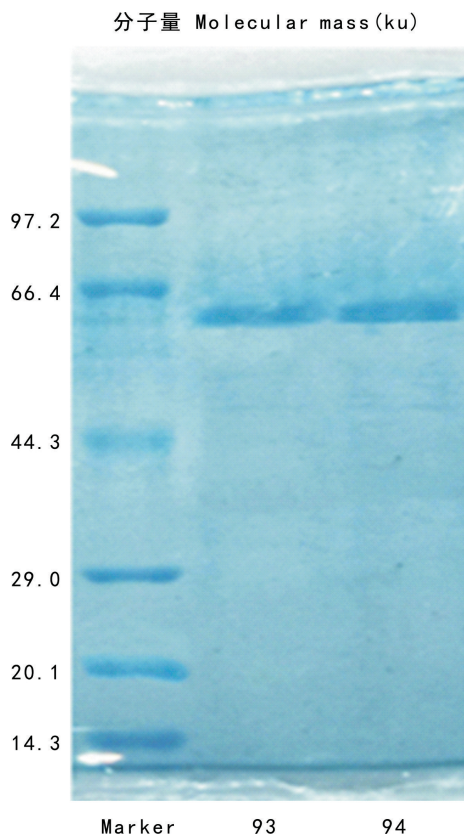


图 3 经纯化后提纯酶的 SDS-PAGE
Fig. 3 Purified enzyme in SDS-PAGE

SDS-PAGE 电泳法检测,结果如图 3 所示。

经硫酸铵沉淀以及 DEAE-Cellulose DE52 分离纯化的结果见表 1。从表 1 可以看出,纯化后酶蛋白的含量为 $0.237 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,蛋白比活力为 $169 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,纯化倍数为 13.70,回收率为 9.39%。

由图 3 可知,提纯分离的 *Aspergillus* sp. P90r 菌的第 93、94 管洗脱液,产生了电泳单一条带,证

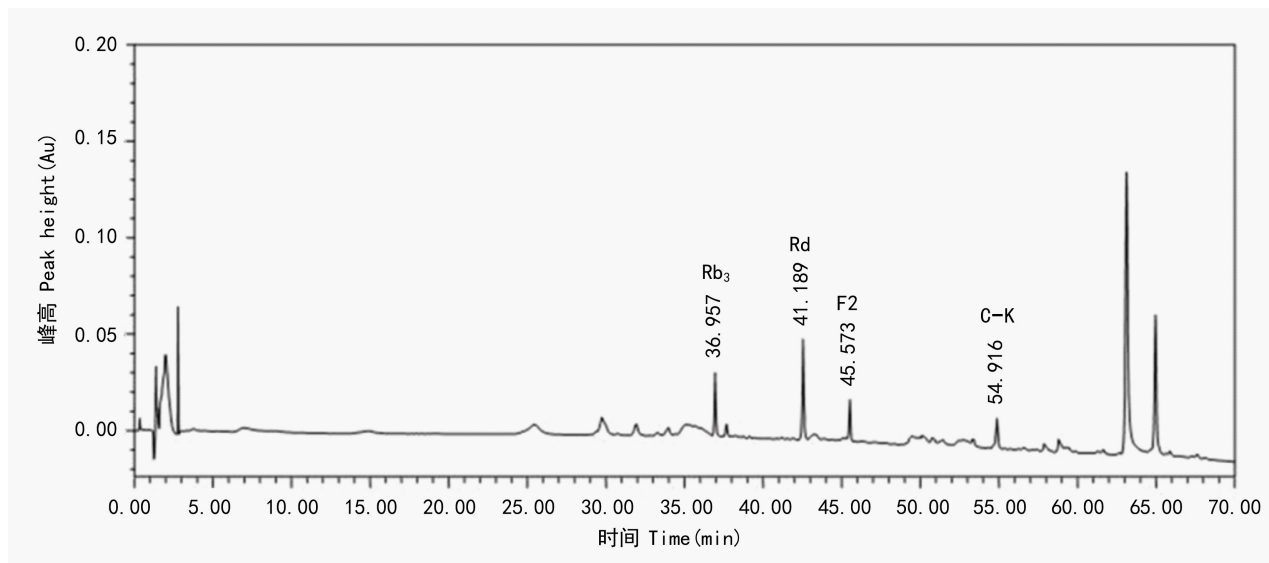
明是纯酶蛋白。根据 SDS-PAGE 中各标准蛋白条带的相对迁移率,得到蛋白质分子质量标准曲线和相对迁移率的回归方程: $y = 5.0909 - 0.9566x$ ($R^2 = 0.9939$)。经计算得到人参皂苷 Rb3 糖基水解酶的分子量约为 65.6 ku。

利用其提纯的糖基水解酶与 0.1% 的人参皂苷 Rb3 反应,其反应产物用 HPLC 测定结果,如图 4 所示。图 4 结果表明,人参皂苷 Rb3 在人参皂苷 Rb3 糖基水解酶的催化作用下,产物主要是 Rd、F2 和 C-K,其中 Rd 含量最多,其次是 F2, C-K 相对较少。

2.3 酶促反应动力学

将不同浓度的 Rb3 底物溶液与等体积纯酶液混合,最终浓度分别为 7.15 、 8.35 、 10.0 、 12.5 、 16.5 、 $25.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Rb3 底物溶液,于 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 5、10、20、40、60、90、120、180 min 后,对其 Rb3 6 种浓度、8 种不同反应时间段的 Rb3 反应产物,作 TLC 检测,如图 5 所示。

由图 5 可知,人参皂苷 Rb3 糖基水解酶的催化反应随时间的延长,Rb3 的降解量在不断提高,在 5~10 min Rb3 的降解量较低,20 min 后 Rb3 的降解量明显提高。利用软件分析图 4 中 Rb3 皂苷斑点的降解量,取催化反应 5、10、20、60、90 min 时 Rb3 降解量,计算 V_{\max} 。在 5 min 时计算得到 $K_m = 2.94 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 20.21 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;在 10 min 时计算得到 $K_m = 5.32 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 28.73 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;在 20 min 时计算得到 $K_m = 8.77 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 57.44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;在 60 min 时计算得到 $K_m = 8.93 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 66.63 \text{ mmol} \cdot$

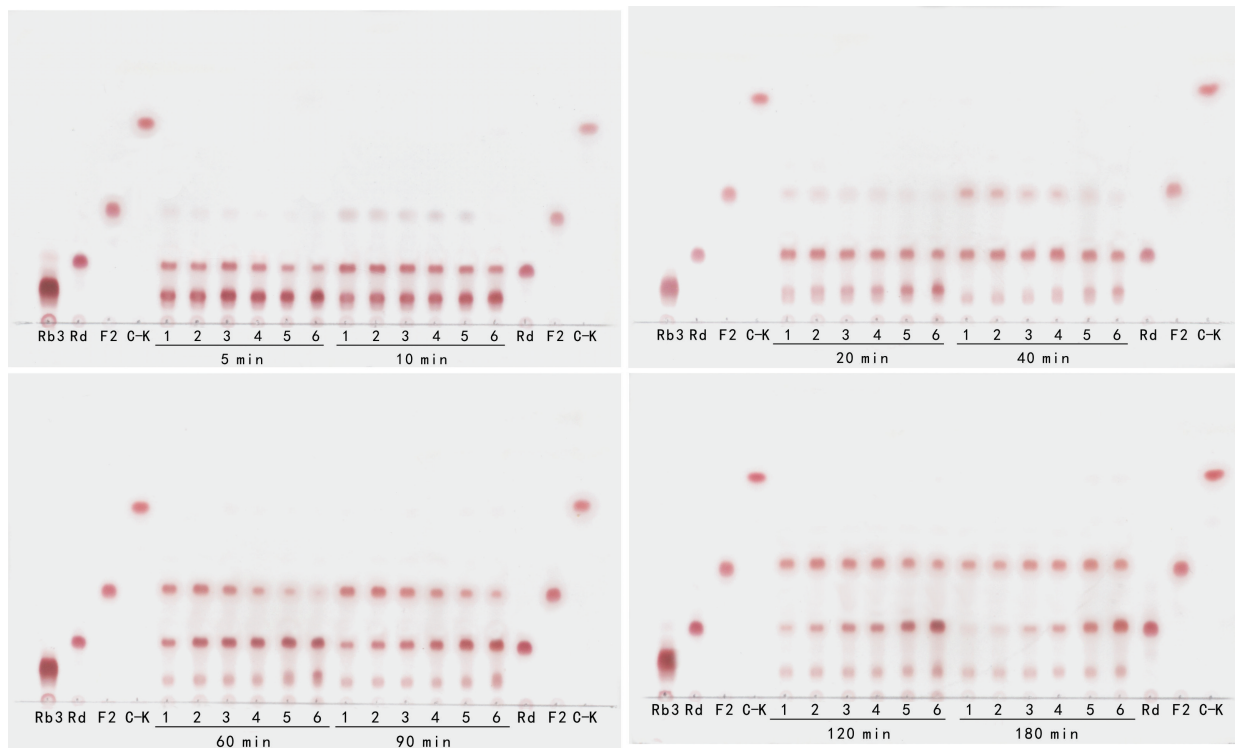


0.1% 的人参皂苷 Rb₃ 与提纯糖基水解酶在 45 °C 下反应 12 h。

Reaction between 0.1% hydrolyzed ginsenoside Rb₃ and purified glycosylase at 45 °C for 12 h.

图 4 人参皂苷 Rb₃ 与提纯的糖基水解酶反应后的 HPLC 图谱

Fig. 4 Result of reaction between hydrolyzed ginsenoside Rb₃ and purified glycosylase by HPLC



Rd, F2, C-K. 标准人参皂苷, 底物为 Rb₃; **1-6.** 7.15、8.35、10.0、12.5、16.5、25.0 mmol · L⁻¹ 的底物 Rb₃ 溶液浓度。

Rd, F2, C-K. Standard hydrolyzed ginsenoside, the substrate is Rb₃; **1-6.** Concentration of substrate Rb₃ of 7.15, 8.35, 10.0, 12.5, 16.5, 25.0 mmol · L⁻¹, respectively.

图 5 不同浓度底物和不同反应时间对人参皂苷 Rb₃ 糖基水解酶催化反应的影响

Fig. 5 Effects of different concentrations of substrate and time on catalytic reaction of hydrolyzed ginsenoside Rb₃-glycosylase

表 2 人参皂苷 Rb3 糖基水解酶反应 60 min 时底物浓度与反应初速度的关系

Table 2 Relationship between substrate concentration and initial reaction velocity in catalytic reaction of hydrolyzed ginsenoside Rb3-glycosylase in 60 min

底物浓度 Concentration of substrate (mmol · L ⁻¹)	Rb3 降解的百分含量 Percentage of Rb3 degradation (%)	Rb3 降解量 Degradation of Rb3 (mmol · L ⁻¹)	反应速率 Reaction rate (mmol · L ⁻¹ · h ⁻¹)	1/底物浓度 1/Concentration of substrate [(mmol · L ⁻¹) ⁻¹]	1/Rb3 降解量 1/Degradation of Rb3 [(mmol · L ⁻¹) ⁻¹]
7.15	30.6	2.19	26.31	0.14	0.038
8.35	28.6	2.39	29.41	0.12	0.034
10.0	25.6	2.56	32.26	0.10	0.031
12.5	22.3	2.79	34.48	0.08	0.029
16.5	19.1	3.15	38.46	0.06	0.026
25.0	14.6	3.66	45.45	0.04	0.022

表 3 人参皂苷 Rb3 糖基水解酶水解不同糖苷化合物的底物特异性

Table 3 Substrate specificity of xylosidase to hydrolyzed ginsenoside Rb3-glycosylase

底物 Substrate	pNP-β-D-木糖苷 pNP-β-D-Xyl	pNP-α-D-半乳糖苷 pNP-α-D-Gal	pNP-β-L-阿拉伯糖苷 pNP-β-L-Ara	pNP-α-L-鼠李糖苷 pNP-α-L-Rha	pNP-β-D-葡萄糖苷 pNP-β-D-Glu
相对酶活力 Relative enzyme activity (%)	100	0.14	0.09	0.05	91

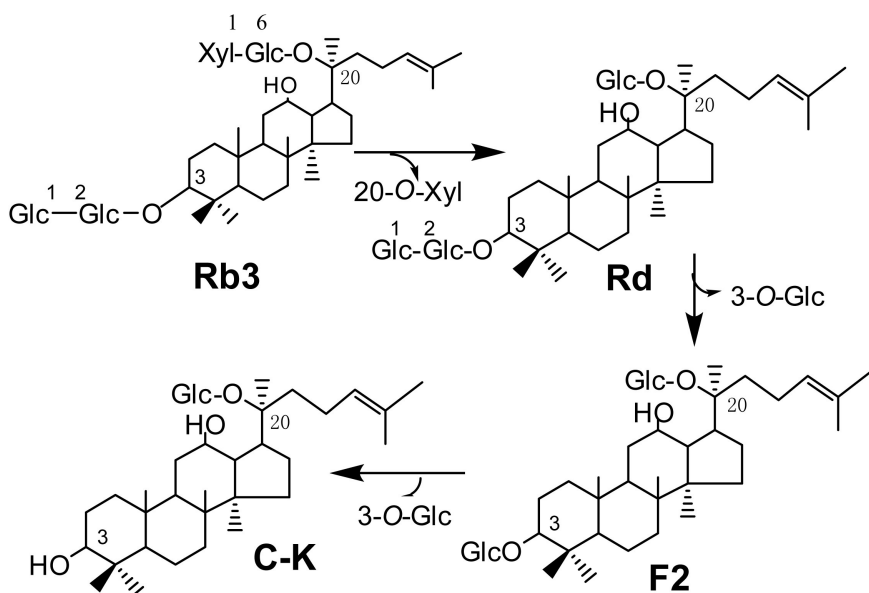
图 6 *Aspergillus* sp. P90r 菌酶水解人参皂苷 Rb3 的反应途径

Fig. 6 Hydrolysis pathway of hydrolyzed ginsenoside Rb3-glycosylase from *Aspergillus* sp. P90r

L⁻¹ · h⁻¹; 在 90 min 时计算得到 $K_m = 9.89 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 65.98 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。其中 60 min 的情

况如表 2 所示。

从表 2 可得 $K_m = 8.93 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 66.63$

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 即 Michaelis-Menten 方程:

$$V = \frac{66.63S}{8.93+S}$$

从上述数据可以得出, 人参皂苷 Rb3 糖基水解酶的酶反应速度遵循米氏方程的规律, 底物浓度较低时, 先遵循一级反应, 反应速度随底物浓度上升而上升, 然后在 20 min 时进入混合级反应, 最后在 60 min 时反应速度达到最大, 反应速度不再随浓度上升而上升, 进入零级反应, 此时 V_{\max} 趋于稳定。

从图 4 和图 5 可以看到, *Aspergillus* sp. P90r 菌所产的人参皂苷 Rb3 糖基水解酶, 水解人参皂苷 Rb3 的产物主要有 Rd、F2 和 C-K。该酶先水解人参皂苷 Rb3 的 20-O-木糖基变为 Rd, 进一步水解人参皂苷 Rd 的 3-O-葡萄糖基变为 F2, 再进一步水解人参皂苷 F2 的 3-O-葡萄糖基变为最终产物 C-K。也就是说, *Aspergillus* sp. P90r 菌所产的人参皂苷 Rb3 糖基水解酶具有水解木糖基和葡萄糖基的特异性。其酶反应途径如图 6 所示。

2.4 以 pNP 单糖苷为底物酶催化特性

用纯化后的第 93、94 管酶液, 采用 1.2.9 方法, 进行酶活力测定, 结果如表 3 所示。表中数据表明, 该酶不仅能水解 β -D-木糖苷, 还能水解 β -D-葡萄糖苷, 对 α -D-半乳糖苷、 α -L-鼠李糖苷、 β -L-阿拉伯糖苷无水解能力, 表现出独特的水解特性。

3 讨论与结论

本文的 *Aspergillus* sp. P90r 菌产人参皂苷 Rb3 糖基水解酶活力, 在相同条件下比文献中的 *Absidia* sp. GRB3-X8r 菌产酶活力高 15%~25%; 本文 *Aspergillus* sp. P90r 菌所产酶蛋白的比活力为 $169 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 对人参皂苷 Rb3 的糖基具有较好的水解活力; SDS-PAGE 电泳测得分子量约为 65.6 ku, 接近于 *Absidia* sp. GRB3-X8r 菌酶分子量 66.7 ku。该酶在 pH5.0 的偏酸性环境下酶活力很高, 在接近中性环境以及碱性环境下酶活力迅速下降, 在 pH 值 8.0 及以上完全没有酶活性。最适反应条件是 pH=3.0~5.0、45 °C, 在 pH=4.0~6.0 范围内相对稳定。该酶在 20 min 时进入混合级反

应, 反应米氏常数 K_m 值为 $8.77 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, V_{\max} 为 $57.44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; 在 60 min 时反应速度达到最大, V_{\max} 趋于稳定, 为 $66.63 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。上述研究成果, 为酶转化三七茎叶皂苷制备稀有人参皂苷提供了理论基础。

该酶先水解人参皂苷 Rb3 的 20-O-木糖基变为人参皂苷 Rd, 进一步水解人参皂苷 Rd 的 3-O-葡萄糖基变为人参皂苷 F2, 再进一步水解人参皂苷 F2 的 3-O-葡萄糖基变为最终产物 C-K。对于葡萄糖苷酶对多种糖基具有水解作用的研究, Larsbrink et al. (2014) 在研究 *Bacteroides ovatus* 中木葡聚糖分解代谢相关的酶基因时发现, 其中 BoGH31A 在切除 $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -木糖基后允许水解 β -葡萄糖基和 β -半乳糖基; Opasiri et al. (2004) 从水稻 (*Oryza sativa*) 中克隆得到 *bglu1* 基因, 其表达产物 β -葡萄糖苷酶不仅能水解一些天然的葡萄糖苷, 也能水解对硝基苯基 β -岩藻糖苷、 β -半乳糖苷和 β -木糖苷, 另外他们也克隆得到 *os4bglu12* 基因, 其表达产物同样也具有水解多种糖基的特性, 对 β -葡萄糖苷、 β -半乳糖苷、 β -甘露糖苷、 β -木糖苷和 α -阿拉伯糖苷都有水解作用 (Opasiri et al., 2006); Tsukada et al. (2006) 从 *Phanerochaete chrysosporium* 中克隆了糖基水解酶家族 1 中的两个 β -葡萄糖苷酶 BGL1A 和 BGL1B, 其中 BGL1B 对 β -葡萄糖苷和 β -半乳糖苷都有降解作用。上述研究中发现的 β -葡萄糖苷酶都归属为酶学数据库内 EC.3.2.1.21 酶类, 都属于 GH1 家族, 且该家族中能水解多种糖基的糖苷酶种类也较多。本文中 *Aspergillus* sp. P90r 菌所产人参皂苷糖基水解酶也具有水解人参皂苷 Rb3 木糖基和葡萄糖基的特性, 认为此糖苷酶应归属于 GH1 家族。

参考文献:

- CHEN JJ, SUN J, JIN FX, et al., 2011. Characterization of ginsenoside-glycosidase from *Absidia* sp. G8r [J]. J Dalian Polytech Univ, 30(1): 13-17. [陈娇娇, 孙键, 金凤燮, 等, 2011. G8r 菌产人参皂苷糖苷酶的酶性质及酶水解作用 [J]. 大连工业大学学报, 30(1): 13-17.]
- HAN SX, YOU Y, 2016. Balance between cardiovascular pharmacological and hemolytic effects of saponins of *Panax notot-*

- genseng [J]. Chin J Chin Mat Med, 41(5): 818-822. [韩淑娟, 游云, 2016 三七总皂苷心脑血管药理作用及其溶血反应 [J]. 中国中药杂志, 41(5):818-822.]
- JIA L, ZHAO Y, LIANG XJ, 2009. Current evaluation of the millennium phytomedicine—ginseng(II): Collected chemical entities, modern pharmacology, and clinical applications emanated from traditional Chinese medicine [J]. Curr Med Chem, 16(22): 2922-2942.
- JIN FX, 2009. Biotransformation of natural products [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House:74-75. [金凤燮, 2009. 天然产物生物转化 [M]. 北京: 化学工业出版社: 74-75.]
- JIN FX, YU HS, FU YY, et al., 2012. Biotransformation of Ginsenosides(Ginseng Saponins) [J]. Glob Sci Books, 6: 33-44.
- JU NX, SUN J, 2014. Advances in pharmacological effects of *Panax notoginseng* [J]. J N Pharm, 11: 90-91. [居乃香, 孙静, 2014. 三七药理作用的研究进展 [J]. 北方药学, 11:90-91.]
- KIM JH, YI YS, KIM MY, et al., 2017. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases [J]. J Gins Res, 41(8):435-443.
- LARSBRINK J, ROGERS ET, HEMSWORTH RG, et al., 2014. A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut Bacteroidetes [J]. Nature, 506(7489): 498-502.
- LI JW, 1997. Principles and methods of biochemical experiments [M]. Beijing: Peking University Publishing House: 216-223. [李建武, 1997. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社: 216-223.]
- LIU CY, JIN YH, YU HS, et al., 2014. Biotransformation pathway and kinetics of ginsenosidase type I hydrolyzing 3-O- and 20-O-multi-glucosides of PPD type ginsenosides [J]. Proc Biochem, 49: 813-820.
- LIU CY, ZUO KZ, YU HS, et al., 2015. Preparation of minor ginsenosides C-Mx and C-K from notoginseng leaf ginsenosides by a special ginsenosidase type-I [J]. Proc Biochem, 50: 2158-2167.
- MAO LJ, CAI XL, LIAO ZZ, 2017. Pharmacological mechanism of *Panax notoginseng* saponins on nervous system diseases [J]. Contemp Med Forum, 15(15): 48-49. [毛柳珺, 蔡小玲, 廖曾珍, 2017. 三七总皂苷对神经系统疾病药理作用机制的研究 [J]. 当代医药论丛, 15(15): 48-49.]
- OPASSIRI R, HUA YL, WARA-ASWAPATI O, et al., 2004. β -Glucosidase, exo- β -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlul [J]. Biochem J, 379: 125-131.
- OPASSIRI R, POMTHONG B, ONKOKSOONG T, et al., 2006. Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu1 2β -glucosidase [J]. BMC Plant Biol, 6: 33.
- QI W, HE ZM, HE MX, 2005. Mechanism and kinetic model of enzymatic hydrolysis of protein [J]. J Tianjin Univ, 38(9): 768-773. [齐巍, 何志敏, 何明霞, 2005. 蛋白质酶促水解反应机理与动力学模型 [J]. 天津大学学报, 38(9): 768-773.]
- QI W, HE ZM, SHI DQ, 2001. Enzymatic hydrolysis of casein to phosphopeptides II. Hydrolysis ate analysis and kinetic model [J]. Food Sci, 22(8): 37-40. [齐巍, 何志敏, 史德青, 2001. 酪蛋白质酶制备酪蛋白磷酸肽研究II. 产物分析及反应动力学模型 [J]. 食品科学, 22(8):37-40.]
- SHI LH, ZHU S, LOU ZX, et al., 2012. Study on extraction of cod skin collagen and reaction kinetics [J]. Sci Technol Food Ind, 33(9): 153-162. [史刘辉, 朱松, 娄在祥, 等, 2012. 鳕鱼皮活性胶原的提取及酶解动力学研究 [J]. 食品工业科技, 33(9):153-162.]
- SONG YH, JIANG XJ, 2009. Study on extraction technology of ginsenosides [J]. Heilongjiang Sci Technol Inform, 31: 240. [宋亚会, 姜晓军, 2009. 人参皂苷提取工艺研究 [J]. 黑龙江科技信息, 31:240.]
- TSUKADA T, IGARASHI K, YOSHIDA M, et al., 2006. Molecular cloning and characterization of two intracellular β -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 73(4): 807-814.
- WU HJ, LIU YN, 2008. Ginsenoside Rg1 inhibits apoptosis of myocardial cells induced by ^{60}Co irradiation [J]. Med Rev, 14: 3332-3334. [吴红金, 刘宇娜, 2008. 人参皂苷 Rg1 抑制 ^{60}Co 照射诱导心肌细胞凋亡 [J]. 医学综述, 14: 3332-3334.]
- ZHANG HX, HUANG X, YAN CN, et al., 2006. Study on the dynamics of enzymatic reaction by fluorescence method [J]. Chem Bioengin, 23(3): 4-6. [张华新, 黄星, 颜承农, 等, 2006. 酶催化反应动力学的荧光法研究进展 [J]. 化学与生物工程, 23(3):4-6.]
- ZHANG YX, CHEN XY, ZHAO WQ, et al., 2008. Advances in studies on biotransformation of ginsenosides [J]. J Shenyang Pharm Univ, 25(5): 419-422. [张怡轩, 陈晓莹, 赵文倩, 等, 2008. 人参皂苷生物转化的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 25(5):419-422.]
- ZHAO XP, XU LQ, SONG JG, et al., 2018. Purification and enzymatic properties of ginsenoside Rb3 Xylidase [J]. Sci Technol Food Ind, 17: 112-117. [赵信平, 徐龙权, 宋建国, 等, 2018. 人参皂苷 Rb3 木糖苷酶的纯化及其酶学性质 [J]. 食品工业科技, 17:112-117.]