

文章编号: 0529-6579 (1999) 03-0125-02

米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 芥子甾酶的纯化^{*}

吴宏伟, 钟英长, 陆勇军

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

关键词: 菜籽饼; 芥子甾; 芥子甾酶; 米曲霉

中图分类号: Q 936 文献标识码: A

中国是世界上油菜籽最主要的生产国之一, 油菜籽经榨油后剩下的菜籽饼含有高达 40% 的蛋白质及各种其它营养成分, 是一种营养丰富的饲料资源. 然而, 菜籽饼中含有芥子甾, 芥子甾在芥子甾酶 (Myrosinase) 的催化下, 水解产生异硫氰酸酯 (ITC)、恶唑烷硫酮 (OZT)、腈类等有毒物质, 这些物质能通过加热而挥发, 或由其它的酶进一步水解而脱毒. 根据以上特点, 我们筛选了能产生芥子甾酶的米曲霉 G-1 株, 对菜籽饼进行工业化固态发酵, 降解其中的芥子甾, 并去除降解的有毒产物获得成功^[1], 为我国开辟了重要的蛋白饲料资源. 迄今对芥子甾酶所展开的研究, 主要局限于植物的芥子甾酶, 对微生物中芥子甾酶的报道则极少见^[2-3]. 本文首次报道在真菌米曲霉中获得芥子甾酶.

米曲霉的芥子甾酶是一种胞外酶, 可经相应底物诱导产生 (另文发表). 将米曲霉 G-1 株接入 1 000 mL 含 0.1 g/L 诱导物黑芥子甾的马铃薯葡萄糖液体培养基 (pH 7.0) 中, 29 °C, 180 r/min. 培养 48 h, 过滤, 取发酵液于 4 °C 以 10 000 r/min. 离心, 得粗酶液; 将粗酶液调至与 pH 7.0, 10 mmol/L PBS (磷酸盐缓冲液) 具有同样的 pH 值和电导率后, 分 2 次上已经 PBS 充分平衡的 DEAE-Cellulose 柱, 上柱结束后, 先用同样的 PBS 淋洗至流出液在 280 nm 处的紫外吸收最低 (用 UV-Monitor 监测), 再改用含 0.1 mol/L NaCl 的 PBS 洗脱, 测定于 280 nm 处有最大吸收峰的洗脱液的酶活性 (方法及酶活单位定义见文 [4]), 将该洗脱液上到已经 PBS 充分平衡的 DEAE-Cellulose (纤维型) 柱, 上柱结束后, 用含 0 ~ 0.2 mol/L NaCl 的 PBS (各 500 mL) 线性梯度洗脱, 流速为 22.8 mL/

图 1 提纯芥子甾酶的 PAGE 图
Fig 1 The PAGE pattern of myrosinase

* 基金项目: 香港伟伦基金资助, 部分工作在香港生物科技研究院完成

收稿日期: 1998-12-21 作者简介: 吴宏伟, 男, 1968 年生 通讯联系人: 钟英长.

h, 每 25min 收集 1 管, 每管 9.5 mL, 同上法测定酶活性, 取酶活峰部分 (第 31 ~41 管) 用 PAGE 电泳检查纯度, 结果得到均一的酶带 (图 1), 表明已提纯了芥子甙酶. 酶的整个提纯过程见表 1, 最终酶提纯 15 倍左右, 酶活总收率 36%. 本文的结果对进一步研究米曲霉及其它微生物的芥子甙酶的有关特性, 阐明该酶对菜籽饼中芥子甙的降解机理, 并为发展第二代菜籽饼微生物脱毒技术——微生物酶法脱毒奠定了理论基础. 目前我们正尝试对米曲霉的芥子甙酶基因进行克隆.

表 1 芥子甙酶提纯过程各步骤总结

Tah 1 The procedure of myrosinase purification

步骤	$\frac{V}{\text{mL}}$	$\frac{\rho(\text{蛋白质})}{(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})}$	$\frac{m(\text{总蛋白质})}{\text{mg}}$	酶活力 ¹⁾	总酶活 力 ¹⁾	比活力 ²⁾	提纯 倍数	产率/ %
培养液	835	0.635	530.2	2.43	2 029.1	3.83	1	100
DEAE-cellulose 吸附	225	0.16	36	4.43	996.8	27.69	7.2	49.1
DEAE-cellulose 层析	104.5	0.12	12.5	7.0	731.5	58.33	15.2	36.1

1) 酶活力和总酶活力的单位为 $10^4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; 2) 比活力的单位为 $10^4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$

参考文献:

[1] 钟英长, 朱汝舫, 周世宁, 等. 微生物降解菜籽饼中芥子甙毒素的研究 [A] . 利用和发展饲料资源全国会议论文集 [C] . 1988. 53~ 56.

[2] REESE E T, CLAPP R C, MANDELS M A, et al. A thioglucosidase in fungi [J] . Arch Biochem Biophys 1958, 75: 228~ 242.

[3] OHTSURU M, HATA T. Studies on fungous myrosinase [J] . Agric Biol Chem, 1969, 33: 1309 ~ 1314.

[4] PESSINA A, THOMAS R M, PALMIERI S, et al. An improved method for the purification of myrosinase and its physicochemical characterization [J] . Arch Biochem Biophys 1990, 280: 383 ~ 389.

Purification of Myrosinase (Thioglucosidase) from *Aspergillus oryzae*

WU Hong-wei, ZHONG Ying-chang,* LU Yong-jun

Abstract: An electrophoretic purified myrosinase which was able to degrade glucosinate in rapeseed meal was first obtained from the cultured broth of *Aspergillus oryzae* by using a combination of absorption and column chromatography of DEAE-cellulose. The enzyme was purified 15 folds compared with the original crude extract and the yield was about 36%.

Keywords: rapeseed meal; glucosinolate; myrosinase; *Aspergillus oryzae*

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>