

玛咖黑芥子酶的酶学性质及加工稳定性

李婧¹, 杨成², 牛立沙³, 于艳丽^{1*}

(¹上海杉达学院 上海 201209

²江南大学食品学院 江苏无锡 214122

³河北省食品检验研究院 石家庄 050091)

摘要 新鲜玛咖块茎中的黑芥子酶经提取、透析、凝胶过滤层析纯化后,对其酶学性质、酶动力学参数以及干燥加工前、后玛咖中的黑芥子酶酶活力及其酶解产物异硫氰酸苜酯(BITC)的变化进行研究。凝胶渗透色谱测得纯化后的玛咖黑芥子酶的分子质量为 190.9 ku。酶学性质研究结果显示:该酶的最适温度 40 ℃,最适 pH 7.0,金属离子 Fe³⁺、Cu²⁺、Al³⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Ba²⁺对其有显著的抑制作用。采用 Lineweaver-Burk 法测得玛咖黑芥子酶的动力学参数 $V_{\max}=0.2383(\mu\text{mol/L})/\text{min}$, $K_m=0.1425\text{ mmol/L}$ 。玛咖鲜果中的黑芥子酶酶活力为 0.7256 U/g, BITC 含量为 3.3190 mg/g。将玛咖鲜果样品切片后分别在温度为 50, 60, 70, 80 ℃ 下干燥处理,结果显示:随着干燥温度的上升,玛咖干片样品中的黑芥子酶酶活力显著下降, BITC 含量呈下降趋势。本研究完善了玛咖黑芥子酶的理论研究,并提出采用 60 ℃ 以上温度对玛咖进行干燥处理可有效抑制黑芥子酶酶活力,为玛咖的加工利用提供了参考。

关键词 黑芥子酶; 玛咖; 酶学性质; 酶活力; 异硫氰酸苜酯

文章编号 1009-7848(2024)04-0247-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.04.023

玛咖 (*Lepidium meyenii* Walp.) 是原产于秘鲁海拔 3 500 m 以上的安第斯山脉的十字花科 (Brassicaceae) 独行菜属 (*Lepidium*) 一年或两年生草本植物。玛咖具有抗疲劳,提高精子质量,缓解更年期综合症,抑制前列腺增生等多种生理功效^[1-5]。自 2011 年在中国获批新资源食品(现称新食品原料)以来,各种玛咖产品涌现在保健品市场。对于玛咖功能性成分的研究也是近年来的热点。

黑芥子酶 (EC 3.2.1.147) 是主要存在于十字花科植物中的 β -硫代葡萄糖苷酶^[6]。除了十字花科植物外,一些微生物,比如鞘氨醇杆菌、阴沟肠杆菌、黑曲霉也可以代谢产生黑芥子酶^[7-8],还有一种动物甘蓝蚜也被发现体内含有黑芥子酶^[9]。芥子油苷又名硫代葡萄糖苷或简称硫苷 (Glucosinolate, GS), 是十字花科植物中的次级代谢产物^[10]。玛咖中已发现多种芥子油苷,其中含量最高的是苯基芥子油苷 (BG), 占总芥子油苷的 80% 以上^[11], 其被认为是玛咖中的标志性功效成分。芥子油苷-黑芥

子酶系统是十字花科植物中特有的底物酶系统。玛咖中的芥子油苷与黑芥子酶在细胞中是分离的,正常情况下它们都相对稳定,只有在植物组织被破坏、细胞破裂,黑芥子酶才会与芥子油苷接触,发生酶解反应^[12]。不同的酶解反应条件下,酶解产物不尽相同,主要产物有异硫氰酸酯、硫氰酸酯、腈类化合物、恶唑烷硫酮等^[13]。其中,异硫氰酸酯和硫氰酸酯是玛咖呈现刺激性风味的主要作用物质。由于恶唑烷硫酮可以引起甲状腺代谢功能改变和甲状腺肿大,腈类化合物可引起肝肾功能受损^[14],因此,在玛咖加工中应尽量避免酶解反应生成有害产物。

目前,国内外有关研究发现,不同生物来源,如拟南芥、西蓝花、家独行菜种子、辣根等中的黑芥子酶的分子质量及酶学性质差异较大^[7]。目前关于玛咖黑芥子酶的研究局限于灭酶工艺的优化和高温对酶活力的影响^[15-16],而对玛咖中黑芥子酶酶学性质的研究尚处于空白。异硫氰酸苜酯 (BITC) 最早发现于番木瓜中^[17],它是 BG 的酶解产物,研究发现其具有抗癌和抑菌功能^[18-21]。理论上玛咖中也应该含有 BITC,有关于玛咖中 BITC 的研究未见报道。本试验旨在研究玛咖中的黑芥子酶的酶学性质,以及玛咖干燥加工后其中的黑芥子酶酶

收稿日期: 2023-07-11

基金项目: 上海市“晨光计划”项目(18CGB02)

第一作者: 李婧,女,博士,讲师

通信作者: 于艳丽 E-mail: ylyusanda@sina.com

活力和 BITC 的变化,为玛咖的生产加工和综合利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玛咖鲜果,云南丽江产新鲜黑玛咖块茎;市售玛咖干片,云南丽江产黑玛咖;透析袋(8 000~14 000 u),上海柏奥。

Sephadex G-100 凝胶、标准蛋白彩色预染 Marker(11~180 ku),上海源叶生物科技有限公司;苜蓿基芥子油苷、异硫氰酸苜蓿酯,日本 TCI;凝胶渗透色谱用蛋白质混标(15~600 ku),美国 Sigma 公司;液相色谱用试剂为色谱纯级,其余试剂为化学纯级,均购于国药试剂。

1.2 仪器与设备

自动液相色谱层析仪,上海沪西分析仪器有限公司;Mini-PROTEAN Tetra Cell 小型垂直电泳槽,美国 Bio-Rad 公司;Waters Acquity Arc 液相色谱、Waters 1525 液相色谱、2998 PDA detector 检测器,美国 Waters 公司;8890A 气相色谱、FID 检测器,美国安捷伦公司;DGG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱,上海森信实验仪器有限公司;DF-101S 集热式磁力搅拌器,上海力辰邦西仪器科技有限公司;FD-1A-50 冷冻干燥机,上海比朗仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 玛咖中黑芥子酶的提取与纯化

1.3.1.1 粗酶液的制备 将 200 g 玛咖块茎切片,用破壁机打浆后,立即转移至烧瓶内加入 1 L 10 mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.0,含 10 mmol/L EDTA、10 mmol/L 二硫苏糖醇和 5%甘油),在冰水浴中搅拌 30 min。4 ℃下,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为玛咖黑芥子酶粗酶液。

1.3.1.2 黑芥子酶的纯化 将玛咖黑芥子酶粗酶液放入透析袋,于 4 ℃透析后,使用 Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析柱 10 mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.0)洗脱,收集滤液 10 mL 每管,测定每管的酶活力。以检测到的最高酶活力为 100%,计算各管的相对酶活力。将具有酶活力的所有管中的滤液收集合并,冷冻干燥后配制成 10 mg/mL 水溶液用于凝胶渗透色谱测定。

1.3.1.3 黑芥子酶酶活力测定 黑芥子酶酶活力的测定参照 Li 等^[2]的方法加以修改:将 1 mL 黑芥子酶液和 1 mL 玛咖 BG 提取液混合,立即取样测定此时混合液中 BG 的含量,玛咖中 BG 的提取条件和 BG 含量的测定均参照 Li 等^[2]的方法,再将混合液密封放入 40 ℃水浴 20 min,结束时立即取样测定此时混合液的 BG 含量。1 个酶活力单位(U)的定义为每分钟 BG 的减少量(nmol),酶液的黑芥子酶酶活力表示为 U/mL。酶活力按公式(1)计算。

$$\text{酶活力(U/mL)} = \frac{\Delta \text{BG}}{20} \quad (1)$$

1.3.1.4 凝胶渗透色谱 采用 Waters Acquity Arc 液相色谱系统,检测器:2998 PDA detector,检测波长:220 nm,流动相:0.1 mol/L 硫酸钠溶解到 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液(pH 6.7)中。流速 0.5 mL/min,柱温:30 ℃。色谱柱:TSKGgel G3000SWXL 7.8 mm×300 mm。利用分子质量为 15~600 ku 蛋白质混标溶液,对纯化后的黑芥子酶进行分子质量测定。

1.3.2 玛咖黑芥子酶的酶学性质

1.3.2.1 温度对酶活力的影响 最适催化温度测定:以 1 mL 玛咖苜蓿基芥子油苷(BG)提取液为底物,加入粗酶液 1 mL 立即取样测定此时混合液中 BG 的含量,再将混合液密封分别在 30,35,40,45,50,55,60,65,70 ℃下水浴 20 min,结束时立即取样测定此时混合液的 BG 含量,按照公式(1)求出不同温度下的酶活力。以检测到的最高酶活力为 100%,计算各温度下的相对酶活力。

热稳定性测定:将粗酶液分别在 10,20,30,40,50,60,70,80,90 ℃下水浴 2.0 h,结束后按照 1.3.1.3 节的方法立即测定酶活力,并以检测到的最高酶活力为 100%,计算各样品的相对酶活力。

1.3.2.2 pH 值对酶活力的影响 配制 pH 值为 4,5,6,7,8,9,10 的缓冲液 50 mL,分别加入 1 mL 玛咖苜蓿基芥子油苷(BG)提取液和 1.3.1.1 节方法制得的粗酶液 1 mL,立即取样测定此时混合液中 BG 的含量。再将混合液密封放入 40 ℃水浴 20 min,结束时立即取样测定此时混合液的 BG 含量,按照公式(1)求出不同 pH 下的酶活力。以检测到的最高酶活力为 100%,计算各 pH 下的相对

酶活力。

1.3.2.3 金属离子对酶活力的影响 分别配制含有 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 的溶液和对照组 EDTA 溶液,终浓度均为 1 mmol/L。取 1 mL 金属离子溶液加入 1 mL 玛咖苜蓿基芥子油苷 (BG) 提取液和 1 mL 粗酶液,立即取样测定此时混合液中 BG 的含量。再将混合液密封放入 40 °C 水浴 20 min,结束时立即取样测定此时混合液的 BG 含量,按照公式(1)求出不同条件下的酶活力。以对照组的酶活力为 100%,计算其它各组的相对酶活力。

1.3.3 酶动力学参数测定 分别配制 BG 浓度为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 mmol/L 的底物溶液,最适温度和 pH 下测定酶活力,利用 Lineweaver-Burk 法^[23](简称 L-B 法,也称双倒数法)作图,求出酶的动力学参数 K_m 值和 V_{max} 值。

1.3.4 干燥加工对玛咖中黑芥子酶酶活力及其酶解产物异硫氰酸苜蓿酯的影响

1.3.4.1 样品处理 取玛咖鲜果切片至约 2 mm 后,分别置于 50, 60, 70, 80 °C 下干燥至水分含量为 12% 左右,分别将上述样品编号为 1, 2, 3, 4, 另取样品 5 为玛咖鲜果,样品 6 为市售玛咖干片。分别测定以上 6 种样品的黑芥子酶活力、异硫氰酸苜蓿酯含量和水分含量。

1.3.4.2 异硫氰酸苜蓿酯含量测定 BITC 的提取及检测方法参照李泽友等^[24]的方法,将上述玛咖样品磨粉或打浆后取 2 g 加入 50 mL 正己烷,在常温下搅拌回流提取 1 h,过滤去除滤渣,将滤液用正己烷定容至 50 mL,用于气相色谱测定。采用安捷伦 8890A 气相色谱, FID 检测器,色谱柱为 Hp-5MS 的 UI 毛细管柱 (0.25 μm , 30 m \times 0.25 mm i. d.), 进样量为 1 μL , 气化室温度为 240 °C。柱程序升温: 80 °C 维持 1 min, 以 10 °C/min 升至 200 °C 维持 3 min, 再以 420 °C/min 升至 260 °C, 维持 18 min。载气为高纯度 N_2 , 总流量 24.9 mL/min, 色谱柱流量 1.04 mL/min, 分流比为 20:1, FID 检测器温度 220 °C。以异硫氰酸苜蓿酯标准品为外标物, 通过外标法进行定量。异硫氰酸苜蓿酯的含量以 mg/g 玛咖干重表示, 其中玛咖的水分含量参照 GB 5009.3-2016 进行测定。

1.3.4.3 玛咖黑芥子酶酶活力的测定 玛咖黑芥

子酶酶活力的测定参照 Li 等^[22]的方法, 玛咖中黑芥子酶酶活以玛咖干物质为测定对象, 表示为 U/g 玛咖干重。

1.4 数据统计与分析

所有样品的测定均平行 3 次, 最终试验结果取平均值。试验结果按照“平均值 \pm 标准差”表示, 其中金属离子对酶活的影响研究、干燥加工对玛咖中 BITC 含量和黑芥子酶酶活力的影响的数据还经 IBM SPSS statistics 26 软件进行单重比较和 Duncan 检验方法, 以 $P < 0.05$ 为显著。用 a、b、c、d 等不同的字母表示其存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 玛咖黑芥子酶的纯化

凝胶过滤柱层析收集管中滤液的相对酶活力如图 1 所示, 共收集 90 管滤液, 其中第 27~30 管、第 65~74 管的滤液检出酶活力。将所有检出酶活力的滤液合并冻干后, 进行凝胶渗透色谱检测。凝胶渗透色谱结果如图 2 所示, 样品出现 3 个色谱峰, 出峰时间分别为 13.189, 16.351, 23.999 min, 分子质量分别为 529 829, 191 071, 16 577 u。前人研究发现西兰花、宽叶独行菜叶和家独行菜种子来源的黑芥子酶的分子质量分别为 157, 160, 114 ku^[25-27]。结合本研究凝胶渗透色谱图, 色谱峰 1 峰面积百分比较小、含量较低 (2.36%), 推测为蛋白聚合物, 因为凝胶柱层析只收集到 2 个组分的酶液, 所以该聚合物是在酶液收集后冻干过程中形成; 色谱峰 2 和色谱峰 3 分别为黑芥子酶和亚基,

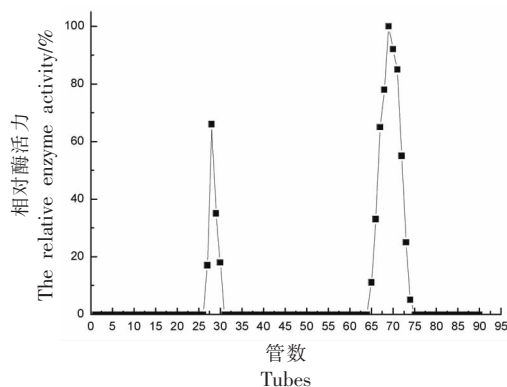


图 1 柱层析收集管中滤液的相对酶活力

Fig.1 The relative enzyme activity of column chromatographic fractions

190.9 ku 为玛咖黑芥子酶的分子质量, 而 16.6 ku 为其亚基的分子质量, 该酶由 11~12 个亚基组成, 在纯化过程中, 黑芥子酶亚基虽然被分离出来, 但不影响其催化活性。十字花科植物来源的黑芥子酶的分子质量在 100~200 ku, 且大都由 2~3 个亚基组成^[6], 也有研究发现山葵来源的黑芥子酶是由 12 个亚基构成^[28], 与本研究中分离出来的玛咖黑芥子酶相似。结果表明, 不同十字花科植物来源的黑芥子酶的分子质量存在一定差异。

2.2 玛咖黑芥子酶的酶学性质

2.2.1 温度对酶活力的影响

玛咖黑芥子酶的最适温度试验结果如图 3 所示, 在 30~70 °C 的温度范围内, 40 °C 时相对酶活力最高。不同来源黑芥子酶的最适温度多数为 30~50 °C^[7], 玛咖黑芥子酶的最适温度 40 °C 也在此范围内。黑芥子酶的热稳定性研究结果表明, 在 <60 °C 的温度下处理 2 h, 酶活力保持在 80% 以上, 当温度超过 60 °C, 酶活力快速下降(图 4)。说明玛咖黑芥子酶在 60 °C 以下较稳定。Li 等^[22]研究发现将新鲜玛咖置于 60 °C 下干燥 24 h 后, 其中的黑芥子酶酶活力显著下降, 80 °C 下干燥 24 h 后, 其中的黑芥子酶完全失活, 该研究热处理的对象是玛咖, 而本研究热处理对象是黑芥子酶酶液, 玛咖中的其它成分可能会对酶的热稳定性产生影响, 直接用酶液作为热处理对象, 减少了其它物质的干扰, 更能真实地反映出黑芥子酶的热稳定性。

2.2.2 pH 值对酶活力的影响

pH 值对黑芥子酶酶活力的影响如图 5 所示, 在 pH 7.0 时黑芥子酶酶活力最高。在 pH 6~8 范围内, 黑芥子酶的酶活力保持在较高水平。其它来源的黑芥子酶的最适 pH 有较大差异, 根据前人研究结果发现来源于植物叶片和种子的黑芥子酶的最适 pH 一般在偏酸性的范围内(pH 4~6), 而来源于植物根部的黑芥子酶的最适 pH 一般在中性左右(pH 6~8)^[6]。本研究采用的样品玛咖块茎位于植株的地下部分, 也包含根部组织, 其中的黑芥子酶的最适 pH 7.0, 符合来源于植物根部的黑芥子酶的最适 pH 值(pH 6~8)范围。

2.2.3 金属离子对酶活力的影响

如图 6 所示, 与对照组相比, Na⁺、K⁺、Ca²⁺ 对黑芥子酶酶活力没有显著影响, 其余几种金属离子对黑芥子酶酶活

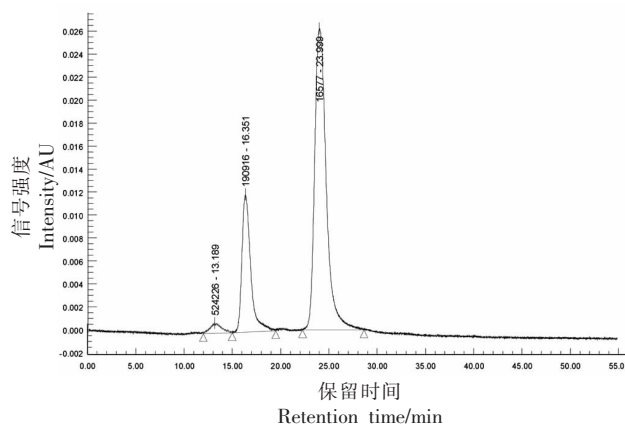


图 2 玛咖黑芥子酶凝胶渗透色谱图

Fig.2 The gel permeation chromatography of myrosinase from maca

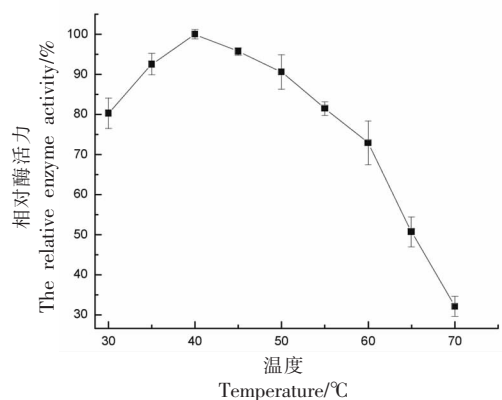


图 3 酶解温度对玛咖黑芥子酶活力的影响

Fig.3 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on the activity of myrosinase from maca

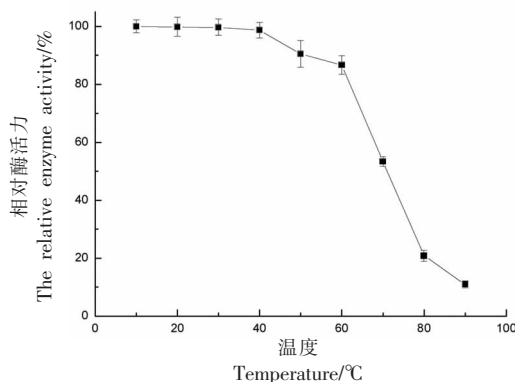


图 4 热处理对玛咖黑芥子酶活力的影响

Fig.4 Effect of heat-treat on the activity of myrosinase from maca

力均具有显著的抑制作用。根据显著性分析结果, 抑制作用由大到小为 Fe³⁺ > Cu²⁺ > Al³⁺ > Mg²⁺ >

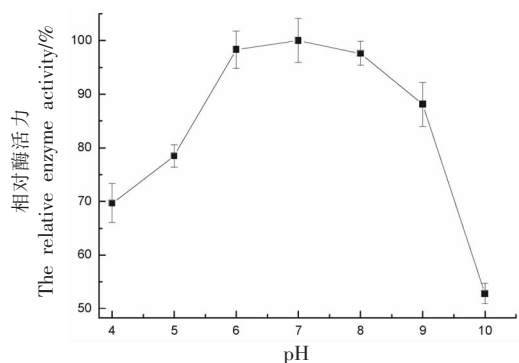


图 5 pH 值对玛咖黑芥子酶活力的影响

Fig.5 Effect of pH on the activity of myrosinase from maca

$Zn^{2+} > Ba^{2+}$, 其中 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 对黑芥子酶活力有抑制作用, 而三者之间的差异不显著。该结果与朱容均等^[7]研究的金属离子对鞘氨醇杆菌 RJ35 黑芥子酶的影响结果相似。金属离子对酶活性的影响主要表现在抑制和促进两方面, 然而其产生机制并未完全明确。本研究结果的原因推测是金属离子与酶中的必需基团结合, 阻断底物与酶的结合位点, 使酶活性被抑制, 不同的金属离子与酶的结合程度不同, 导致抑制作用大小的差异。

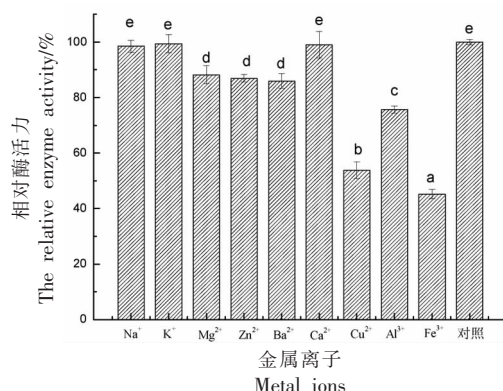
2.3 玛咖黑芥子酶动力学参数

利用米氏方程^[29]和 L-B 法对玛咖黑芥子酶的动力学参数 K_m 值和 V_{max} 值进行测定。由图 7 可知, 在底物浓度 0.05~0.3 mmol/L 之间, 酶活力随底物浓度的升高而增大。以米氏方程(2)和(3), 可建立 $\frac{1}{S}$ 和 $\frac{1}{V}$ 的一元线性方程。

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad (2)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3)$$

式中, S ——底物浓度, mmol/L; V ——酶催化反应速率, ($\mu\text{mol/L}$)/min, 数值上等于本研究中的酶活力。以 $1/S$ 为横坐标, $1/V$ 为纵坐标作图 8, 得到线性方程 $y=0.598x+4.1968$, $R^2=0.9956$, 线性拟合度较高。由线性方程可以求得, $V_{max}=0.2383$ ($\mu\text{mol/L}$)/min, $K_m=0.1425$ mmol/L。Andrea 等^[25]对西兰花来源的黑芥子酶动力学进行了研究, 结果得到在最适温度和 pH 条件下, $V_{max}=0.246$ ($\mu\text{mol/L}$)/min, $K_m=0.086$ mmol/L, 由此可见,



注: 不同字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 6 金属离子对玛咖黑芥子酶活力的影响

Fig.6 Effect of metal ions on the activity of myrosinase from maca

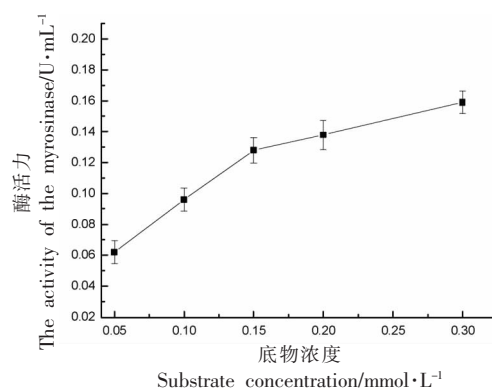


图 7 底物浓度对酶活力的影响

Fig.7 Effect of substrate concentration on the activity of the myrosinase from maca

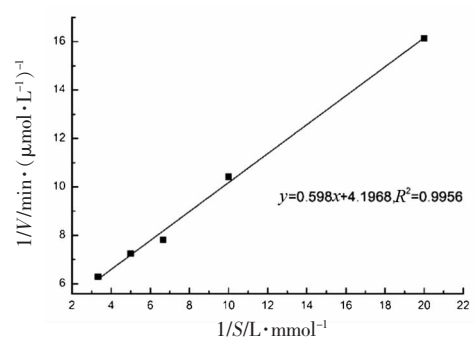


图 8 玛咖黑芥子酶酶 1/V 和 1/S 关系图

Fig.8 The relationship between 1/V and 1/S of the myrosinase from maca

玛咖黑芥子酶最大反应速度与其相近; K_m 值反映的是底物与酶的亲和力大小, K_m 越小, 说明酶与底物的亲和力越强^[23], 结果可知玛咖黑芥子酶对底物的亲和力小于西兰花黑芥子酶。Huang 等^[30]研

究了油卵假单胞菌 SuMy07 产生的黑芥子酶的动力学参数, 结果发现其最大催化速率 V_{\max} 为 1.7 (mmol/L)/min, 远大于本研究 and Andrea 等^[25]的研究结果, 推测此差异的原因在于其研究对象是纯化后的黑芥子酶, 而本研究对象是粗酶液。

2.4 干燥加工对玛咖中黑芥子酶酶活力及其酶解产物异硫氰酸苜酯的影响

玛咖样品中的气相色谱图如图 9 所示, 其中保留时间为 10.215 min 的色谱峰为 BITC。玛咖干片是一种常见的玛咖产品, 经试验测得市售玛咖干片的水分含量在 12% 左右, 故本研究将不同温度下干燥的玛咖样品均烘干至水分含量 12% 左右, 测定不同温度处理后的玛咖中黑芥子酶酶活力及其酶解产物异硫氰酸苜酯的含量。结果如表 1 所示, 新鲜玛咖鲜果中的黑芥子酶酶活力为 0.7256 U/g, BITC 含量为 3.3190 mg/g。随着干燥温度的上升, 玛咖样品中的黑芥子酶酶活力呈显著下降趋势, 当干燥温度达到 60 °C 时, 玛咖中的黑芥子酶酶活力显著降低了 22.26%, 干燥温度达到 80 °C 时, 黑芥子酶酶活力降到了 0, 这与本研究酶液中黑芥子酶酶活力的热稳定性结果相似。市售玛咖干片的黑芥子酶酶活力也为 0, 说明其在加工或贮藏过程中酶活力被完全钝化。随着干燥温度的上升, 玛咖中 BITC 的含量呈下降趋势, 且与新鲜玛咖样品相比相差了 2 个数量级。造成此巨大差异的原因一方面是高温干燥抑制了酶活, 酶解反应速度下降; 另一方面是 BITC 的热稳定性较差^[18], 在干燥过程中损失。在不同干燥温度下, 处理后的玛咖样品以及市售玛咖样品中的 BITC 含量没有显著性差异。结果表明, 利用 60 °C 以上温度对玛咖进行干燥处理, 可以有效抑制酶活力, 减少芥子油苷的损失。

3 结论

本研究对新鲜玛咖中的黑芥子酶进行分离纯化, 蛋白质凝胶渗透色谱结果表明, 该酶的分子质量约为 190.9 ku, 酶学性质研究结果表明玛咖黑芥子酶的最适温度和 pH 分别为 40 °C 和 pH 7.0, 金属离子对其没有显著的激活作用, 此外还对玛咖黑芥子酶动力学参数 K_m 和 V_{\max} 值进行测定, 结果表明, 在一定范围内, 酶活力随底物浓度的升高

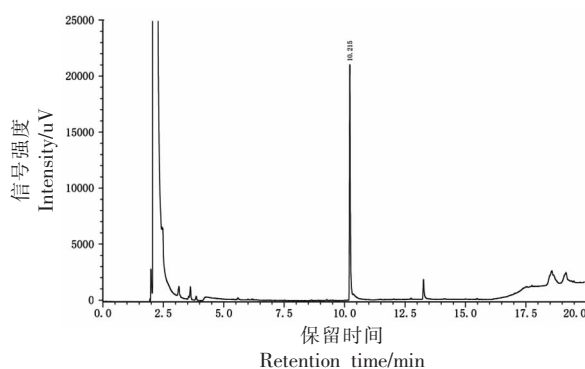


图 9 玛咖样品 BITC 气相色谱图

Fig.9 The gas chromatography of BITC from maca

表 1 干燥加工对玛咖中 BITC 含量和黑芥子酶酶活力的影响

Table 1 The effect of drying on the myrosinase activity and BITC content of maca

样品编号	黑芥子酶酶活力/ $U \cdot g^{-1}$	BITC 含量/ $mg \cdot g^{-1}$
1	0.4254 ± 0.0264^c	0.0659 ± 0.0038^a
2	0.3307 ± 0.0446^b	0.0346 ± 0.0017^a
3	0.0119 ± 0.0028^a	0.0298 ± 0.0019^a
4	0.0000 ^a	0.0257 ± 0.0031^a
5	0.7256 ± 0.0246^d	3.3190 ± 0.2083^b
6	0.0000 ^a	0.0332 ± 0.0021^a

注: 样品 1~4 分别在干燥温度 50, 60, 70, 80 °C 下处理得到, 样品 5 为玛咖鲜果, 样品 6 为市售玛咖干片; 不同字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

而增大。此外, 本研究针对玛咖干燥后的酶活力和 BITC 含量变化进行探究, 结果得到新鲜玛咖鲜果中的黑芥子酶酶活力为 0.7256 U/g, BITC 含量为 3.3190 mg/g, 随着干燥温度的上升, 玛咖样品中的黑芥子酶酶活力显著下降, BITC 含量呈下降趋势。然而, 对于一些有害酶解产物例如恶唑烷硫酮、腈类化合物在加工过程中的生成和控制还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 李婧, 孙清瑞, 张连富. 玛咖水溶性成分的抗疲劳活性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(8): 97-103.
LI J, SUN Q R, ZHANG L F. Anti-fatigue activity of water-soluble components from maca (*Lepidium meyenii* Walp.) [J]. Journal of Food Science and

- Biotechnology, 2019, 38(8): 97-103.
- [2] ZHOU B, CHEN Y, LUO H, et al. Effect of maca (*Lepidium meyenii*) extract on non-obstructive azoospermia in male mice[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 307(5): 116228.
- [3] TSUYOSHI T, KIYOSHI H. Clinical effect of oral administration of maca (*Lepidium meyenii*) extract on Japanese peri-menopausal women subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. International of Biomedical Science, 2019, 15(1): 11-18.
- [4] 邹莹, 张连富. 玛咖水提物抗小鼠前列腺增生作用[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 36(4): 371-375.
- ZOU Y, ZHANG L F. Protective effects of *Lepidium meyenii* (maca) aqueous extract on benign prostatic hyperplasia in mice[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 36(4): 371-375.
- [5] MAYUMI I, TOMOYUKI K, SHIN T, et al. Effects of benzylglucosinolate on endurance capacity in mice [J]. Journal of Health Science, 2009, 55(2): 178-182.
- [6] BHAT R, DHIRAJ V. Myrosinase: Insights on structural, catalytic, regulatory, and environmental interactions[J]. Crit Rev Biotechnol, 2019, 39(4): 508-523.
- [7] 朱容均, 房耀维, 叶沁文, 等. 产黑芥子酶鞘氨醇杆菌属菌株 RJ35 的筛选、鉴定及酶学性质[J]. 食品科学, 2023, 44(6): 214-219.
- ZHU R J, FANG Y W, YE Q W, et al. Screening, identification and enzymatic properties of myrosinase-producing sphingobacterium RJ35 [J]. Food Science, 2023, 44(6): 214-219.
- [8] MASARU O, TADAO H. General characteristics of the intracellular myrosinase from *Aspergillus niger*[J]. Agric Biol Chem, 1973, 37(11): 2543-2548.
- [9] JONES A M E, WINGE P, BONES A M, et al. Characterization and evolution of a myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(3): 275-284.
- [10] THINH N, JON S, MICHEL L, et al. Glucosinolates: Natural occurrence, biosynthesis, accessibility, isolation, structures, and biological activities[J]. Molecules, 2020, 25(19): 4537-4568.
- [11] EMILIO Y, ROMINA P, ROSANA C, et al. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1576-1583.
- [12] DONATO A, ELIZABETH J. Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7(3): 67-76.
- [13] ATLE M B, JOHN T R. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates [J]. Phytochemistry, 2006, 67(11): 1053-1067.
- [14] 董晓芳, 佟建明. 饲料中硫代葡萄糖苷、异硫氰酸酯和噻唑烷硫酮生物作用及其检测方法[J]. 动物营养学报, 2013, 25(3): 469-478.
- DONG X F, TONG J M. Glucosinolates, isothiocyanates and vinylthiooxazolidone: Biological function and its detection method[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(3): 469-478.
- [15] 涂行浩, 张弘, 郑华, 等. 响应面法优化微波钝化玛咖黑芥子酶活[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 148-153.
- TU X H, ZHANG H, ZHENG H, et al. Optimization of microwave inactivation of myrosinase activity in maca by response surface methodology [J]. Food Science, 2011, 32(18): 148-153.
- [16] 涂行浩, 郑华, 张弘, 等. 高温短时蒸汽处理对玛咖黑芥子酶活性及品质的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(21): 4447-4456.
- TU X H, ZHENG H, ZHANG H, et al. Effects of high temperature-short time steam blanching (HT-STSB) on myrosinase activity and nutrients of maca [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(21): 4447-4456.
- [17] CHUNG-SHIH T. Benzyl isothiocyanate of papaya fruit[J]. Phytochemistry, 1971, 10(1): 117-121.
- [18] 朱华平, 赵毅蒙, 李超, 等. 番木瓜籽中异硫氰酸苄酯抗癌抑菌功能研究进展[J]. 现代食品科技, 2018, 34(3): 270-275.
- ZHU H P, ZHAO Y M, LI C, et al. Research progress on antitumor and antibacterial functions of benzyl isothiocyanate in papaya seeds [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(3): 270-275.
- [19] 程月, 朱姗姗, 刘静, 等. 异硫氰酸苄酯对于黄曲霉生长速率和产毒情况的影响[J]. 核农学报, 2022, 36(1): 114-120.
- CHENG Y, ZHU S S, LIU J, et al. Effects of benzyl isothiocyanate on growth and toxin production

- of *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(1): 114–120.
- [20] 王翠, 李萍, 李超, 等. 异硫氰酸苜蓿及其类似物抑菌活性的初步探究[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 84–89.
- WANG C, LI P, LI C, et al. Preliminary study on antibacterial activity of benzyl isothiocyanate and its analogues[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(16): 84–89.
- [21] 张奇, 周建文, 王明, 等. 异硫氰酸苜蓿对人脑胶质母细胞瘤 U251 细胞侵袭转移的抑制作用研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2019, 53(4): 347–351.
- ZHANG Q, ZHOU J W, WANG M, et al. Effect of benzyl isothiocyanate inhibiting invasion and migration of human glioma U251 cell lines[J]. Journal of Harbin Medical University, 2019, 53(4): 347–351.
- [22] LI J, ZOU Y, SUN Q R, et al. Effect of physical and thermal processing upon benzylglucosinolate content in tubers of the Brassicaceae (*Lepidium meyenii*) using a novel rapid analytical technique[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2015, 50(11): 2443–2450.
- [23] 李艳. 自选酿酒酵母(KDLYS9-3)产 β -D-葡萄糖苷酶动力学研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(23): 165–170.
- LI Y. Research on the enzyme kinetics of producing beta-D-glucosidase from indigenous *Saccharomyces cerevisiae* KDLYS9-3[J]. Food Research and Development, 2017, 38(23): 165–170.
- [24] 李泽友, 沈文涛, 言普, 等. 番木瓜中异硫氰酸苜蓿及其前体物质苜蓿基硫代葡萄糖苷的含量分析[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(4): 678–681.
- LI Z Y, SHEN W T, YAN P, et al. Analysis of benzyl isothiocyanate and its precursor—benzyl glucosinolate in *Carica papaya* L.[J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(4): 678–681.
- [25] ANDREA M, ALEJANDRO A, FERNANDA C. Purification and characterization of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) myrosinase (beta-thioglucosidase glucohydrolase)[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(48): 11666–11671.
- [26] ROHINI B, TARANDEEP K, MANU K, et al. Purification and characterization of a novel redox-regulated isoform of myrosinase (beta-thioglucosidase glucohydrolase) from *Lepidium latifolium* L.[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(47): 10218–10226.
- [27] HELENA G, ZOLTÁN P, ALBERT B, et al. Sulphoraphane affinity-based chromatography for the purification of myrosinase from *Lepidium sativum* seeds[J]. Biomolecules, 2022, 12(3): 406–422.
- [28] 孙艳伟, 张泽生, 王田心, 等. 十字花科植物中黑芥子酶的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(11): 216–220.
- SUN Y W, ZHANG Z S, WANG T X, et al. The research progress of myrosinase in cruciferous plants[J]. Food Research and Development, 2017, 38(11): 216–220.
- [29] EPSTEIN E, HAGEN C E. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots[J]. Plant Physiology, 1952, 27(3): 457–474.
- [30] HUANG Z F, LIU N N, FANG Y W, et al. Purification and characterization of a cold-active myrosinase from marine *Pseudomonas oleovorans* SuMy07[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2023, 55(4): 695–699.

The Enzymatic Properties and Processing Stability of Myrosinase from Maca (*Lepidium meyenii* Walp.)

Li Jing¹, Yang Cheng², Niu Lisha³, Yu Yanli^{1*}

¹Sanda University Shanghai, Shanghai 201209

²School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

³Hebei Food Inspection and Research Institute, Shijiazhuang 050091

Abstract After extraction, dialysis and gel filtration chromatography, the myrosinase in fresh maca tubers was purified. The enzymatic properties, kinetic parameters of myrosinase were studied. Moreover, the effect of drying on the myrosinase activity and benzyl isothiocyanate (BITC) content of maca was investigated. The molecular weight of purified myrosinase

was 190.9 ku determined by gel permeation chromatography (GPC). The results of enzymatic properties showed that the optimum temperature of myrosinase was 40 °C, and the optimum pH value was 7.0. The metal ions Fe^{3+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} had significant inhibitory effects on the myrosinase. The kinetic parameters $V_{\max} = 0.2383$ ($\mu\text{mol/L}/\text{min}$), and $K_m = 0.1425$ mmol/L were determined by the method of Lineweaver–Burk. The myrosinase activity and BITC content of fresh maca were 0.7256 U/g and 3.3190 mg/g, respectively. The fresh maca samples were sliced and dried at the temperature of 50, 60, 70 °C, and 80 °C, respectively. As the drying temperature increased, the myrosinase activity in the maca sample significantly decreased, and the BITC content showed a decreasing trend. This study has improved the theoretical study of the myrosinase from maca. It is proposed that drying maca at temperatures above 60 °C can effectively inhibit the myrosinase activity. These results may provide guidance for the processing and utilization of maca.

Keywords myrosinase; maca; enzymatic property; myrosinase activity; benzyl isothiocyanate