

蒜粉中蒜氨酸酶的分离纯化及性质测定

苟萍¹ 李燕^{1,*} 王荣¹ 陈坚²

¹新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046; ²新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054

Purification and Properties of Allinase from Garlic Power

GOU Ping¹, LI Yan^{1,*}, WANG Rong¹, CHEN Jian²

¹College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046; ²College of Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054

摘要 蒜粉以Na/K磷酸缓冲液抽提、25%~40% (NH₄)₂SO₄分级沉淀后, 用Sephadex G-200柱分离得到纯化200倍电泳纯蒜氨酸酶。测定其性质的结果表明, 此酶在25℃下对半胱氨酸亚砷的K_m为0.87 mmol·L⁻¹, V_{max}为0.46 μmol·min⁻¹, 最适反应温度为40℃, 热稳定性的温度范围在45℃以下, 最适pH为6.6。

关键词 蒜粉; 蒜氨酸酶; 分离纯化; 性质测定

大蒜为百合科葱属植物, 有丰富的营养成分和药用价值。它在杀菌、抗血栓、防治动脉硬化、预防和治疗中风和高血压等方面有显著的疗效, 近年来又发现在防治肿瘤中也有独特的作用^[1]。新疆大蒜因地理和气候的独特性, 其药用成分含量高, 有广阔的开发利用前景。大蒜中有药理作用的物质为一类含硫化合物——蒜素(allicin, 主要成分是二烷基硫代亚磺酸酯和烷基-2-丙烯基硫代亚磺酸酯等)。蒜氨酸酶(alliinase, EC4.1.1.4)催化蒜氨酸(alliin, 烯丙基硫代半胱氨酸亚砷)生成丙酮酸、氨及含硫化合物蒜素等^[1]。本文研究了从蒜粉中提取蒜氨酸酶的方法及蒜氨酸酶的性质。

材料与方法

1 材料

新疆蒜粉(新疆吉木萨尔蒜, *Allium sativum*)为新疆医保公司产品。

2 底物制备

参照孙君社和高孔荣^[2]的方法制备底物L-半胱氨酸亚砷。

3 酶活性测定

以L-半胱氨酸亚砷为底物, 用丙酮酸法测定酶活性, 以在25℃条件下, 每分钟产生1 μmol丙酮酸为1个活力单位(U)。1 mL酶液加5 mL底物于室温下反应5 min后, 加等量10%三氯乙酸终止反应。从中吸取2.5 mL与0.5 mL 2, 4-二硝

基苯肼充分反应后, 再加入5 mL 0.5 mol·L⁻¹ NaOH摇匀显色, 用752紫外光栅分光光度计测波长520 nm处的光吸收(OD)值。

4 蛋白质浓度测定

按Lowry方法^[3]。

5 聚丙烯酰胺盘状电泳

7%的分离胶, 2.5%的浓缩胶, 0.05 mol·L⁻¹ Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3), 以考马斯亮蓝G-250为染色剂, 甲醇、水、浓氨水(64:36:1)为脱色剂, 7%乙酸透明保存。

实验结果

1 酶的分离纯化

称取40 g蒜粉用4倍体积的0.1 mol·L⁻¹ Na/K磷酸缓冲液(pH 6.5)抽提。先在冷冻条件下研磨20 min, 4℃下以2 000×g离心20 min, 收集上清液。沉淀加少量上述磷酸缓冲液重复抽提2次, 弃去沉淀, 上清液为粗酶液。

粗酶液分别加20%~70%饱和度的硫酸铵沉淀, 于冰箱中放置2~4 h后, 4℃下以2 000×g离心30 min, 沉淀用少量0.1 mol·L⁻¹ Na/K磷酸缓冲液(pH 6.5)溶解、定容, 测定酶活性。图1结果表明, 硫酸铵饱和度在30%~35%时酶活性较高。

收稿 2003-06-24 修定 2003-10-24

* E-mail: ly433@163.com, Tel: 0991-8879585

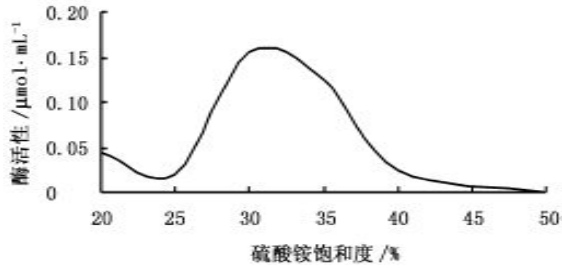


图1 蒜氨酸酶活性与硫酸铵饱和度的关系

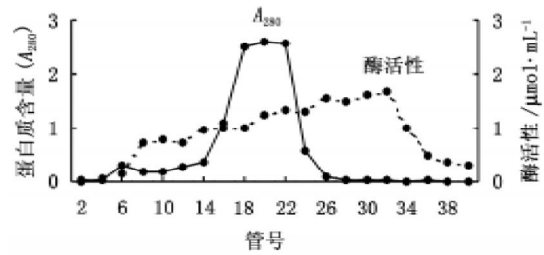


图2 蒜氨酸酶的Sephadex G-200柱层析图谱

30%~35% 硫酸铵分级的沉淀得到的蒜氨酸酶用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na/K磷酸缓冲液 (pH 6.5) 溶解, 对蒸馏水透析, 透析液上葡聚糖G-200 (Sephadex G-200) 柱 ($2.0 \text{ cm}\times 40 \text{ cm}$), 用蒸馏水洗脱, 每管 5 mL, 洗脱曲线见图 2。通过测定洗脱液的蛋白量以及酶活性可知: 5~25 管含有蒜氨酸酶, 杂蛋白含量 (A_{280}) 较高; 26~35 管的蒜氨酸酶活性高, 杂蛋白含量很低。将 26~35 管合并测酶活性, 得到纯化 200 倍的较纯蒜氨酸酶。通过 PAGE 检测得到单一条带 (图 3)。蒜氨酸酶纯化步骤见表 1。

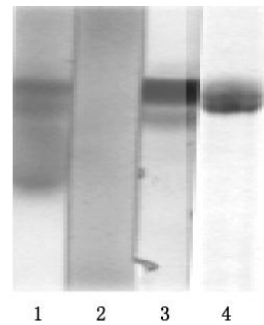


图3 蒜氨酸酶电泳

1. 粗酶液; 2. 透析液; 3. 第 14 管洗脱液; 4. 第 32 管洗脱液。

表1 蒜氨酸酶提纯摘要

提纯步骤	体积/mL	总蛋白/mg	总活性/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$	比活力/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	纯化倍数	产率/%
粗酶液	400	398	86	0.23	1.00	100
30%~35% 硫酸铵沉淀	10	9.021	2.813	0.31	1.35	3.27
透析液	10	8.621	2.65	0.31	1.35	3.08
Sephadex G-200层析 (第32管)	8	0.060	2.8	46	200	3.26

2 不同温度下的酶活性及热稳定性

蒜氨酸酶经葡聚糖 G-200 柱分离后, 将酶活性较高的 26~35 管洗脱液合并作为以下酶性质测试液。酶液和底物在不同温度下保温后, 以失活的酶液为对照, 结果表明, 酶的最适温度为 40°C (图 4)。将酶在不同温度下保温 30 min 后冷却, 再在最适条件下测定剩余酶活性, 以不经保温的酶活性测定为 100%, 酶在 45°C 以下较稳定 (图 5)。

3 最适 pH

将酶液、底物及和不同 pH 的缓冲液 (pH 3.0~6.6 用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH 7.0~8.5 用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液, pH 9~10 用 0.05

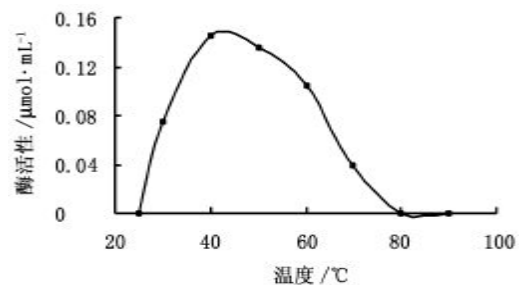


图4 温度对蒜氨酸酶活性的影响

$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸-NaOH 缓冲液) 分别在 40°C 水浴中保温 10 min 后, 测定酶活性。酶活性的最适 pH 值为 6.6 (图 6)。

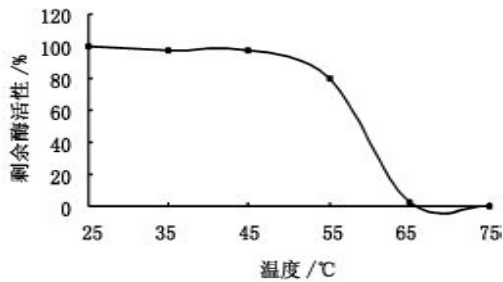


图5 蒜氨酸酶热稳定性曲线

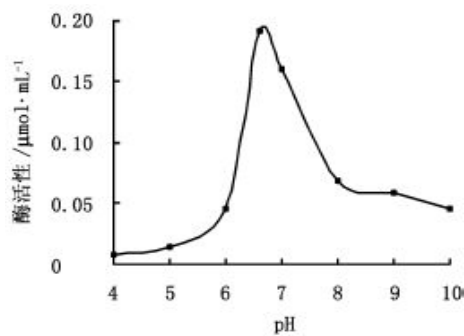


图6 蒜氨酸酶活性的最适pH

4 米氏常数

在不同底物浓度下测定酶活性, 用双倒数作图法(Lineweaver-Burk)作图(图7)。酶的 $K_m=0.87$

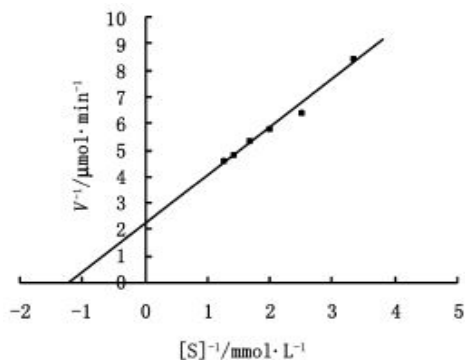


图7 Lineweaver-Burk作图

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max}=0.46 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, 回归方程为 $Y=2.149+1.884x$, $r=0.999$ 。

讨 论

蒜粉用Na/K磷酸缓冲液抽提, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后透析, 再将透析液上葡聚糖G-200柱分离得到蒜氨酸酶, 这种提取方法较Nock和Mazelis^[4]、Krest和Keusgen^[5]的方法简便, 且纯化倍数高。提取方法成本低, 简单可行, 适合大量提取蒜氨酸酶。Krest和Keusgen^[5]从蒜粉中提取得到的蒜氨酸酶, 以L-(+)蒜氨酸为底物, 测得 $V_{\max}=0.252 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, $K_m=1.60 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。我们提取得到的蒜氨酸酶以半胱氨酸亚砷为底物测得 $V_{\max}=0.46 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, $K_m=0.87 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。二者比较, 以半胱氨酸亚砷为底物时 V_{\max} 增大, K_m 降低。说明蒜氨酸酶对半胱氨酸亚砷亲和力大, 更适合与半胱氨酸亚砷作用。以半胱氨酸亚砷为底物时, 此酶的最适温度升高, 最适pH下降。蒜氨酸酶极其不稳定, 提取过程中温度高, 时间长, 均会导致酶活性完全丧失。在提取过程中加入甘油、蔗糖、NaCl、磷酸吡哆醛可提高酶的稳定性。

参考文献

- 1 程龙军, 郭得平. 葱蒜类作物中的蒜氨酸酶. 植物生理学通讯, 2001, 37(5): 471~474
- 2 孙君社, 高孔荣. 蒜酶及其动力学研究. 食品科学, 1995, 16(9): 13~15
- 3 Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Boil Chem, 1951, 193: 265~275
- 4 Nock PL, Mazelis M. The C-S lyases of higher plant: Preparation and properties of homogeneous alliin lyase from garlic. Arch Biochem Biophys, 1986, 249: 27~33
- 5 Krest I, Keusgen M. Quality of herbal remedies from *Allium sativum*: differences between alliinase from garlic powder and fresh garlic. Planta Medica, 1999, 65(2): 139~143