

大蒜植株中蒜氨酸酶的提取及酶学特性研究

张民, 董家美, 宋秀欢, 张志刚, 张丽丽, 吴娜, 王芳

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本文以大蒜植株中蒜氨酸酶为对象, 研究其提取条件及酶学特性。以酶活性为指标, 考察了大蒜植株中蒜氨酸酶的提取条件, 并通过 K_m 值的测定、热稳定性和pH稳定性等实验研究了蒜氨酸酶的酶学特性。结果表明, 提取条件为料液比1:3 (g/mL), 打浆, 离心, 提取三次, 收集滤液; 蒜氨酸酶最大反应速度 $V_{max}=1.05 \mu\text{mol}/\text{min}$, 米氏常数 $K_m=2.38 \text{ mmol}/\text{L}$ 。蒜氨酸酶在30℃、pH为6.88条件下比较稳定。

关键词: 蒜氨酸酶; 提取; 酶学特性

文章编号: 1673-9078(2012)12-1693-1695

Extraction and Enzymatic Characteristics of Alliinase from Garlic Plant

ZHANG Min, DONG Jia-mei, SONG Xiu-huan, ZHANG Zhi-gang, ZHANG Li-li, WU Na, WANG Fang

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In this paper, a method for extracting alliinase from garlic plant was established and the enzymatic characteristics of alliinase were studied. The extracting method was determined by single factor and orthogonal experiments. The results indicated that the best extracting conditions were as follows: solid/liquid ratio 1:3 (g/mL) and extracting 3 times, under which the V_{max} and K_m were $1.05 \mu\text{mol}/\text{min}$ and $2.38 \text{ mmol}/\text{L}$, respectively. The alliinase was constant under the conditions of 30 °C and pH 6.88.

Key words: alliinase; extract; enzymatic characteristics

大蒜为百合科葱属植物, 有丰富的营养成分和药用价值。如大蒜中含有的大蒜素、硒和维生素C可阻断硝酸盐向亚硝酸盐转化, 预防癌症的发生^[1]。大蒜公认的功效成分是蒜氨酸酶催化蒜氨酸生成的大蒜辣素及阿霍烯等系列含硫化合物^[2]。

蒜氨酸酶(alliinase)又称蒜酶、烷基半胱氨酸亚砷酶, 是一种糖蛋白。在大蒜中, 蒜氨酸酶和凝集素是两种最主要的蛋白质, 占蛋白总含量的50%以上^[3]。Stoll和Seebach^[4]于1949年首次从大蒜鳞茎中分离出蒜氨酸酶, 该酶可催化蒜氨酸转化成大蒜辣素、丙酮酸和氨。大蒜含硫化合物的产生是一种酶促反应的结果^[5], 因此, 蒜氨酸酶的分选方法、酶学特性的研究, 对开发利用大蒜类药品、保健品有十分重要的意义。大蒜植株是大蒜加工的副产品, 具有较高的蒜氨酸酶含量, 是蒜氨酸酶良好的来源。本文探讨了大蒜植株中蒜氨酸酶的提取条件及酶学特性。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

蒜氨酸: 实验室自制; 市售蒜苗; 考马斯亮蓝

收稿日期: 2012-07-13

作者简介: 张民 (1972-), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 食品化学与食品营养

G-250: 联星生物; 牛血清蛋白: 联星生物; PLP: assay $\geq 99\%$; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

JA2003 分析天平: 上海天平仪器厂; TDZ5-WS 湘仪离心机: 长沙湘仪离心机仪器有限公司; 752 紫外-可见分光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 检测方法

酶活测定采用文献^[5]的方法。酶活定义为在25 °C条件下, 蒜氨酸酶催化的反应中, 每分钟产生1 μmol 丙酮酸定义为一个酶活单位 (unit)。酶的比活力为每毫克或每毫升酶蛋白所具有的酶活力单位数U/mg或U/mL, 比活力越高, 表示酶越纯。考马斯亮蓝G-250法^[6]。

1.3.2 大蒜植株蒜氨酸酶提取条件的优化

1.3.2.1 单因素实验

料液比对浸提效果的影响: 称取新鲜大蒜植株15克, 5份, 料液比分别为1:2、1:3、1:4、1:5、1:6。匀浆, 浸提, 离心, 测定酶活性。提取时间对浸提效果的影响: 称取新鲜大蒜植株15克, 5份, 料液比1:5, 匀浆, 10 °C浸提浸提0 h、0.5 h、1 h、1.5 h、2 h。提取次数对浸提效果的影响: 称取新鲜大蒜植株15克, 5份, 料液比1:5, 匀浆, 于15 °C水浴中浸提1 h, 分别

提取1次、2次、3次、4次、5次。

1.3.2.2 正交实验设计

根据单因素实验结果选取因素水平,做 $L_9(3^4)$ 正交实验。

1.3.3 蒜氨酸酶的酶学特性

1.3.3.1 K_m 、 V_{max} 的测定

在一定的酶反应条件下(25℃, pH=7),以天然提取的蒜氨酸为底物,分别向纯化的蒜氨酸酶液中加入浓度为1、2、4、6、8、10 mmol/L的底物,反应1 min后测定蒜氨酸酶活力,观察底物浓度对蒜氨酸酶活性的影响。依据不同底物浓度下蒜氨酸酶活力测定结果,再根据 Lineweaver-Burk 米氏方程,用双倒数作图法测定 K_m 、 V_{max} 。

1.3.3.2 蒜氨酸酶的热稳定性

蒜氨酸酶的热稳定性的测定:分别将蒜氨酸酶液在30℃、40℃、50℃、60℃下保温放置12 h,每隔1小时依次取1 mL酶液,将其稀释到合适浓度并冷却至室温,在一定的酶反应条件(25℃, pH=6.88)下,加入底物测蒜氨酸酶活性。以30℃时测得的蒜氨酸酶活力为参数,考察蒜氨酸酶在12 h内的酶活力损失程度,研究蒜氨酸酶热失活动力学性质。

1.3.3.3 蒜氨酸酶的 pH 值稳定性

蒜氨酸酶 pH 值的稳定性的测定:在一定酶反应条件下(25℃),将蒜氨酸酶在 pH 范围为2~11的磷酸 Na^+/K^+ 缓冲溶液(用0.05 mol/L Na_2HPO_4 和0.05 mol/L KH_2HPO_4 调节 pH 值,保存1 h、3 h、8 h,以 pH=6.88 时测得酶活力为参照,考察不同 pH 值范围内的酶活力降低程度,得到蒜氨酸酶的酸碱稳定性参数。

2 结果与分析

2.1 大蒜植株粗酶提取条件的优化

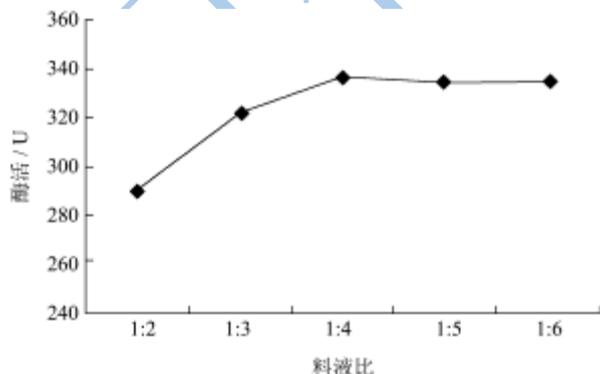


图1 料液比对蒜氨酸酶活性的影响

Fig.1 Effects of liquid ratio on the activity of alliinase

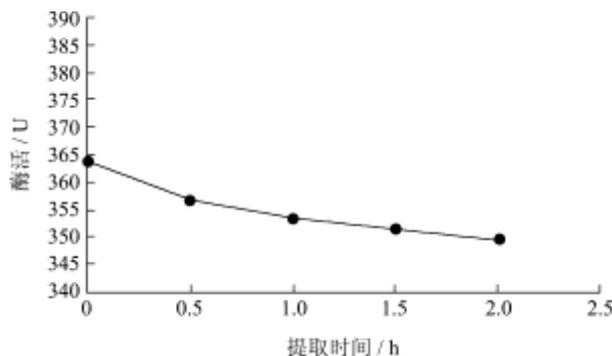


图2 提取时间对蒜氨酸酶活性的影响

Fig.2 Effects of extraction time on the activity of alliinase

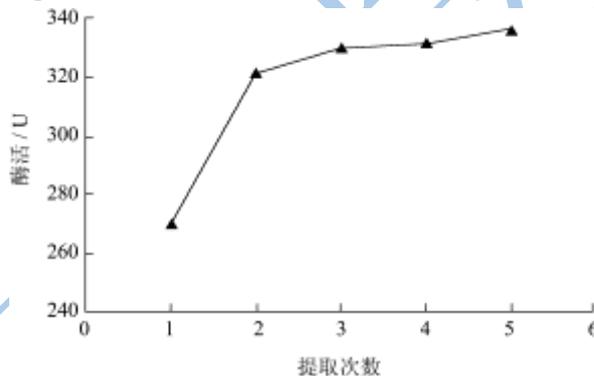


图3 提取次数对蒜氨酸酶活性的影响

Fig.3 Effects of extracting times on the activity of alliinase

由图1~3可知,随着料液比的增加,蒜氨酸酶活性增加,以料液比1:4时酶活性达到最高点。蒜氨酸酶活性随提取时间的变化波动上升,浸提1 h酶活性达到最高,而后迅速下降。随着提取次数的增加,蒜氨酸酶活性迅速上升,提取3次以后再增加提取次数,酶活性上升缓慢。

2.2 正交实验设计

表1 蒜氨酸酶提取条件的正交实验因素水平表 $L_9(3^4)$

Table 1 Factors and level of orthogonal experiments $L_9(3^4)$

| 水平 | A (时间/h) | B (料液比) | C (提取次数) |
|----|----------|---------|----------|
| 1 | 0 | 1:3 | 1 |
| 2 | 0.5 | 1:4 | 2 |
| 3 | 1 | 1:5 | 3 |

由上述数据可知,各因素对蒜氨酸酶活性的影响顺序为C(提取次数)>A(提取时间)>B(料液比)。其中,提取时间、提取次数在0.01水平有极显著差异,料液比没有显著性差异,选择最优方案 $A_2B_3C_2$,即提取时间0 h,料液比1:3,提取三次,做验证实验,结果为689.32 U。

2.3 蒜氨酸酶动力学特性研究

2.3.1 蒜氨酸酶的 V_{max} 、 K_m 值

表2 正交实验法优选蒜氨酸酶提取条件的实验结果

Table 2 The experimental results and visual analysis table

| 序号 | A | B | C | 空白 | 酶活性/U |
|----|---------|---------|---------|---------|--------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 535.96 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 614.27 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 676.68 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 530.41 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 567.12 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 440.76 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 631.40 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 500.21 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 606.21 |
| k1 | 608.970 | 565.923 | 492.310 | 569.763 | |
| k2 | 512.763 | 560.533 | 583.630 | 562.143 | |
| k3 | 579.273 | 574.550 | 625.067 | 569.100 | |
| R | 96.207 | 14.017 | 132.757 | 7.620 | |

表3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

| 因素 | 偏差平方和 | 自由度 | F值 | 显著性 |
|------|-----------|-----|---------|-----|
| 时间 | 14561.195 | 2 | 136.213 | ** |
| 料液比 | 299.938 | 2 | 2.806 | |
| 提取次数 | 27680.672 | 2 | 258.940 | ** |
| 误差 | 106.90 | 2 | | |

注: $F_{0.01}(2,2)=99.00$; **: $P<0.01$ 。

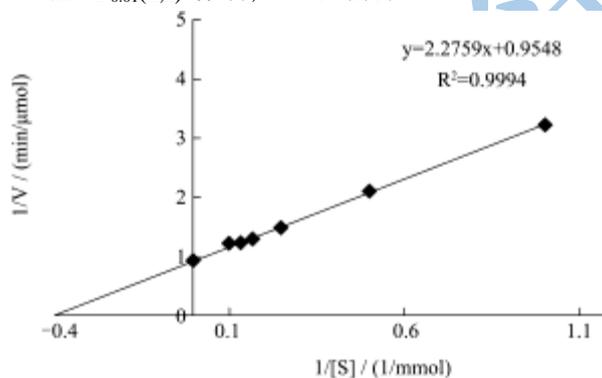


图4 蒜氨酸酶的米氏方程

Fig.4 Km assay of alliinase

本实验以 S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷为底物,采用 Lineweaver-Burk 作图法,求得米氏方程为 $y=2.2759x + 0.9548$, $r=0.9998$ 。根据方程算得: $V_{max}=1.05 \mu\text{mol}/\text{min}$, $K_m=2.38 \text{ mmol}/\text{L}$ 。

2.3.2 蒜氨酸酶的热稳定性研究

由图 5 可知,不同温度下保存蒜氨酸酶,其酶活性整体呈降低趋势,降低程度不同。蒜氨酸酶在 30 °C、40 °C 条件下比较稳定,50 °C 条件下酶活性缓慢降低,当温度为 60 °C 时,短时间内蒜氨酸酶迅速失活。

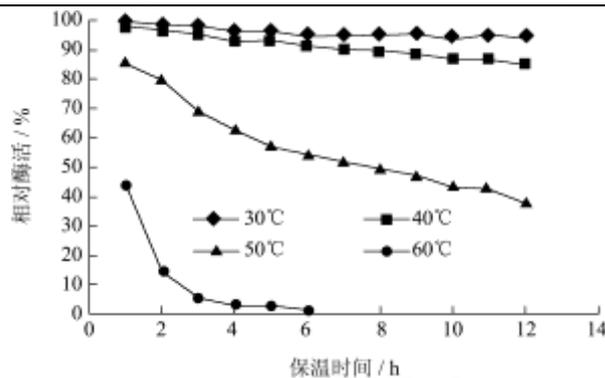


图5 蒜氨酸酶热稳定性

Fig.5 The thermal stability of alliinase

2.3.3 蒜氨酸酶的 pH 稳定性研究

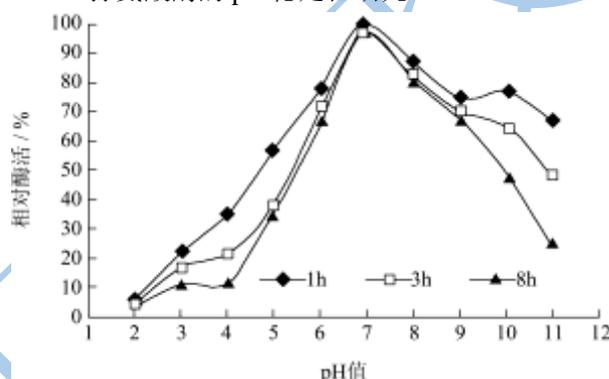


图6 蒜氨酸酶pH稳定性

Fig.6 The pH stability of alliinase

不同 pH 条件下保存蒜氨酸酶,其酶活性整体呈先上升后下降的趋势,而降低程度不同。蒜氨酸酶 pH 在 6~9 条件下相对比较稳定, pH 在 2~5 时,随着 pH 的降低酶活性逐渐降低, pH 在 9~11 时,随着 pH 的增加酶活性逐渐降低。因此最佳保藏的 pH 条件为 6.88。

3 结论

3.1 大蒜植株中蒜氨酸酶的提取条件确定为时间 0 h,料液比 1:3,提取三次;蒜氨酸酶米氏方程为 $y=2.2759x + 0.9548$,由方程可知 $V_{max}=1.05 \mu\text{mol}/\text{min}$, $K_m=2.38 \text{ mmol}/\text{L}$ 。

3.2 蒜氨酸酶的热稳定性结果表明,蒜氨酸酶在 30 °C、40 °C 条件下比较稳定,活性随着温度和时间的延长逐渐降低,因此在保藏和工业化生产时应尽量控制在低温条件。蒜氨酸酶的 pH 稳定性结果为:蒜氨酸酶 pH 在 6~9 条件下相对比较稳定,偏酸或者偏碱都会导致酶变性失活。

参考文献

[1] 朱凤妹,杜彬.大蒜浸提液对肉制品中亚硝酸盐清除作用的研究[J].现代食品科技,2007,23(12):23

- [2] 曹红,陈坚.大蒜蒜酶提取纯化及临床应用研究[J].临床医药实践杂志,2008,17(2):83
- [3] 吴熙然,胡红华.一步亲和纯化蒜氨酸酶及其酶学性质研究[J].现代食品科技,2009,25(4):366
- [4] Stoll A, Seebach E. The decomposition of alliinase and the properties of alliinase [J]. *Helv Chim Acta*, 1949, 32: 197-205
- [5] 乔旭光,张振华,韩雅珊.蒜氨酸酶动力学特性研究[J].山东农业大学学报,1999,30(1):42
- [6] Yoo K S, Pike L M. Determination of background pyruvic acid concentrations in onions, *Allium* species, and other vegetables [J]. *Scientia Horticulturae*, 2001, 89: 249-256
- [7] .考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J].天津化工,2009,23(3):40-41

现代食品科技