

金属离子及保护剂对深绿木霉 T₁₅₅ 产芥子酶的活性影响 及芥子酶的分离纯化

孙迪^{1,2} 马艳^{1,2*} 安霞¹ 顾志光¹ 王光飞² 王秋君²

(1. 南京农业大学 生命科学院 江苏 南京 210095)

(2. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所 江苏 南京 210014)

摘要:【目的】探求金属离子及保护剂对深绿木霉 T₁₅₅ 产生的粗芥子酶液活性的影响以及芥子酶的分离纯化方法。【方法】通过添加不同浓度的金属离子及保护剂研究对芥子酶活性的影响并通过细胞破壁、硫酸铵沉淀、透析、Sephadex G-100 柱层析、DEAE-52 离子交换层析、Sephadex G-200 柱层析等方法提取到纯的芥子酶，最后通过电泳检测芥子酶的纯度和分子量。

【结果】研究发现 Ag⁺、Zn²⁺、Pb²⁺、Mg²⁺、Hg²⁺、Fe³⁺ 等金属离子在低浓度时对芥子酶均表现为一定的促进作用，但达到一定浓度后则起抑制作用，Ca²⁺ 浓度在 0.069–17.000 g/L 范围内均对酶活性起到促进作用，且促进效果基本与 Ca²⁺ 浓度成正比；添加 1 mmol/L EDTA 和 3 mmol/L DTT 对芥子酶的保护作用最好，4 °C 保存 26 d 后芥子酶能够保持 85% 活性；电泳分析该芥子酶的分子量大约在 150 kD 左右，并且是一个二聚体。【结论】Ca²⁺ 在实验浓度内主要是提高芥子酶活性，而其他金属离子对芥子酶活性主要起抑制作用；EDTA 或者 EDTA 与 DTT 协同能够较好保持芥子酶活性的稳定性；通过一系列分离纯化步骤得到了纯的二聚体芥子酶，研究结果为挖掘产芥子酶的微生物资源提供了新的途径和思路。

关键词: 深绿木霉 T₁₅₅, 芥子酶, 保护剂, 电泳, 分子量

Effects of metal ions and protectants on myrosinase activity and purification of myrosinase from *Trichoderma atroviride* T₁₅₅

SUN Di^{1,2} MA Yan^{1,2*} AN Xia¹ GU Zhi-Guang¹ WANG Guang-Fei² WANG Qiu-Jun²

(1. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

(2. Institute of Agricultural Resources and Environment, Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China)

Abstract: [Objective] To examine the effects of metal ions and protectants on activity of myrosinase and explore purification method of myrosinase produced by *Trichoderma atroviride* T₁₅₅. [Methods] By concentration of metal ions and protectants to study of the myrosinase activity was measured by adding different ions with different concentration and three protectants, respectively. The pure

基金项目: 农业部公益性行业专项项目(No. 201103004-9); 江苏省科技支撑计划项目(No. BE2012379)

*通讯作者: Tel: 86-25-84390248; ✉: myjaas@sina.com

收稿日期: 2013-12-19; 接受日期: 2014-03-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-03-17

myrosinase was obtained by cell disruption, ammonium sulfate precipitation, dialysis, Sephadex G-100 chromatography, DEAE-52 chromatography and Sephadex G-200 chromatography in order. [Results] The results showed that Ag^+ , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} promoted enzyme activity of myrosinase at low concentration and inhibited enzyme activity at high concentration, Ca^{2+} promoted enzyme activity at the concentration of 0.069–17.000 g/L. 1 mmol/L EDTA associated with 3 mmol/L DTT was the best treatment for keeping myrosinase activity, and 85% enzyme activity was retained after 27 days of preservation at 4 °C. Molecular weight of the myrosinase produced by T₁₅₅ was about 150 kD by SDS-PAGE, and this myrosinase was a dimer. [Conclusion] The tested metal ions inhibited myrosinase activity except for Ca^{2+} , EDTA or associated with DTT showed preferable effect on maintaining myrosinase activity. A dimer myrosinase was obtained by separation and purification technology. This study intended to provide a new way and idea for mining myrosinase producing microorganism.

Keywords: *Trichoderma atroviride* T₁₅₅, Myrosinase, Protectant, Electrophoresis, Molecular weight

芥子酶是一种 β-硫代葡萄糖苷水解酶,在一定条件下可以分解硫代葡萄糖苷产生葡萄糖、硫酸盐、异硫氰酸盐、乙腈、硫氰酸盐等物质^[1]。芥子酶分解硫代葡萄糖苷产生的异硫氰酸酯不但在植物抵抗微生物和害虫侵染中发挥着重要作用,而且能显著提高以芸薹属植物为生物熏蒸材料防控土传病害的效果^[2];芸薹属家族成员如黑芥和 *B. oleracea* (花椰菜、椰菜、甘蓝)的与众不同的食用风味也依赖于硫代葡萄糖苷的酶解^[3];芥子酶还能够分解菜籽饼中的硫代葡萄糖苷从而提高菜粕在饲料等方面的价值;除此之外,近年来有报道称硫代葡萄糖苷的芥子酶分解产物在抗癌方面也发挥着重要作用^[4]。

芥子酶主要存在于十字花科芸薹属植物中,比如茎用芥菜、萝卜等^[5]。目前,商业产品的芥子酶主要从植物里面提取,赵国华从茎用芥菜中提取到芥子酶,此芥子酶的分子量为 105 000^[6],刘月萍从西兰花中提取到的芥子酶的最适反应温度和 pH 值分别为 45 °C、pH 6.0^[7],Van Eyle D.芥菜籽 (*Sinapis alba* L.)中提到纯黑芥子酶,并且芥子酶的比活力达到 15.45 U/mg,提纯倍数为 12.3^[8],Carina 和 Georg 测定了拟南芥不同器官中芥子酶的活性^[9]。但气候、植物来源、耕地面积紧张及提取工艺复杂等因素制约了植物源芥子酶的大规模和商业化生产,使得芥子酶生产成本一直居高不下。已

有文献关于微生物代谢产芥子酶的报道,Chen 和 Halkier 从啤酒酵母中提取到芥子酶,并测得此芥子酶的最适反应温度在 30 °C^[10],另外,文献报道霉菌的链格孢属、茎点霉也能够产芥子酶,其产生的芥子酶的最适反应温度也在 30 °C 左右^[11]。利用微生物发酵生产芥子酶具有不受时间和季节限制、规模多样、产量高、质量稳定且提取工艺简单的优点,有较好的商业化前景。木霉是广泛存在于环境中的一类有益真菌,具有易于培养、生长速度快和生物量大等优点,许多菌株因为高产纤维素酶、葡聚糖酶等已在农业、食品和医药行业被开发为商业化产品,目前国内外未见利用木霉菌株产芥子酶的相关报道。

本实验室从土壤中筛选获得产芥子酶的深绿木霉 T₁₅₅,申请并获得了国家发明专利^[12]。前期工作对 T₁₅₅ 产芥子酶的部分酶学性质,如最适反应温度和温度稳定性、最适反应 pH 和 pH 稳定性、Vc 对芥子酶活性的激活作用以及芥子酶的米氏常数进行了研究^[13]。为全面了解所产芥子酶的酶学性质,为将来芥子酶的开发应用提供理论支撑,本文继续开展金属离子对芥子酶活性影响以及稳定酶的保护剂等研究工作,并采用硫酸铵沉淀、透析、离子交换层析、分子筛层析等系列分离技术进行了芥子酶的分离纯化以及通过电泳进行了芥子酶分子量的初步测定,以期挖掘产芥子酶的微生物资

源提供新的途径和思路。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

深绿木霉 *T₁₅₅* (*Trichoderma atroviride T₁₅₅* 菌保藏号: 5609), 由本实验室筛选保存。

培养基: PDA 培养基, 用于深绿木霉 *T₁₅₅* 菌株的活化及平板培养。

BaCl₂ 培养基: 氯化钡 2.5 mmol/L、琼脂 18 g/L。用于深绿木霉 *T₁₅₅* 产芥子酶的鉴定。

燕麦培养基: 用天平称取 20 g 用粉碎机磨碎的燕麦粉(市售)然后加入去离子水至 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 冷却待用。用于液体培养深绿木霉 *T₁₅₅* 获得鲜菌丝。

1.2 实验方法

1.2.1 深绿木霉 *T₁₅₅* 产芥子酶粗酶液的制备^[13]: 将在 PDA 平板上培养 3 d 的新鲜菌丝用直径为 7 mm 的打孔器打孔后, 接种 3 块菌碟至 100 mL 燕麦培养基中, 然后在 28 °C, 转速为 180 r/min 的摇床中培养。培养 3 d 后用灭菌的 4 层纱布过滤菌丝体, 并用超纯水冲洗 3 遍。添加菌丝湿重约 5 倍的 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液, 用超声波细胞粉碎机(功率 200 W, 时间 10 min)对菌丝体进行破壁处理。将破壁后的菌丝细胞液置于 4 °C 放置 1 h, 然后在 4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 15 min。取上清液 100 mL 并添加硫酸铵至饱和度的 80%, 放置在 4 °C 3 h, 随后在 11 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液将沉淀用 5 mL Tris-HCl 溶解, 之后置于分子截留量为 50 kD 的透析袋中, 在 500 mL Tris-HCl 中 4 °C 透析 24 h (预备实验证明 24 h 可以达到透析平衡), 从而得到芥子酶的粗酶液。

1.2.2 深绿木霉 *T₁₅₅* 所产芥子酶对底物黑芥子酸钾的分解能力平板测定研究: 芥子酶分解黑芥子酸钾产生的硫酸根离子能够与 BaCl₂ 培养基中的钡离子结合生成沉淀, 因此可以通过观察平板中沉淀的产生与否初步判断深绿木霉 *T₁₅₅* 粗酶提取液中

芥子酶的活性。

取 100 μL 粗酶液与 100 μL 50 mmol/L 的黑芥子酸钾溶液(Sigma 公司)混合, 然后 30 °C 条件下反应 30 min, 取 100 μL 反应产物滴加到用 5 mm 打孔器打孔的 BaCl₂ 平板中, 然后设置对照[(1) 加入 100 μL 去离子水; (2) 加入 100 μL 50 mmol/L 的黑芥子酸钾溶液; (3) 加入 100 μL 粗酶液], 1 h 后观察平板中是否有沉淀产生。

1.2.3 深绿木霉 *T₁₅₅* 产芥子酶酶活测定: 底物: 50 mmol/L 黑芥子酸钾溶液(Sigma 公司)。

黑芥子酸钾在芥子酶催化下可以降解生成一分子的葡萄糖和糖苷配基。通过测定单位时间内葡萄糖的增加量即可间接计算出酶活。葡萄糖的测定方法: 铁-邻菲罗啉分光光度法^[14-15]。

酶活力单位的定义: 在 30 °C 条件下, 每分钟催化 1 nmol 底物转化为产物所需要的酶量为一个酶活力单位, 即 1 U。

1.2.4 不同金属离子对深绿木霉 *T₁₅₅* 产芥子酶活性的影响: 取底物溶液 50 μL, 加入不同浓度的金属离子(Ag⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Pb²⁺、Mg²⁺、Hg²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺)溶液 20 μL, 使反应体系中各金属离子的浓度依次为 Ag⁺(40.0–19 984.7 mg/L)、Ca²⁺(34.6–17 294.1 mg/L)、Zn²⁺(32.1–16 035.3 mg/L)、Pb²⁺(38.2–19 117.6 mg/L)、Mg²⁺(58.0–28 996.5 mg/L)、Hg²⁺(31.9–15 970.6 mg/L)、Cu²⁺(58.8–29 375.3 mg/L)、Fe³⁺(32.07–16 035.29 mg/L), 再加入 10 μL 粗酶液, 置于 30 °C 反应 15 min, 沸水浴 5 min 以灭活酶, 然后再测定产物葡萄糖的生成量, 进而计算出酶活。以不添加金属离子溶液的处理作为对照。

1.2.5 稳定深绿木霉 *T₁₅₅* 所产芥子酶的保护剂的筛选研究: 分别取粗芥子酶液 10 mL 依次加入 EDTA、DTT 和甘油, 使其在粗芥子酶液中分别达到以下浓度: (1) EDTA 为 1 mmol/L; (2) DTT 为 3 mmol/L; (3) 甘油为 5%; (4) EDTA 与 DTT 分别为 1、3 mmol/L; (5) EDTA 与甘油分别为 1 mmol/L、5%; (6) DTT 与甘油分别为 3 mmol/L、5%; (7) EDTA、DTT 与甘油分别为 1 mmol/L、3 mmol/L、

5%，对照为不加任何保护剂的粗芥子酶液。将 8 种酶液放置在 4℃ 下保存 1、3、10、17、26 d 并测酶活。

1.2.6 蛋白质含量的测定: 蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法^[16]。

1.2.7 深绿木霉 T₁₅₅ 产芥子酶的分离纯化: 取透析后得到的粗芥子酶液进行以下分离纯化操作: [缓冲液: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)]

Sephadex G-100 柱层析^[17]: 将透析后的粗酶液 5 mL 加到用 Tris-HCl 平衡好的 Sephadex G-100 凝胶柱上, 然后用 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 保持流速 0.3 mL/min, 在 280 nm 下检测并收集各个洗脱峰进行芥子酶活性测定(HD-5 电脑紫外检测仪, 上海沪西分析仪器厂有限公司)。

DEAE-52 纤维素柱层析^[18-19]: 将 Sephadex G-100 柱层析后有芥子酶活性的洗脱液用 PEG-20000 浓缩, 然后将浓缩后的洗脱液加到用 Tris-HCl 平衡后的纤维素柱上, 用 200 mL 缓冲液和 200 mL 含 1 mol/L NaCl 的缓冲液进行梯度洗脱, 保持流速 0.3 mL/min, 在 280 nm 下检测并收集各个洗脱峰进行芥子酶活性的测定。

Sephadex G-200 柱层析^[7]: 将 DEAE-52 离子交换层析收集到的活性峰用 PEG-20000 进行浓缩, 然后上样于用 Tris-HCl 缓冲液平衡好的 Sephadex G-200 层析柱上, 保持流速 0.1 mL/min 中进行洗脱, 在 280 nm 下检测并收集各个洗脱峰进行芥子酶活性的测定。

电泳^[20-21]: 将 Sephadex G-200 柱层析后得到的酶液用 PEG-20000 进行浓缩, 然后取 10 μL 进行 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 电泳。

2 结果与分析

2.1 深绿木霉 T₁₅₅ 所产芥子酶对底物黑芥子酸钾的分解能力平板测定

图 1A 为深绿木霉 T₁₅₅ 在 PDA 平板上培养 4 d 后的菌落性状。图 1B 表明除了第四孔周围产生均匀的白色沉淀, 其余三孔周围都没有沉淀产生, 说

明在黑芥子酸钾与深绿木霉 T₁₅₅ 芥子酶粗酶提取液反应体系中含有 SO₄²⁻, 该 SO₄²⁻ 与平板培养基中的 Ba²⁺ 结合生成 BaSO₄ 沉淀, 而其余体系中均没有 SO₄²⁻, 表明粗酶提取液能够分解黑芥子酸钾产生 SO₄²⁻, 具有芥子酶活性。

2.2 金属离子对深绿木霉 T₁₅₅ 所产芥子酶活性的影响

分析图 2 可知, 总体来看 Ag⁺、Zn²⁺、Pb²⁺、Mg²⁺、Hg²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺ 对芥子酶活性主要起抑制作用, Ca²⁺ 对芥子酶的活性则主要起促进效果。由图 2A 可知, 随着 Ag⁺ 浓度的增高, 芥子酶活性逐渐降低, 当 Ag⁺ 浓度在 40–80 mg/L 时对芥子酶具有一定的促进作用, 促进效果只有 5% 左右, 当 Ag⁺ 浓度超过 80 mg/L 则起到抑制作用, 当浓度达到 10 g/L 时芥子酶基本丧失酶活性, 只有对照的 5% 左右。图 2B 表明在一定范围内 Ca²⁺ 对芥子酶表现为低浓度抑制高浓度促进的作用, 浓度在 34.6 mg/L 时表现为抑制作用, 酶活性只有对照的 83%。当浓度达到 69.2 mg/L 时开始起促进作用, 在浓度为 1.1 g/L 时促进作用达到 66%, 浓度在 2.2–17.0 g/L 时酶活性趋于稳定, 促进作用在 60% 左右。由图 2C 可知 Zn²⁺ 对芥子酶的作用表现为低

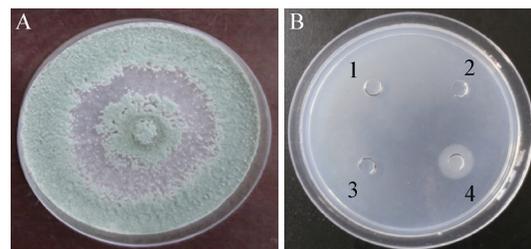


图 1 芥子酶对底物黑芥子酸钾的分解能力

Figure 1 The capacity of myrosinase decomposes sinigrin

注: A: 深绿木霉 T₁₅₅; B: 深绿木霉 T₁₅₅ 产芥子酶对黑芥子酸钾的分解效果测定. 1: 加入 100 μL 去离子水; 2: 加入 100 μL 50 mmol/L 的黑芥子酸钾溶液; 3: 加入 100 μL 粗酶液; 4: 加入芥子酶与黑芥子酸钾的反应产物。

Note: A: The *Trichoderma atroviride* T₁₅₅; B: The capacity of myrosinase decomposes sinigrin. 1: Add 100 μL dionized water; 2: Add 100 μL 50 mmol/L sinigrin 100 μL; 3: Add 100 μL myrosinase; 4: Add reaction products.

浓度促进高浓度抑制的现象,当浓度在 128.3 mg/L 时促进作用最好,可以达到 25%,但在浓度高于 8 g/L 时抑制作用达到 70%以上。图 2D 表明当 Pb^{2+} 浓度在低于 76.5 mg/L 时对芥子酶起促进作用,高于这个浓度则起到明显的抑制作用,当浓度在 76.5 mg/L 时促进作用达到 30%,在浓度达到 1.2 g/L 时芥子酶基本丧失活性,只有对照的 5%左右。图 2E 表明 Mg^{2+} 对芥子酶的活性起到先抑制,后促进,再抑制的作用。在浓度为 3 111.5 mg/L 时起到促进作用,酶活性提高 15%左右,此浓度范围之外则起到抑制作用,在浓度为 58 mg/L 时抑制作用最强,酶活性只有对照的 26%。由图 2F 可知, Hg^{2+} 对芥子酶起到先促进后抑制的作用,在浓度为 31.9 mg/L 时促进作用最强,酶活性提高 20%左右,当浓度高于 127.8 mg/L 时起到抑制作用,在浓度为 1.9 g/L 时酶活性只剩 1.5%左右。分析图 2G 可知, Cu^{2+} 总体上对芥子酶起到先激活后抑制的作用,在浓度为 470.0 mg/L 时激活作用最好,酶活性提高 40%,之后酶活性逐渐降低,在浓度为 1.47 g/L 时酶活性只剩 5%左右。由图 2H 可知, Fe^{3+} 对芥子酶主要起抑制作用,随着浓度的增高酶活性呈降低的趋势,在 Fe^{3+} 浓度为 1.6 g/L 时芥子酶活性只剩 30%左右。

2.3 稳定深绿木霉 *T₁₅₅* 所产芥子酶保护剂的筛选

稳定酶主要通过两种途径,一种途径是改造酶,另一种途径是优化酶所处的环境。本研究探讨了 3 种化合物及其复配组合对芥子酶的稳定效果。结果表明(图 3),加入 EDTA、DTT、EDTA 与 DTT、DTT 与甘油的 4 组处理总体上对芥子酶有稳定作用,相比于对照组起始酶活性略有提高,大约提高 6%左右。其中,加入 EDTA 与 DTT 对芥子酶的稳定效果最好,26 d 后酶活性仍然保持 85%左右,其次为只加入 EDTA 的处理,26 d 后酶活性也能够保持 80%。对芥子酶的稳定效果最差的为只加甘油的处理,26 d 后酶活性只剩 50%左右。

张蕾等^[22]从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)提取芥子酶时在提取缓冲液中同时加入了 1 mmol/L EDTA、3 mmol/L DTT 和 5%甘油,-80 °C 保存 7 d 能够保持酶活性的 90%。刘月萍等^[7]在配置芥子酶提取缓冲液中混合加入 1 mmol/L EDTA、3 mmol/L DTT 与 5%甘油作为酶的保护剂,但是她没有比较保护剂添加与否对酶活性变化的影响,也没有单独研究每种保护剂对芥子酶的稳定效果。

2.4 深绿木霉 *T₁₅₅* 产芥子酶分离纯化及电泳检测

2.4.1 芥子酶的分离纯化: 将芥子酶粗酶液过 Sephadex G-100 柱后得到图 4A,通过收集各峰酶液并测酶活,其中第二峰为活性峰,收集第二峰的酶液并用 PEG-20000 进行浓缩然后过 DEAE-52 离子交换柱,得到图 4B 所示图谱,分别收集各峰酶液并测定酶活,其中一、二峰的收集液均具有芥子酶活性,分别收集洗脱液并用 PEG-20000 浓缩,然后分别用 Sephadex G-200 柱层析继续分离纯化,分别得到图 4C、4D 所示图谱,分别收集洗脱液并测定酶活,收集活性峰的洗脱液。

显示分离纯化的芥子酶回收率如表 1 所示,随着每一步分离纯化的进行,芥子酶的净得率在逐渐降低,但纯度和比活力在逐渐提高,比活力由起初的 0.15 提高到 26.00 (2-1 峰)和 22.50 (2-2 峰)。最后两种芥子酶纯化倍数分别达到了 173、150,得率分别为 8.9%、10.0%。

2.4.2 纯化的芥子酶电泳检测: 将 Sephadex G-200 分离纯化后得到的两种芥子酶液用 PEG-20000 浓缩,然后进行电泳分析,得到如图 5 所示电泳图谱,从图 5A 中可以看出两种酶液通过 SDS-PAGE 都可以得到两条紧挨着的平行条带,并且 2-1 峰的分子量要稍大于 2-2 峰,2-1 峰每条带的分子量约在 80 000 Da 左右,2-2 峰每条带的分子量约在 70 000 Da 左右。Native-PAGE 电泳图谱如图 5B 所示,两种酶液都只能得到一条带,说明此芥子酶可能是一个二聚体,两种芥子酶的分子量大约在 150 kD 左右。

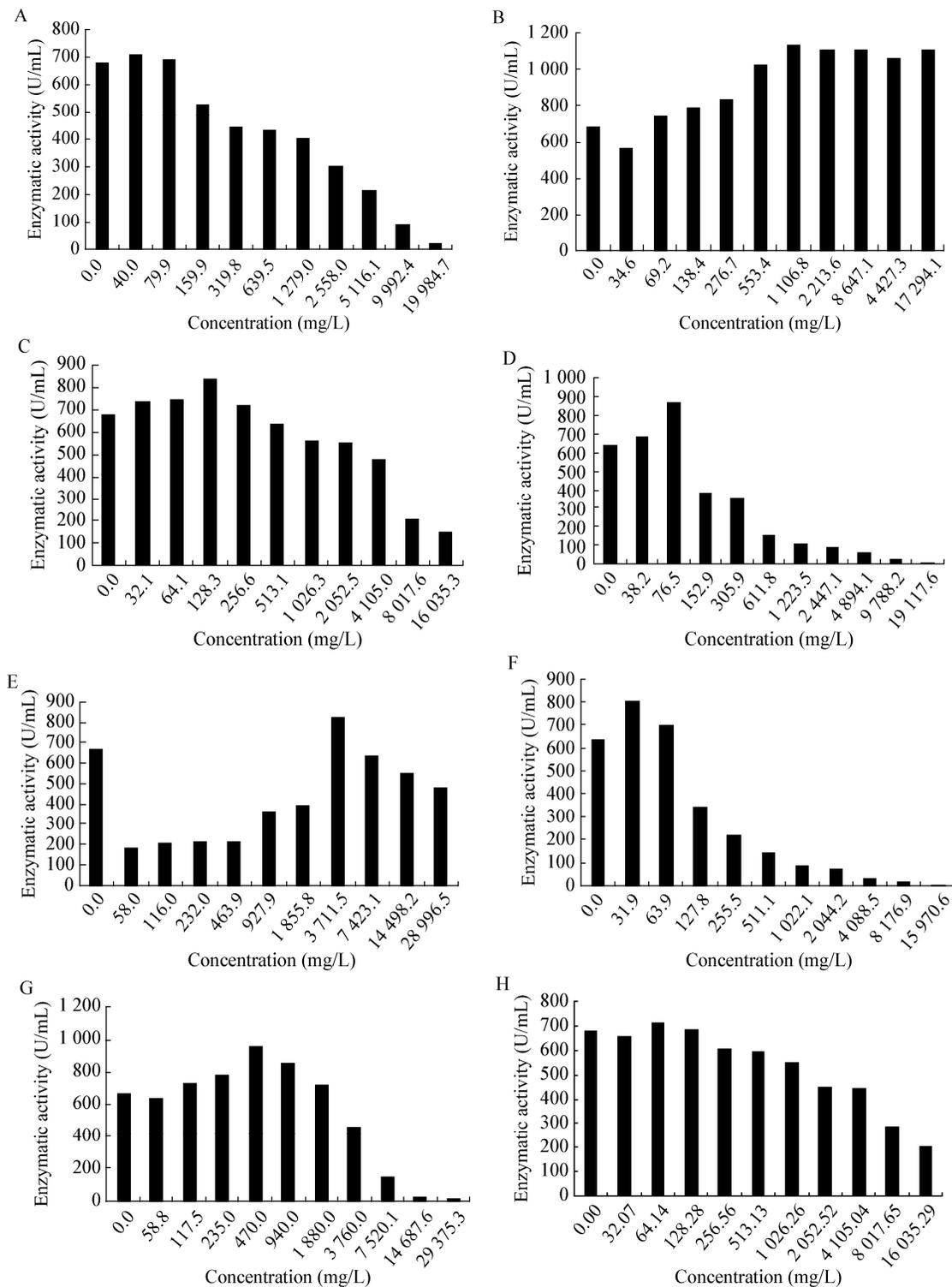


图2 金属离子对酶活性的影响

Figure 2 The effect of metal ions on the activity of myrosinase

注：A：Ag⁺对芥子酶活性的影响；B：Ca²⁺对芥子酶活性的影响；C：Zn²⁺对芥子酶活性的影响；D：Pb²⁺对芥子酶活性的影响；E：Mg²⁺对芥子酶活性的影响；F：Hg²⁺对芥子酶活性的影响；G：Cu²⁺对芥子酶活性的影响；H：Fe³⁺对芥子酶活性的影响。

Note: A: The effect of Ag⁺ on the activity of myrosinase; B: The effect of Ca²⁺ on the activity of myrosinase; C: The effect of Zn²⁺ on the activity of myrosinase; D: The effect of Pb²⁺ on the activity of myrosinase; E: The effect of Mg²⁺ on the activity of myrosinase; F: The effect of Hg²⁺ on the activity of myrosinase; G: The effect of Cu²⁺ on the activity of myrosinase; H: The effect of Fe³⁺ on the activity of myrosinase.

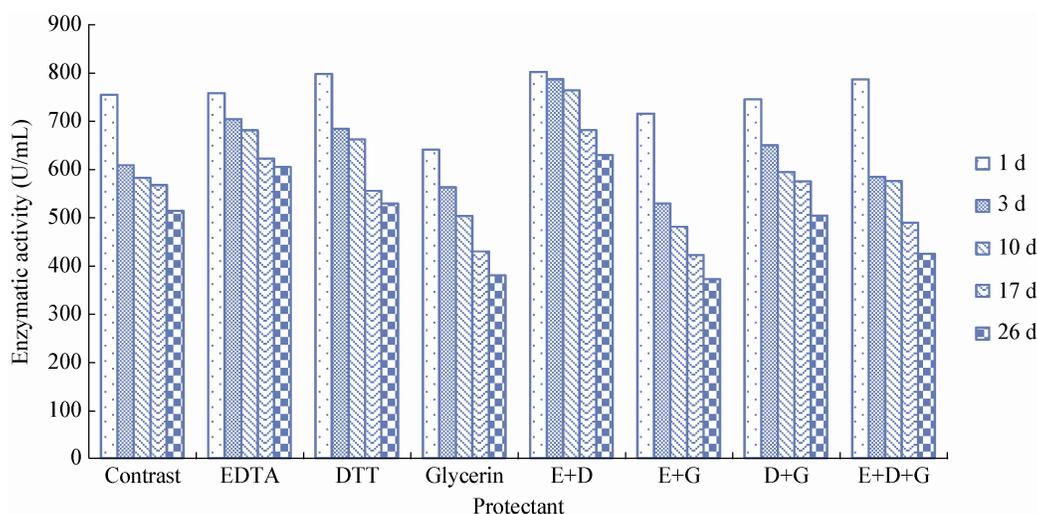


图3 不同保护剂对酶稳定性的影响

Figure 3 The effect of protectant on the stability of myrosinase

Note: E+D: EDTA and DTT; E+G: EDTA and Glycerin; D+G: DTT and Glycerin; E+D+G: EDTA and DTT and Glycerin.

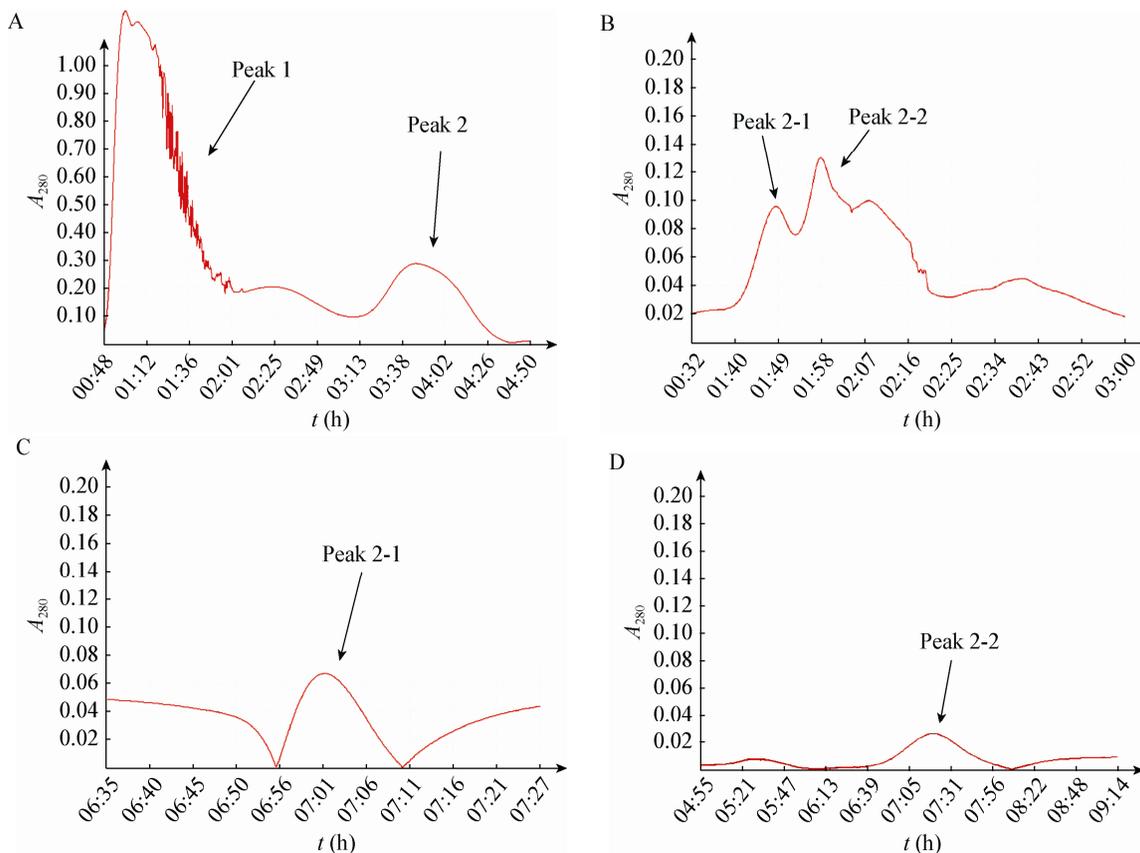


图4 芥子酶的分离纯化

Figure 4 The separation and purification of myrosinase

注: A: Sephadex G-100 洗脱图谱; B: DEAE-52 洗脱图谱; C: DEAE52 第一峰 Sephadex G-200 洗脱图谱; D: DEAE52 第二峰 Sephadex G-200 洗脱图谱.

Note: A: Elution profile of myrosinase on Sephadex G-100 column; B: Elution profile of myrosinase on DEAE-52 cellulose column; C: Elution profile of myrosinase on Sephadex G-200 column; D: Elution profile of myrosinase on Sephadex G-200 column.

表 1 芥子酶各分离纯化步骤的蛋白和酶活性得率
Table 1 The yield of protein and myrosinase in each separation

	Volume (mL)	The protein concentration (g/L)	Enzymatic activity (U, $\times 10^3$ /mL)	Specific activity (U, $\times 10^3$ /mg)	Total activity (U, $\times 10^3$)	Purification fold	Yield (%)
The crude enzyme solution	30	10.00	1.5	0.15	45.0	1.0	100.0
SephadexG-100	8	0.70	2.3	3.20	18.4	21.3	40.9
DEAE-52 2-1	3	0.07	1.5	21.00	4.5	140.0	10.0
DEAE-52 2-2	3	0.10	1.8	18.00	5.4	120.0	12.0
SephadexG-200 2-1	5	0.03	0.8	26.00	4.0	173.0	8.9
SephadexG-200 2-2	5	0.04	0.9	22.50	4.5	150.0	10.0

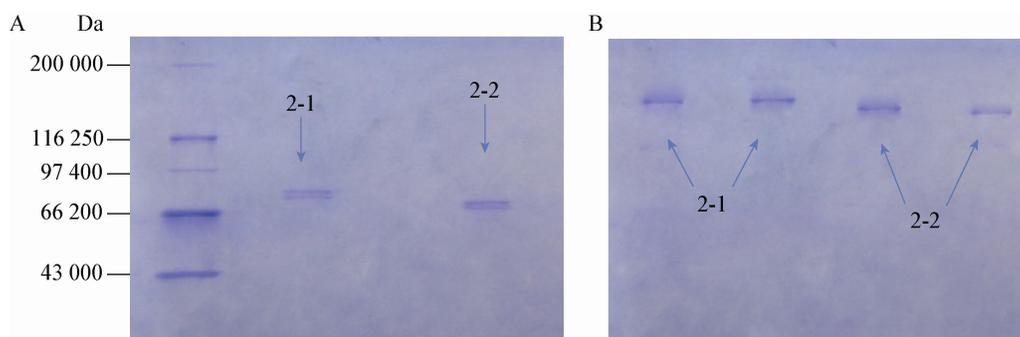


图 5 芥子酶电泳检测

Figure 5 The electrophoresis of myrosinase

注：A：SDS-PAGE 电泳图；B：Native-PAGE 电泳图。

Note: A: SDS-PAGE of myrosinase; B: Native-PAGE of myrosinase.

3 讨论

金属离子对酶活性的影响主要表现在抑制和促进两方面，它与酸碱催化的影响相似，而且作用很强。金属离子还可以参与氧化还原反应或对酶产生诱导效应^[23]。自然界中存在众多不同类型的金属离子，他们都有可能影响芥子酶在使用中的活性，因此研究金属离子对芥子酶的活性影响具有重要的实际意义。本实验研究了环境中几种常见金属离子对深绿木霉 *T₁₅₅* 产芥子酶活性的影响，结果表明 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Hg^{2+} 对芥子酶活性主要起抑制作用， Ca^{2+} 对芥子酶的活性则主要起促进作用。因此在实际应用中要尽量避免或考虑到对芥子酶活性产生抑制作用的金属离子对应用效果可能产生影响，充分利用对芥子酶活性有促进作用的金属离子。

为了使深绿木霉 *T₁₅₅* 产生芥子酶稳定并保持较高的活性，本文研究了 EDTA、DTT、甘油及其

复配剂对芥子酶活性的稳定效果。结果表明加入 1 mmol/L 的 EDTA 与 3 mmol/L 的 DTT 对深绿木霉 *T₁₅₅* 产芥子酶的保护作用最好，4 °C 保存 26 d 后仍能够保持 85% 的酶活性，有一定的实际应用潜力。EDTA 作为金属离子螯合剂，可以通过螯合作用结合抑制酶活性的金属离子，消除金属离子对芥子酶活性的影响；DTT 可以保护酶的活性基团尤其是巯基，避免被氧化，从而使酶保持活性^[24]，Burm Eister W. P. 等研究发现 Vc 作为还原剂对芥子酶的活性中心起到较好的保护作用^[25-26]，本研究中 DTT 可能起到了和 Vc 相似的功能，稳定了芥子酶的活性，而 EDTA 与 DTT 复配对保护芥子酶的活性起到了协同增效的作用。

Li 等^[27]通过硫酸铵沉淀从辣根(Horseradish)的根部提取出粗芥子酶，但他没有开展酶的分离纯化工作。Jwanny E. W. 等^[28]通过 DEAE-52 离子交换层析和 Sephadex G-200 柱层析从萝卜(Raphanus

sativus)中提取到芥子酶, 与本研究的分离纯化方法相似。Natalia Bellostas 等^[29]用亲和层析柱代替了离子交换柱从植物种子里面分离纯化出芥子酶。Falka 等^[30]研究发现在甘蓝型油菜中, 芥子酶是分子量为 135–150 kD 的二聚体蛋白。本研究结果表明深绿木霉 T₁₅₅ 产芥子酶是一个二聚体, 并且分子量在 150 kD 左右, 这与植物里面分离获得的芥子酶很相似^[31]。

本文阐明了不同金属离子种类和浓度对酶活性的影响程度以及保护剂对酶活性的稳定效果, 并提供了一种微生物源芥子酶的分离纯化方法, 这将为来微生物源芥子酶的商业化生产奠定了良好基础。

参 考 文 献

- [1] Wittstock U, Halkier BA. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(6): 236-270.
- [2] Dunne CP, Dell B, Hardy GESTJ. The effect of biofumigants on the vegetative growth of five phytophthora species *in vitro*[J]. Acta Horticulturae, 2003, 602: 45-51.
- [3] Fenwick, Griffiths NM, Heeaay RK. Bitternes in brussels-sprouts (*Brassica oleracea* L. Var. *gemmifera*) —the role of glucosinolates and their break down products[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1983, 34(1): 73-80.
- [4] Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA, et al. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetable[J]. Chemico-Biological Interactions, 1997, 103(2): 129-179.
- [5] Wallace SK, Eigenbrdde S. Changes in the glucosinolate-myrosinase defense system in *Brassica juncea* cotyledons during seedling development[J]. Journal of Chemical Ecology, 2001, 28(2): 243-256.
- [6] 赵国华, 曾凯芳. 茎用芥菜芥子苷酶的分离纯化及组成研究[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 69-72.
- [7] 刘月萍. 黑芥子酶提取分离、性质及固定化研究[D]. 浙江: 浙江工商大学硕士学位论文, 2007.
- [8] Van Eylen D, Indrawati M, Hendrickx A, et al. Temperature and pressure stability of mustard seed (*Sinapis alba* L.) myrosinase[J]. Food Chemistry, 2006, 97(2): 263-271.
- [9] Carina B, Georg J. Arabidopsis myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense[J]. The Plant Journal, 2006, 21(5): 137-135.
- [10] Chen S, Halkier BA. Functional expression and characterization of the myrosinase MYR from *Brassica napus* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Protein Expression and Purification, 1999, 17(3): 414-420.
- [11] Eriksson S, Andréassun E, Ekbohm B. Complex formation of myrosinase isoenzymes in oil seed rape seeds are dependent on the presence of myrosinase-binding proteins[J]. Plant Physiology, 2002, 129(4): 1592-1599.
- [12] 马艳, 殷蒙, 常志州, 等. 产芥子酶的深绿木霉菌株及其应用: 中国, 2012100682016[P]. 2012-07-25.
- [13] 殷蒙, 马艳, 常志州, 等. 一株深绿木霉产芥子酶酶学性质[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(10): 309-311.
- [14] Harvey Jr AE, Smart JA, Amis ES. Simultaneous spectrophotometric determination of iron (II) and total iron with 1,10-phenanthroline[J]. Analytical Chemistry, 1955, 27(1): 26-29.
- [15] 闫家伟, 黄运瑞, 武江旭. 铁-邻菲罗啉分光光度法测定微量葡萄糖[J]. 南阳师范学院学报, 2004, 3(9): 42-44.
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [17] 杨平平, 王燕, 史宝军, 等. 黑曲霉496-1菌株植酸酶的分离纯化及酶学性质[J]. 食品与生物技术. 2003, 22(5): 34-37.
- [18] Chin Y, Que KW. Myrosinase activity and total glucosinolate content of cruciferous vegetables and some properties of cabbage myrosinase in Taiwan[J]. Journal of the Science of the Food and Agriculture, 1993, 61(4): 471-475.
- [19] 吴宏伟, 钟英长, 陆勇军. 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)芥子苷酶的纯化[J]. 中山大学学报, 1999, 38(3): 125-126.
- [20] 高艳丽, 杨思文, 樊凯奇. SDS-PAGE 电泳技术分析蛋白质的研究[J]. 辽宁化工, 2007, 36(7): 460-463.
- [21] 孟庆石, 张光祥, 潘映红. 蛋白质复合体非变性凝胶电泳技术及其应用新进展[J]. 生物技术通报, 2010(6): 56-64.
- [22] 张蕾, 庞秋颖, 王洋. 黑芥子酶提取及活性测定方法的改进[J]. 东北师大学报, 2011, 43(1): 118-121.
- [23] 周晓云. 酶学原理与酶工程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [24] 刘闻捷, 张军, 黄才国. 二硫苏糖醇对晶体蛋白的保护作用及其用途: 中国, CN200610024262.7[P]. 2007-01-17.
- [25] 李定琴, 张家明. 芥子酶的研究概括[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2007, 25(2): 210-216.
- [26] Burm Eister WP, Cottaz S, Rollin P, et al. High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor from myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(50): 39385-39393.
- [27] Li X, Mosbah M, Kushad. Purification and characterization of myrosinase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43(6): 503-511.
- [28] Jwanny EW, Elsayed ST, Rashad MM, et al. Myrosinase from foofs of raphanus sativus[J]. Phytochemistry, 1995, 39(6): 1301-1303.
- [29] Bellostas N, Petersen IL, Sorensen JC. A fast and gentle method for the isolation of myrosinase complexes from Brassicaceous seeds[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2007, 70(6): 918-925.
- [30] Falke EKB, Rask L. Characterization of a new myrosinase in *Brassica napus*[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27(5): 863-874.
- [31] Bones A, Slupphaug G. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of β -thioglucosidase from *Brassica napus*[J]. Plant Physiol, 1989, 134(6): 722-729.