

大蒜蒜酶的提取纯化及其酶学性质

曹红^{1,2}, 陈坚^{1*}

(1. 新疆医科大学药学院 药物分析教研室, 新疆 乌鲁木齐 830054;

2. 石河子大学化学化工学院 化学系, 新疆 石河子 832000)

摘要:大蒜为百合科多年生草本植物,可药食两用,一直受到青睐。大蒜主要具有抗感染、防治心脑血管疾病、抗肿瘤等功效。目前公认大蒜的功效成分是蒜酶(alliinase, EC 4.4.1.4)催化裂解蒜氨酸(alliin)产生的大蒜辣素(allicin)、阿霍烯(ajoene)等系列含硫有机化合物。主要从大蒜的功效成分、蒜酶的提取纯化、蒜酶的酶学性质及展望等方面综述了蒜酶的研究进展。表明大蒜制剂以其独特的显著功效,必将为人类的健康做出巨大贡献。

关键词:大蒜;蒜酶;酶学性质

中图分类号:R284.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)01-0154-03

Extraction and purification of alliinase from garlic and its enzymology properties

CAO Hong^{1,2}, CHEN Jian¹

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

2. Department of Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Key words: garlic; alliinase; enzymology properties

大蒜 *Allium sativum* L. 为百合科葱属多年生草本植物。2005年, Kamenetsky等^[1]在 Tien Shan 山脉进行的关于原始大蒜类型的研究确认亚洲中部是大蒜进化和多样性的最重要的中心。近年来,研究大蒜药用成分成为国内外医药领域的热点,尤其在心血管病和恶性肿瘤的防治方面,大蒜引起了科学家们的极大兴趣。大量的研究表明,在心血管疾病的防治方面,大蒜具有降血脂^[2~4]、抗血栓^[5~8]、降血压^[9]、防治动脉粥样硬化^[10~12]等功效;在抗肿瘤方面,大蒜对胃癌^[12~14]、结肠癌^[15~17]、口腔癌、食管癌、子宫癌、乳腺癌、皮肤癌^[18]等具有治疗或预防作用。

1 大蒜的功效成分

目前公认大蒜的功效成分是蒜酶(alliinase, EC 4.4.1.4)催化裂解 S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷(S-allyl-L-cysteine sulfoxide),即蒜氨酸(alliin),而产生的大蒜辣素(allicin)、阿霍烯(ajoene)等系列含硫有机化合物^[19,20](图1)。

蒜酶酶促反应的底物蒜氨酸存在于大蒜细胞质中,而蒜酶存在于大蒜细胞的液泡中。当大蒜完整细胞受损时,蒜酶和蒜氨酸相遇,发生反应,生成系列含硫有机化合物^[21]。

2 蒜酶的提取纯化

目前,蒜酶提取纯化主要采用一系列的蛋白质分离纯化技术,如盐析、亲和色谱及凝胶过滤等生物技术。基本步骤大致为:鲜蒜去皮,浸提,匀浆,离心;取上清液,盐析,离心,取沉淀,重溶,离心;取上清液,经色谱分离,得纯化蒜酶。除去皮外,以上操作均在4℃下完成。由于研究者们选用原料的

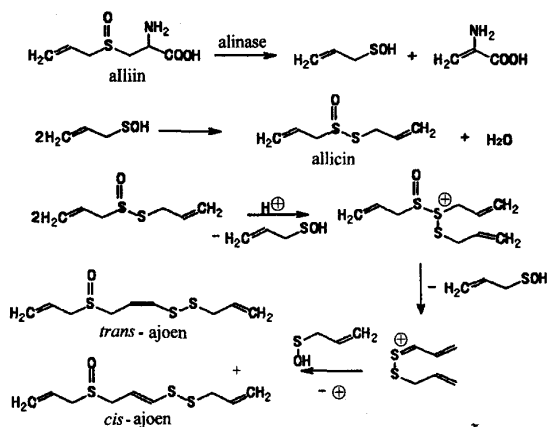


图1 大蒜蒜酶的酶促反应

Fig. 1 Enzymatic reaction of alliinase from garlic

品种和来源不同,浸提液、沉淀剂、脱盐方法和色谱柱存在差别以及酶活力测定方法的不同,得到结果也不尽相同^[22~31]。2002年, Kuettner等从埃及鲜蒜得到比活力为660 μmol/(min·mg)(丙酮酸法,以外消旋蒜氨酸为底物)的高纯度蒜酶和蒜酶的晶体^[28]。从国内外文献报道来看,这也是迄今为止,在实验室中得到的活力和纯度最高的蒜酶。

3 蒜酶的组成和结构

大蒜蒜酶是二聚体糖蛋白(两个亚基相对分子质量均为5.15×10⁴),属于依赖5'-磷酸吡哆醛(PLP)酶的第一家族。

收稿日期:2006-05-26

基金项目:新疆维吾尔自治区高技术研究与发展计划资助项目(200511112)

作者简介:曹红(1969—),女,博士研究生,研究方向:药物分析。 Tel:13201338880 E-mail:chyf_ch@126.com

*通讯作者 陈坚 Tel:(0991)4362246

2002年 Kuettner 等通过圆二色光谱数据预测表明蒜酶的 α -螺旋结构为27%~30%;氨基酸序列预测 α -螺旋结构为29%。 α -螺旋结构比其他依赖PLP类型I的酶要低。蒜酶的结晶为黄色,这是由于与蛋白质结合的辅酶因子PLP的缘故^[28]。

蒜酶三维结构为典型的依赖PLP酶I的S型折叠。每个蒜酶单体由3个截然不同的结构域组成。即1个独特的N-端结构域(2~100个氨基酸残基,含有一个新颖的类表皮生长因子的结构域,其中半胱氨酸排列方式C-x₁₈₋₁₉-C-x-C-x₂-C-x₅-C-x₆-C在依赖PLP的酶中是唯一的),中心是5'-磷酸吡哆醛结合的结构域和1个C-端结构域(311~427个氨基酸残基)。蒜酶亚基上核心糖结构是一个典型的植物糖蛋白的糖链结构:甘露糖(β -1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖(β -1,4)-N-乙酰氨基果糖(α -1,3)-N-乙酰氨基葡萄糖。糖基化位点Asn₁₄₆位于酶的二聚体之间,通过糖链把2个亚基结合在一起^[32]。

4 影响蒜酶稳定性的因素

4.1 温度:冷冻和融化过程中,蒜酶活力不可逆损失近40%^[27],原因可能是冷冻过程中,水首先结成冰,酶和盐的浓缩导致酶周围环境的pH和离子强度发生变化。离子强度变大可使寡聚蛋白分离。当浓缩作用伴随着结构改变时,分子内的巯基二硫化物发生变化。因此,融冻可诱导蒜酶结构的改变而失活。此外,冰晶能破坏蛋白质分子表面疏水域周围分子的有序排列,使暴露的疏水域相互作用,发生聚合和沉淀,导致蒜酶变性失活^[33]。

4.2 压力:蒜酶的活力会随着压力的增大而明显降低。冷冻干燥制成的蒜酶粉酶活力降低程度取决于所施加的压力。压力施加到500 MPa时,活力降低到原来的58%,酶活力的倒数与压力之间的关系遵循一次方程;若做更大范围的测定,对于蒜酶活性与压力的关系可以用一个二次方程式描述:相对活力⁻¹ = $-4 \times 10^{-9} X^2 + 10^{-5} X + 0.0103$ (X 为压力)^[27]。

4.3 辅酶因子:PLP为蒜酶的辅酶因子。PLP对酶活力的影响表现为:若单位加入25 μ mol/L PLP,对蒜酶的稳定性没有显著影响,而同时加入25 μ mol/L、10%蔗糖和1%的NaCl后,酶活力明显增加,并且在-20℃保存500 d,活力并没有明显降低^[27]。

蒜酶完全失活后,天然蛋白凝胶电泳图谱显示一系列的高相对分子质量的蛋白条带,说明蒜酶已分解为4、8或更多个亚基。紫外光谱显示该酶在430 nm处已没有明显吸收(该吸收带是含有PLP酶的典型吸收,如蒜酶)。将失去活力的蒜酶重新加入含有PLP的缓冲液中,其活力并未明显增加。由此推断,很可能是由于蛋白质构相发生改变,丢失了PLP^[22]。

4.4 金属离子和EDTA:乔旭光等先后两次实验证明Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺等金属离子皆可不同程度地提高蒜酶活性,其中以Fe²⁺效果最为明显,其次是Ca²⁺;重金属离子Cu²⁺则较强烈地抑制了蒜酶活性,证实蒜酶具有离子活性中心;同时EDTA对蒜酶的激活进一步证实了以上结论,可能与络合重金属离子有关^[34,35]。

4.5 pH:大蒜蒜酶室温下保存3 h,在pH值4~7内相对稳

定,pH>7时酶的活性开始降低。当pH>9或<4时,酶的活性迅速下降。若长时间(>12 h)保存,该酶仅在pH 6~7的较小范围内保持较高的活性^[29]。

5 蒜酶酶动力学特性

5.1 蒜酶酶促反应的最适底物:蒜酶对不同底物所表现的活性不同,甚至对同一种底物不同异构体所表现的活力差异都很大。米氏常数(K_m)是酶的特征常数之一,它仅与酶的性质有关,而与酶的浓度无关,值越小,表示酶与底物的亲和力越大。 K_m 值最小的底物称为酶的最适底物。

1999年Krest等用不同的底物测定了大蒜蒜酶的酶活,发现蒜酶对L-(+)-蒜氨酸表现出最大活力。以L-(+)-蒜氨酸作为底物时,测定蒜酶的 K_m 为1.6 mmol/L,最大反应速度 V_{max} 为252 mmol/(min·mg),而以L-(-)-蒜氨酸作为底物时,蒜酶 K_m 为2.8 mmol/L,最大反应速度 V_{max} 为54 mmol/(min·mg)。显然,天然右旋异构体更适合作底物^[22]。2000年,Krest等又用不同的底物测定了9种葱属植物蒜酶的酶活,发现9种作物中的蒜酶都对L-(+)-蒜氨酸表现出最大的酶活,这也说明了蒜酶活性中心的结构均更适合L-(+)-蒜氨酸^[36]。

5.2 蒜酶酶促反应的最适温度:温度对酶促反应的速率的影响表现在两个方面:当温度升高时,与一般化学反应一样,反应速率加快。由于酶是蛋白质,随着温度的升高,使酶蛋白逐渐变性而失活,引起酶反应速率下降。酶所表现的最适温度是这两种影响的综合结果。

以天然的S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷(蒜氨酸)为底物,反应3 min,分别测定25~60℃的酶活,确定酶反应的最佳温度为35℃^[29]。以合成的S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷为底物,10~70℃,分别测定不同反应温度对活力的影响。结果显示,蒜氨酸酶在25~45℃内有较好的稳定性,其最适反应温度为30℃。同时,蒜氨酸酶在低温区(30℃以下)比高温区(45℃以上)活性随温度变化平缓,超过30℃后,酶活性随温度升高而急剧下降^[35]。

5.3 蒜酶酶促反应的最适pH:酶的催化活力受pH值影响较大,在大多数情况下,酶催化反应一定pH条件下具有最大的反应速度,高于或低于此pH值,反应速度都会有下降,通常称此pH值为酶的最适反应pH值。

在23℃下,以天然的S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砷为底物,蒜酶酶促反应的最适pH为6.5^[29]。

5.4 蒜酶酶促反应的竞争性抑制剂:L-半胱氨酸能与蒜酶反应的磷酸吡哆醛反应形成四氢噻唑,因而对蒜酶具有较强的抑制作用^[24]。此外,羟胺硫酸盐和鱼藤酮对蒜酶也具有抑制作用^[37]。

6 展望

由于大蒜有效成分的分离、提取或人工合成十分困难,蒜氨酸及大蒜辣素等单体的价格十分昂贵,而且大蒜辣素化学性质极不稳定,易分解,一直无法直接制成药物制剂应用于临床。因此目前国内外的研究思路是从鲜蒜中分别提取化学性质相对稳定的蒜氨酸及蒜酶,然后研发大蒜高效新制剂

(由蒜氨酸单体、蒜酶单体组成),在体内释放大蒜辣素、阿霍烯等有效成分,其疗效将优于同类其他制剂。进入21世纪,大蒜制剂以其独特的显著功效,必将进入千家万户,为人类的健康做出巨大贡献。

References:

- [1] Kamenetsky R, Shafir I L, Khassanov F, *et al.* Diversity in fertility potential and organo-sulphur compounds among garlics from central Asia [J]. *Biodiv Conserv*, 2005, 14: 281-295.
- [2] Ackermann R T, Mulrow C D, Ramirez G, *et al.* Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors [J]. *Arch Intern Med*, 2001, 161(6): 813-824.
- [3] Alder R, Lookinland S, Berry J A, *et al.* A systematic review of the effectiveness of garlic as an anti-hyperlipidemic agent [J]. *J Am Acad Nurse Prac*, 2003, 15(3): 120-129.
- [4] Stevinson C, Pittler M H, Ernst E. Garlic for treating hypercholesterolemia. A meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Ann Intern Med*, 2000, 133(6): 420-429.
- [5] Chan K C, Hsu C C, Yin M C. Protective effect of three diallyl sulphides against glucose-induced erythrocyte and platelet oxidation, and ADP-induced platelet aggregation [J]. *Thromb Res*, 2002, 108(5-6): 317-322.
- [6] Lawson L D, Ransom D K, Hughes B G. Inhibition of whole blood platelet-aggregation by compopunds in garlic clove extracts and commercial garlic products [J]. *Thromb Res*, 1992, 65(2): 141-156.
- [7] Steiner M, Li W. Aged garlic extract, a modulator of cardiovascular risk factors; a dose-finding study on the effects of AGE on platelet functions [J]. *J Nutr*, 2001, 131(3S): 980S-984S.
- [8] Rahman K, Billington D. Dietary supplementation with aged garlic extract inhibits ADP-induced platelet aggregation in humans [J]. *J Nutr*, 2000, 130(11): 2662-2665.
- [9] Silagy C A, Neil H A. A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure [J]. *J Hyperten*, 1994, 12: 463-468.
- [10] Ferri N, Yokoyama K, Sadile M, *et al.* Ajoene, a garlic compound, inhibits protein prenylation and arterial smooth muscle cell proliferation [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 138(5): 811-818.
- [11] Campbell J H, Efendy J L, Smith N J, *et al.* Molecular basis by which garlic suppresses atherosclerosis [J]. *J Nutr*, 2001, 131(3S): 1006S-1009S.
- [12] Golovchenko I, Yang C H, Goalstone M L, *et al.* Garlic extract methylallyl thiosulfinate blocks insulin potentiation of platelet-derived growth factor-stimulated migration of vascular smooth muscle cells [J]. *Metabolism*, 2003, 52(2): 254-259.
- [13] Takezaki T, Gao C M, Ding J H, *et al.* Comparative study of lifestyles o residents in high and low risk areas for gastric cancer in Jiangsu Province, China; with special reference to *allium* vegetables [J]. *J Epidemiol*, 1999, 9(5): 297-305.
- [14] Kim H J, Chang W K, Kim M K, *et al.* Dietary factors and gastric cancer in Korea; a case-control study [J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(4): 531-535.
- [15] Fleischauer A T, Poole C, Arab L. Garlic consumption and cancer prevention; meta-anaoyes of colorectal and stomach cancers [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72(4): 1047-1052.
- [16] Hu J F, Liu Y Y, Yu Y K. Diet and cancer of the colon and rectum; a case-control study in China [J]. *Int J Epidemiol*, 1991, 20(2): 362-367.
- [17] Levi F, Pasche C, La Vecchia C, *et al.* Food groups and colorectal cancer risk [J]. *Br J Cancer*, 1999, 79(7-8): 1283-1287.
- [18] Wu X, Kassie F, Mersch-Sundermann V. Induction of apoptosis in tumor cells by naturally occurring sulfur-containing compounds [J]. *Mutat Res*, 2005, 589(2): 81-102.
- [19] Manabe T, Hasumi A, Sugiyama M, *et al.* Alliinase [S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase] from *Allium tuberosum* (Chinese chive)-purification, localization, cDNA cloning and heterologous functional expression [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 257(1): 21-30.
- [20] Tapiero H, Townsend D M, Tew K D. Organosulfur compounds from alliaceae in the prevention of human pathologies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2004, 58(3): 183-193.
- [21] Ellmore S, Feldberg R S. Allin lyase locatization in bundle sheaths of the garlic clove (*Allium sadvum* L.) [J]. *Am J Botany* [J]. 1994, 81: 89-94.
- [22] Krest I, Keusgen M. Quality of herbal remedies from *Allium sativum*; differences between alliinase from garlic powder and fresh garlic [J]. *Planta Med*, 1999, 65: 139-143.
- [23] Schwimmer S, Mazelis M. Characterization of alliinase of *Allium cepa* (onion) [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1963, 100: 66-73.
- [24] Mazelis M, Crews L. Purification of the allin lyase of garlic. *Allium sativum* L. [J]. *Biochem J*, 1968, 108: 725-730.
- [25] Nock L P, Mazelis M. The C-S lyases of higher plants; prepartion and properties of homogeneous allin lyase from garlic (*Allium sativum*) [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1986, 249(1): 27-33.
- [26] Nock L P, Mazelis M. The C-S-lyases of higher plants direct comparison of the physical properties of homogeneous allin lyase of garlic and onion [J]. *Plant Physic*, 1987, 85: 1079-1083.
- [27] Krest I, Keusgen M. Stabilization and pharmaceutical use of alliinase [J]. *Pharmazie*, 1999, 54(4): 289-293.
- [28] Kuettner B E, Hilgenfeld R, Weiss S M. Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 402: 192-200.
- [29] Qin X C. Study on separation, purification, and properties of alliinase from garlic [A]. *Master Degree Paper of Shandong Agricultural University* [D]. Shangdong: Shandong Agricultural University, 2004.
- [30] Sun J S, Gao K R. Study on alliinase and its kinetic characteristics [J]. *Food Sci*, 1995, 16(9): 13-15.
- [31] Rabinkov A, Zhu X Z, Grafi G, *et al.* Alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*). Biochemical characterization and cDNA cloning [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, 48(3): 149-171.
- [32] Kuettner B E, Hilgenfeld R, Weiss S M. The active principle of garlic at atomic resolution [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 46402-46407.
- [33] Waffler U, Shaw M L, Lancaster J E. Effect of freezing upon alliinase activity in onion extracts and pure enzyme preparations [J]. *J Sci Food Agric*, 1994, 64: 315-318.
- [34] Qiao X G, Zhang Z H, Han Y S. Study on the kinetic characteristics of alliinase (*Allium satvum* L.) [J]. *J Shandong Agric Univ* (山东农业大学学报), 1999, 30(1): 42-46.
- [35] Qiao X G, Zhang Z H, Qin X C. Study on the purification and kinetic characteristics of alliinase [J]. *Food Ferment Ind*, 2004, 30(9): 1-4.
- [36] Krest I, Glodek J, Keusgen M. Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some *Allium* species [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 3753-3760.
- [37] Jansen H, Müller B, Knobloch K. Alliin lyase from garlic, *Allium sativum*; Investigations on enzyme/substrate, enzyme/inhibitor interactions, and a new coenzyme [J]. *Planta Med*, 1989, 55: 440-445.