

蒜氨酸酶的光谱特征研究

李 瑜^{1,2}, 许时婴^{2,*}, 庞凌云¹, 乔明武¹

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002

2. 江南大学食品学院, 教育部食品科学与安全重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 本实验采用 Sephacryl S-200 凝胶柱对新鲜大蒜中的蒜氨酸酶进行了分离纯化, 并对纯化后的蒜氨酸酶的紫外-可见光谱、荧光发射光谱和圆二色性等光谱学特性进行了研究。结果表明, 蒜氨酸酶的 α -螺旋结构大约占 27%~30%, 几乎不存在 β -折叠结构, β -转角结构大约占 30% 左右, 无规卷曲所占比例大约占 40% 左右。

关键词: 大蒜; 蒜氨酸酶; 光谱学特性

Study on Spectral Characteristics of Alliinase

LI Yu^{1,2}, XU Shi-ying^{2,*}, PANG Ling-yun¹, QIAO Ming-wu¹

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Wuxi 214036, China)

Abstract: In this paper, alliinase from fresh garlic was purified with Sephacryl S-200 gel column and the spectral characteristic of ultraviolet/visible spectra, fluorescence and CD spectroscopy were studied. The results showed that in alliinase α -helix structure accounts for about 27%~30%, β -pleated sheet structure almost doesn't exist, β -turn structure accounts for about 30%, and random coil structure accounts for about 40%.

Key words garlic; alliinase; spectral characteristics

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0060-03

收稿日期: 2007-05-30

*通讯作者

作者简介: 李瑜(1976-), 女, 副教授, 博士, 主要从事果蔬贮藏保鲜与深加工研究。

3.2 三叉苦抗氧化能力因其部位的不同而清除活性氧的能力也不同。

3.3 三叉苦各部位的水提取物清除体外产生的活性氧的能力随其浓度的增加而增大, 但当浓度达一定值后, 清除率随浓度的变化渐趋平缓。

3.4 中草药提取物清除活性氧是一个复杂的反应, 其抗氧化能力的大小取决于它们夺氢反应、还原作用及生成自由基的稳定性等诸多因素, 也与植物中所含的化学成分及有效成分的溶解性有关。对三叉苦的抗氧化有效成分的分离和提纯、清除机理及构效关系等有待进一步研究。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 68.

- [2] 国家中医药管理局编委会. 中华本草: 第二十九卷第四分册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 915.
- [3] 中医学编辑委员会. 中国医学百科全书: 中医学中册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 1030.
- [4] 钟希文, 梅全喜, 高玉桥, 等. 三丫苦泡茶的抗炎、镇痛及解热作用[J]. 中药材, 2001, 24(9): 664-665.
- [5] LEWEA A, MATZ P, CHAN P H. Free radical pathways in CNS injury[J]. J Neurotrauma, 2000, 17(10): 871-890.
- [6] 赵保路. 氧自由基与天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] CUTTERIDGE J M C. Free radicals in medicine[J]. B M J, 1994, 6955: 678.
- [8] 龙盛京, 罗佩卓, 覃日昌. 17种中草药抗活性氧作用的研究[J]. 中草药, 1999, 30(1): 40-43.
- [9] 许申鸿, 杭瑚, 郝晓丽. 葡萄籽化学成分分析及其抗氧化性质的研究[J]. 食品工业科技, 2000, 21(2): 18-20.
- [10] 文镜, 贺素华, 张博成, 等. 红景天提取物清除 $O_2\cdot$ 和 $\cdot OH$ 的体外实验研究[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 219-223.
- [11] 范小兵, 李慈娟, 沙大年, 等. 邻菲罗啉化学发光体系测定羟自由基的建立[J]. 基础医学与临床, 1998, 18(6): 68-71.

蒜氨酸酶全称为S-烷基-L-半胱氨酸亚砷酶。自从1948年Arthur Stoll和Ewald Seebeck^[1]发现大蒜中存在内源酶蒜氨酸酶(alliinase, 蒜氨酸裂合酶, EC 4.4.1.4), 蒜素和其它的硫代亚磺酸酯是在大蒜被切割或挤压条件下, 由大蒜中含量丰富的非蛋白质氨基酸经蒜氨酸酶的酶解作用而生成的, 之后对蒜氨酸酶的研究一直没有中断, 但直到上世纪80年代后才将此酶纯化为均一的酶^[2], 且纯化步骤较为烦琐。目前对蒜氨酸酶动力学特性的研究很多。1989年, Jansen等^[3-4]对此酶的稳定性、动力学特性、辅酶以及酶/底物、酶/抑制剂之间的反应进行了研究; Kyung等^[5]研究了高压对蒜氨酸酶的活力以及大蒜风味的影响; 1999年, Krest等^[6]对分别从蒜粉以及新鲜大蒜中提取得到的蒜氨酸酶的动力学特性进行了比较。本实验将对采用Sephacryl S-200凝胶柱分离纯化得到的新鲜大蒜中的蒜氨酸酶的光谱学性质进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

市售山东苍山无苔大蒜。

1.2 仪器

HD-3 紫外检测器 上海沪西分析仪器厂; 650-60型荧光分光光度计 日本日立公司; CS-900型扫描仪 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 蒜氨酸酶的分离纯化

以下所有操作均在4℃条件下进行。

500g新鲜大蒜, 加600ml pH7.0的磷酸缓冲液A(60mmol/L NaH_2PO_4 和60mmol/L Na_2HPO_4 , 10%(V/V)的甘油, 5%(W/V)NaCl, 5mmol/L EDTA)以最大速度均浆1min, 3000×g冷冻离心5min, 上清液10000×g冷冻离心30min。45%饱和硫酸铵盐析, 溶液缓慢搅拌20min后, 10000×g冷冻离心30min, 滤饼重新溶于300ml pH7.0的磷酸缓冲液B(60mmol/L NaH_2PO_4 和60mmol/L Na_2HPO_4 , 10%(V/V)的蔗糖, 1%(W/V)NaCl)中, 10000×g冷冻离心15min, 上清液超滤(截留分子量为1万的滤膜, 操作压力0.25MPa, 浓缩倍数约为3倍), 10000×g冷冻离心30min, 得新鲜大蒜的蒜氨酸粗酶液。

将处理好的Sephacryl S-200凝胶柱填料装成1.6×150cm柱。取经处理好的新鲜大蒜的蒜氨酸粗酶液9ml上柱, pH7.0缓冲液C(60mmol/L NaH_2PO_4 和60mmol/L Na_2HPO_4 , 1%(W/V)NaCl、25μmol/L磷酸吡哆醛)以30ml/h流速洗脱, 同时用紫外检测仪在280nm进行检测, 收集组分。最终得到冷冻干燥样品。

1.3.2 紫外-可见光谱

取0.5mg蒜氨酸酶溶解于2.5ml重蒸水中, 测定温

度25℃。以不加蒜氨酸酶的重蒸水为空白参比, 用1cm石英比色皿在UV1100型光度计上测试。

1.3.3 荧光光谱

取2mg蒜氨酸酶溶解于2.5ml重蒸水中, 以1cm石英比色皿在850荧光分光光度计上完成荧光测定。测定温度25℃。激发狭缝5nm, 发射狭缝6nm, 扫描速度120nm/min。

1.3.4 圆二色性测定

蒜氨酸酶浓度为0.50mg/ml, 比色皿光径0.1cm, 分辨率1.0nm, 扫描速率为100nm/min, 扫描三次, 测定远紫外区200~250nm范围溶液的圆二色性光谱。

2 结果与分析

2.1 紫外-可见光谱

溶液中蛋白质分子可以产生紫外吸收光谱是由于色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)残基的侧链基团对光的吸收, 上述氨基酸由于其发色团不同而有不同的紫外吸收光谱, 其中Trp在280nm附近有一个吸收峰; Tyr在275nm附近有一个吸收峰; Phe在257nm附近有一个吸收峰。三种氨基酸的摩尔分子吸收系数 ϵ 也不同, Trp的摩尔分子吸收系数最大($\epsilon=5600$), 所以一般蛋白质均在280nm附近出现吸收峰。

PLP是蒜氨酸酶的辅基, 游离PLP在中性和酸性pH的特征吸收峰都在390nm附近, 结合态PLP的吸收峰将会发生移动, 出现在400~440nm之间。

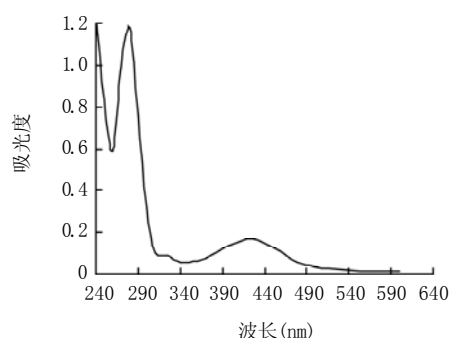


图1 蒜氨酸酶紫外-可见光谱扫描
Fig.1 UV and visible spectra scan of alliinase

新鲜大蒜中分离得到的蒜氨酸酶在240~600nm的波长范围内进行了紫外可见扫描(图1), 和一般的蛋白质一样, 蒜氨酸酶在280nm处有一最大吸收峰, 除此之外, 在325nm以及430nm附近也出现最大吸收峰。蒜氨酸酶430nm处的最大吸收是由于其辅助因子5'-磷酸吡哆醛与蒜氨酸酶主链结合产生的吸收峰。325nm附近的最大吸收是由于PLP的醛基与蒜氨酸酶中专一性赖氨酸残基的 ϵ -氨基活性位相连, 形成了质子化的或非质子化的PLP-

Lys 醛亚胺复合物(aldimine)。

2.2 荧光发射光谱

荧光光谱能提供包括激发光谱、发射光谱以及荧光强度、量子产率、荧光寿命、荧光偏振等许多物理参数。这些参数从各个角度反映了分子的成键和结构情况。通过对这些参数的测定,可以推断蛋白质分子在溶液中的构象变化,从而阐明蛋白质结构与功能之间的关系,对蛋白质分子中荧光生色基团的结构及其所处的微环境提供有用的信息。在蛋白质分子中,能发射荧光的氨基酸只有色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe), Trp、Tyr、Phe 由于其侧链生色基团的不同而有不同的荧光激发和发射光谱。Trp 荧光强度最大,而 Phe 的强度最小,因而蒜氨酸酶的内源荧光主要是由 Trp 和 Tyr 残基所发射的。

选取 330、390、430nm 三种不同的激发波长分别对新鲜大蒜中分离得到的蒜氨酸酶的发射荧光进行扫描。由图 2 可见,激发波长为 430nm 时,蒜氨酸酶在发射波长为 505nm 处有一最大荧光信号。当激发波长为 390nm 时,蒜氨酸酶的最大发射波长发生蓝移至 453nm,且荧光吸收强度也增加,在 430nm 附近增加了一小吸收峰。当激发波长为 330nm 时,蒜氨酸酶的最大发射波长进一步发生蓝移至 410nm,荧光吸收强度大大增加,且在 375nm 附近增加了一中等强度的发射峰。这些现象表明,荧光信号不仅来自于 Trp、Tyr 和 Phe,也来源于蒜氨酸酶的辅助因子 5'-磷酸吡哆醛。

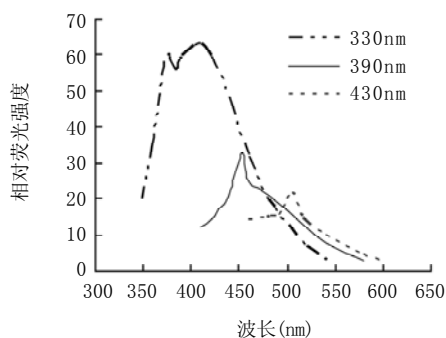


图2 蒜氨酸酶荧光发射光谱
Fig.2 Fluorescence emission spectra of alliinase

2.3 圆二色谱

圆二色性光谱分为远紫外区(185~245nm)和近紫外区(245~320nm)。远紫外区是肽键的吸收峰范围,反映了主链构象。在远紫外区,一般天然蛋白质的光谱包含一个正峰(在 190nm 波长左右)和一个负槽(在 205~235nm 波长范围)。其中,负槽的形状与主链构象密切相关。一般地说,典型的 α -螺旋给出 209nm 和 222nm 左右的两个负槽,称为双槽曲线, β -折叠给出 215nm 的负槽。

根据图 3 计算可知,新鲜大蒜中蒜氨酸酶的 α -螺旋

结构大约占 27%~30%,几乎不存在 β -折叠结构, β -转角结构大约占 30% 左右,无规卷曲所占比例大约占 40% 左右。

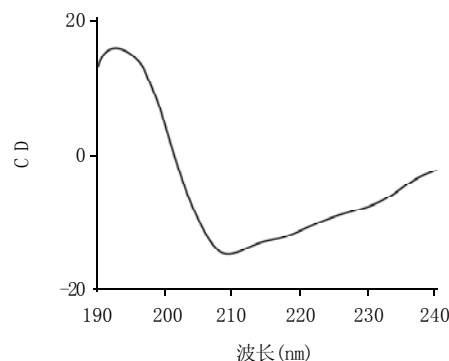


图3 蒜氨酸酶的圆二色谱
Fig.3 CD spectrum of alliinase

3 结 论

通过蒜氨酸酶的紫外可见光谱、荧光发射光谱和圆二色性测定,紫外-可见光谱结果表明,蒜氨酸酶 430nm 处的最大吸收是由于其辅助因子 5'-磷酸吡哆醛与蒜氨酸酶主链结合产生的吸收峰。325nm 附近的最大吸收是由于 PLP 的醛基与蒜氨酸酶中专一性赖氨酸残基的 ϵ -氨基活性位相连,形成了质子化的或非质子化的 PLP-Lys 醛亚胺复合物(aldimine)。荧光发射光谱结果表明,荧光信号不仅来自于 Trp、Tyr 和 Phe,也来源于蒜氨酸酶的辅助因子 5'-磷酸吡哆醛。圆二色性光谱结果表明,蒜氨酸酶的 α -螺旋结构大约占 27%~30%,几乎不存在 β -折叠结构, β -转角结构大约占 30% 左右,无规卷曲所占比例大约占 40% 左右。

参考文献:

- [1] KREST I, GLODEK J, KEUSGEN M. Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(8): 3753-3760.
- [2] NOCK L P, MAZELI M. The C-S lyases of higher plants: preparation and properties of homogeneous alliin lyase from garlic (*Allium sativum*) [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986, 249(1): 27-33.
- [3] JANSEN H, MUELLER B, KNOBLOCK K. Characterization of an alliin lyase preparation from garlic (*Allium sativum*) [J]. Planta Medica, 1989, 55(5): 434-439.
- [4] JANSEN H, MUELLER B, KNOBLOCK K. Alliin lyase from garlic, *Allium sativum*: investigations on enzyme/substrate, enzyme/inhibitor interactions, and on a new coenzyme [J]. Planta Medica, 1989, 55(5): 440-445.
- [5] KYUNG H S, JAE L L, UN Y K, et al. High pressure inactivation of alliinase and its effects on flavor of garlic [J]. Korean Journal of Food Science and Technology, 1996, 28(3): 593-599.
- [6] KREST I, KEUSGEN M. Quality of herbal remedies from *allium sativum*: differences between alliinase from garlic powder and fresh garlic [J]. Planta Medica, 1999, 65: 139-143.