

大蒜中蒜氨酸酶的氨基酸组成分析和热力学研究

李瑜^{1,2}, 许时婴^{2,*}

(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: 本文对首次采用 Sephacryl S-200 凝胶柱从新鲜大蒜中分离纯化出来的蒜氨酸酶的氨基酸组成进行了分析, 并对蒜氨酸酶的催化反应表观活化能和热失活动力学进行了研究。结果表明, 蒜氨酸酶中酸性氨基酸的含量比较高, 其中 Asp 含量最多, 摩尔百分含量达到 15.51%; 蒜氨酸酶催化反应在较低温度下即可进行且蒜氨酸酶是不耐高温的酶类。

关键词: 大蒜; 蒜氨酸酶; 氨基酸分析; 热力学

Anal yzi ng on the Ami no Aci d Composi ti on and Heat Dynami cs of Garl i c Al l i i nase

LI Yu^{1,2}, XU Shi -yi ng^{2,*}

(1. Col l ege of Food Sci ence and Technol ogy, Henan Agri cul tural Uni versi ty, Zhengzhou 450002, Chi na;

2. School of Food Sci ence and Technol ogy, Southern Yangtze Uni versi ty, Key Lab of Food Sci ence and Safety, Mi ni stry of Education, Wuxi 214036, Chi na)

Abstract: In this paper amino acid composition of garlic alliinase purified with Sephacryl S-200 column was analyzed. Apparent activation energy and heat inactivity dynamics were also studied. The results showed that the content of acidic amino acids were higher and among them the content of Asp was the highest, and its mol percentage content could reach 15.51%; the alliinase catalyzed reaction could perform at lower temperature and alliinase was temperature intolerance.

Key words: garlic; alliinase; amino acid analysis; heat dynamics

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)10-0065-04

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 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; 乔旭光等^[5] 对蒜氨酸酶的动力学特性以及蒜氨酸酶的抑制剂和激活剂进行了研究; 孙灶君等^[6] 也对蒜氨酸酶进行了动力学特性研究; Kyung 等^[7] 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^[8] 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。迄今为止, 有关蒜氨酸酶的氨基酸组成分析和热力学研究极少见有文献报道。本文主要对采用 Sephacryl S-200 凝胶柱分离纯化得到的新鲜大蒜中的蒜氨酸酶的氨基酸组成分析和热力学进行研究, 对大蒜深加工将具有重要的理论意义和实际意义。

1 材料与方法

1.1 材料

山东仓山无苔大蒜 市售; 蒜氨酸 Si gma 公司。

1.2 仪器

REC5004V20 型层析柜 美国 Kendro Laboratory; GL-20B 型冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; 搅拌式超滤杯 上海医药工业研究所; TGL-IGC 高速台式离心机 上

收稿日期: 2006-08-01

*通讯作者

作者简介: 李瑜 (1976-), 女, 讲师, 博士, 研究方向为果蔬加工。

海安亭科学仪器厂; HP1100 氨基酸专用高效液相色谱 美国安捷伦公司。

1.3 方法

1.3.1 蒜氨酸酶分离

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^{[3][9]}。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和微波真空干燥与真空干燥联合干燥法干燥蒜片的蒜氨酸粗酶液 9ml 上柱, pH7.0 缓冲液 (60mmol/L NaH_2PO_4 和 60mmol/L Na_2HPO_4 , 1%(W/V) NaCl、25 μmol/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。冷冻干燥最终得到样品。

1.3.2 反相 HPLC 测定蒜氨酸酶的纯度

仪器: Sepu3000 色谱工作站 Agilent1100; 色谱柱: ZORBAX 300SB-C18, 4.6 × 250mm; 流动相: 5% ~ 80% 乙腈(含 0.05% 三氯乙酸)梯度洗脱 30min; 检测: UV220nm; 流速: 1ml/min; 柱温: 30℃; 样品浓度: 100 μg/ml; 进样量: 10 μl。

1.3.3 氨基酸组成分析

酸水解分析样品中的 17 种氨基酸: 准确称取 10mg 样品于特制的水解管底部, 缓慢加入 8ml 6N HCl 并轻轻转动水解管, 保证样品全部在试管底部并保证样品得到全部润湿, 抽真空, 维持 10min 后, 在酒精喷灯上封口。110 ± 1℃ 水解 24h。切开水解管用去离子水全部转移到 500ml 容量瓶中、定容, 双层滤后纸过滤, 取滤液 1ml 置于 25ml 小烧杯中, 在加 NaOH 的真空干燥器中蒸干, 加入 2ml pH2.2 的盐酸溶解后, 溶液转移到样品瓶中上样用。

碱水解分析样品中的色氨酸含量: 精确称取 2 倍酸水解量的样品放入水解管中, 加入含 5% SnCl_2 的 5N NaOH 8ml, 抽真空封口 110℃ 水解 20h, 冷却、全部转移至 500ml 容量瓶中用 6N HCl 中和至中性, 定容至刻度、摇匀、用双层滤纸过滤, 上机测定。

色谱条件: 离子交换柱 2.6 × 150mm; 荧光检测器;

流速为 0.225ml/min; 流动相为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; 进样量为 50 μl。

1.3.4 蒜氨酸酶热失活动力学

酶液分别在 30、40、50、60℃ 条件下保温, 在不同的时间间隔依次取出一定的酶液, 置于冰浴中保存, 在 pH6.5、40℃ 下测定酶的残余活力。蒜氨酸酶活力采用丙酮酸法测定^[10]。

2 结果与分析

2.1 反相 HPLC 测定蒜氨酸酶的纯度

采用反相 HPLC 测定由 Sephacryl S-200 分离纯化得到的蒜氨酸酶的纯度, 见图 1。

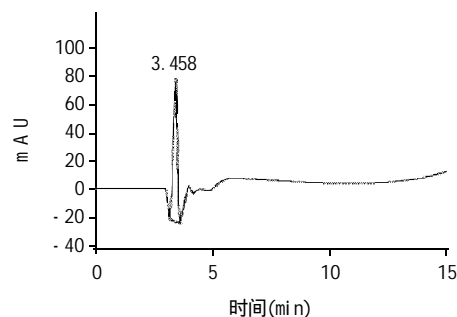


图1 蒜氨酸酶反相 HPLC 分析

Fig.1 Analysis of alliinase with reverse phase HPLC

在反相色谱中, 极性溶剂与多种溶质有很强的相互作用, 溶质与固定相之间的相互作用比较弱, 因此溶剂在决定样品保留和分离中起很大作用。在反相体系中, 极性溶质按极性大小顺序出峰, 极性大的先出峰。由反相 HPLC 图谱可知, 蒜氨酸酶保留时间为 3.458min。可见, 经过 Sephacryl S-200 凝胶柱一步分离蒜氨酸酶可达到很好的纯化效果。

2.2 氨基酸组成分析

蒜氨酸酶是一种均一的二聚体糖蛋白, 大约占蒜中可溶性蛋白质的 10% ~ 12%。蒜氨酸酶氨基酸组成见表 1。从氨基酸组成分析测定看, 蒜氨酸酶中酸性氨基酸的含量比较高, 可达 24.50%, 碱性氨基酸摩尔百分含量为 8.18%; 酸性氨基酸中又以 Asp 含量最多, 摩尔百分含量达到 15.51%, 蒜氨酸酶的 4 个 N-糖基化位点都与 Asp 相连, 分别位于 Asn19、Asn146、Asn191、Asn328; Lys 的摩尔百分含量为 4.24%, 其与蒜氨酸酶的辅助因子 5'-磷酸吡哆醛 (PLP) 相连。蒜氨酸酶的氨基酸组成决定了蒜氨酸酶的催化反应特性, 一个蒜氨酸酶分子需要两个 PLP 分子作为辅助因子参与催化, 通过氨酰基中间体与其辅助因子 PLP 结合在一起, 经受-消除-去氨基作用裂解 S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷。底物结合在酶的活性中心内靠近辅助因子的地方形成 Schiff's 碱

表1 蒜氨酸酶氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of alliinase

氨基酸	质量百分含量(%)	摩尔百分含量(%)
Asp	16.15	15.51
Glu	10.28	8.99
Ser	5.83	7.09
His	2.93	2.41
Gly	5.57	9.48
Thr	4.72	5.07
Arg	5.36	3.94
Ala	4.90	7.03
Tyr	8.25	5.81
Cys	0.85	0.90
Val	7.80	8.51
Met	0.54	0.46
Phe	3.52	2.72
Ile	4.71	4.58
Leu	8.70	8.48
Lys	4.85	4.24
Pro	3.35	3.72
Trp	1.69	1.06
酸性氨基酸	26.43	24.50
碱性氨基酸	10.21	8.18
脂肪族氨基酸	80.26	84.28
芳香族氨基酸	13.46	9.59

(见图2)。酶提供酸性基团诱导底物的S=O键极化,导致电子云重排。C-S键被切断留下一个丙烯酰胺与辅助因子结合,反应产物(蒜素)释放。

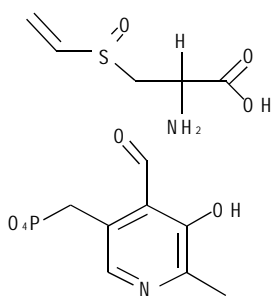


图2 Schiff's 碱
Fig.2 Schiff's alkali

2.2 蒜氨酸酶催化反应表观活化能的确定

由图3可知,新鲜大蒜的蒜氨酸酶催化反应速率常数与温度的关系为 $\ln k = \ln(1.54 \times 10^8) - 3425.7/T$,微波真空与真空联合干燥法得到的大蒜为 $\ln k = \ln(3.01 \times 10^8) - 3650.6/T$,它们都遵循Arrhenius方程 $\ln k = \ln A - E_a/RT$,因此可计算得到新鲜大蒜和微波真空与真空联合干燥法得到的大蒜中的蒜氨酸酶催化反应表观活化能分别为28.47kJ/mol和30.58kJ/mol。其表观活化能值较小,说明了温度不是蒜氨酸酶催化反应的限制性因素,蒜氨酸酶催化反应在较低温度下即可进行。微波真空与真空联合干燥法得到的大蒜中的蒜氨酸酶催化反应表观活化能

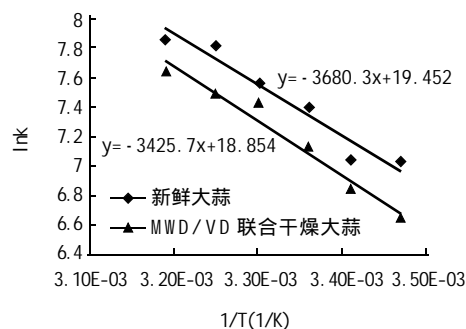


图3 不同干燥方法对蒜氨酸酶表观活化能的影响
Fig.3 The effect of different drying methods on alliinase apparent activation energy

略大于新鲜大蒜中的蒜氨酸酶,这可能是因为微波真空干燥过程中微波加热引起了蒜氨酸酶分子构象上的变化。

2.3 蒜氨酸酶热失活动力学

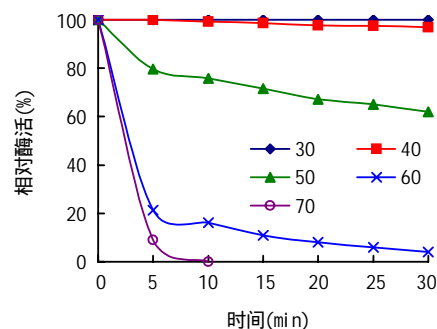


图4 蒜氨酸酶的热失活曲线
Fig.4 Curve of alliinase activity with time at different temperatures

大蒜干燥过程中蒜氨酸酶的热稳定性是个极其重要的参数。测定热失活的方法是使纯化酶溶液在一定温度下保持不同时间,然后在酶最适条件下用初速度法测定残存的酶活力。在不同失活温度下,对失活时间作图,可以得到一组酶失活曲线,该组曲线反映了蒜氨酸酶的热稳定性。

由图4可见,蒜氨酸酶在30、40条件下,酶活比较稳定,50条件下酶活缓慢下降,酶活在30min内损失了35%左右,60条件下酶活迅速下降,酶活在30min内损失了90%左右,70条件下酶活急剧下降,10min后蒜氨酸酶完全失活。因此,蒜氨酸酶是不耐高温的酶类。

3 结论

蒜氨酸酶的氨基酸组成中酸性氨基酸的含量比较高,可达24.50%,酸性氨基酸中又以Asp含量最多,摩尔百分含量达到15.51%。新鲜大蒜和微波真空与真空联合干燥法得到的蒜氨酸酶的催化反应活化能分别为28.47kJ/mol和30.58kJ/mol,其活化能值较小,说明蒜

迎春花黄色素的化学及光谱性质研究

唐琳, 于 旻

(山东师范大学生命科学学院食品科学系, 山东 济南 250014)

摘 要: 采用薄层、化学反应、紫外-可见光谱、红外光谱和高效液相色谱等方法, 分析了迎春花黄色素的基本性质。结果表明, 迎春花黄色素主要成分为黄酮类和类胡萝卜素类; 黄酮成分主要是芦丁, 类胡萝卜素具有双键、羰基和羟基。

关键词: 迎春花; 黄色素; 化学; 光谱; 性质

Study on Chemical and Spectral Characters of Yellow Pigment of *Jasminum Nudi florum* Lind

TANG Lin, YU Yang

(Department of Food Science, College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: The paper makes an analysis of the basic components of the yellow pigment from *Jasminum Nudi florum* Lind with thin layer chromatography, chemical reaction, UV-visible absorption spectrum, IR spectrum and HPLC. The results indicate that the chief chemical components of *Jasminum Nudi florum* Lind consist of flavonoids and carotenoids. One is the rutin, the other is carotenoids consisting of double bond, carbonyl and hydroxyl.

Key words: *Jasminum Nudi florum* Lind; yellow pigment; chemistry; spectrum; character

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)10-0068-05

迎春花(*Jasminum nudiflorum* Lind), 别名金腰带, 是木犀科素馨属植物, 株高达 1~5 m, 广泛分布于我国的北部及中部地区, 多生长于山坡润边, 在各公园及

庭院普遍栽培。每年 2~3 月开花, 花期 2~4 个月, 一般不结果^[1]。迎春花的花、叶为民间常用草药, 含丁香甙、迎春花苷和迎春花苦味质, 有清热解毒之功效^[2]。

收稿日期: 2006-07-15

作者简介: 唐琳(1961-), 女, 副教授, 主要从事天然产物的研究与开发。

氨酸酶催化反应在较低温度下即可进行。蒜氨酸酶在 30、40 条件下, 酶活比较稳定, 50 条件下酶活缓慢下降, 60 条件下酶活迅速下降, 70 条件下酶活急剧下降。因此, 蒜氨酸酶是不耐高温的酶类。

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, Mazell S M. The C-S lyases of higher plants: preparation and properties of homogeneous alliinase from garlic (*Allium sativum*) [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986, 249(1): 27-33.
- [3] Jansen H, Mueller B, Knobloch K. Characterization of an alliinase preparation from garlic (*Allium sativum*) [J]. Planta Medica, 1989, 55(5): 434-439.
- [4] Jansen H, Mueller B, Knobloch 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] 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): 42-46.
- [6] 孙灶君, 高孔荣. 蒜酶及其动力学研究[J]. 食品科学, 1995, 16(9): 13-15.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Owen R Fennema. 食品化学[M]. 王璋, 许时婴, 等译. 北京: 中国轻工业出版社, 2003. 4.
- [10] 李瑜, 许时婴. 不同干燥方法对大蒜的蒜氨酸酶活力的影响[J]. 食品工业科技, 2005, 26(9): 80-83.