黑芥子酶固定化在制备莱菔素中的应用

程立, 李思彤, 袁其朋*

北京化工大学, 化工资源有效利用国家重点实验室, 北京 100029

* 通讯作者, E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

收稿日期: 2017-12-30; 接受日期: 2018-04-18; 网络版发表日期: 2018-05-30

国家重点研发计划(编号: 2016YFA0201501)资助

摘要 硫代葡萄糖苷-黑芥子酶体系是一种广泛存在于十字花科植物中的抗虫体系。在植物细胞被破碎之后, 硫代葡萄糖苷会与内源的黑芥子酶相接触, 并被其降解成为可以抗虫的异硫氰酸酯类化合物。异硫氰酸酯类化合物在近年来还被发现具有很好的抗癌活性, 其中抗癌活性最高的化合物之一就是从中药莱菔子中提取的莱菔素。但是, 使用内源性的黑芥子酶酶解硫代葡萄糖苷时, 原料中的杂酶会导致大部分底物转化为副产物腈类, 不仅导致产量大幅度降低, 而且为后续的纯化带来困难。本文开发出了使用纯化并固定化后的黑芥子酶生产莱菔素的工艺, 使得底物转化率从10%~30%稳定提高到80%以上, 不仅提高了产量, 而且降低了对提取原料的要求。

关键词 硫代葡萄糖苷, 黑芥子酶, 异硫氰酸酯, 莱菔素

1 引言

由于人口快速增长和老龄化问题, 癌症已经成为严重威胁我国居民健康和生命的重大疾病, 发病率和死亡率均持续提高, 给我国医疗卫生行业带来沉重负担。化疗是目前肿瘤治疗手段中除手术、放疗外最重要的治疗手段, 异硫氰酸酯类化合物作为一种抗癌活性成分, 其适合口服的理化性质使其具有良好的临床前景^[1-3]。莱菔素(sulforaphene, SFE)作为异硫氰酸酯类化合物(isothiocyanate)中的一种, 不仅可以激活体内二相酶, 加速体内有毒物质代谢; 而且可以直接诱导肿瘤细胞凋亡, 有效抑制肺癌、胰腺癌、乳腺癌、宫颈癌、恶性黑色素瘤等多种癌细胞的生长, 从而达到防癌抗癌的双重功效^[4-8]。但由于莱菔素结构内存在手性

药物原子, 难以低成本化学合成, 目前主要采用提取工艺制备。植物化学表明, 长期食用十字花科植物可以显著降低罹患癌的风险, 这就是因为在十字花科植物中存在硫代葡萄糖苷-黑芥子酶体系, 当十字花科植物被食用后, 植物中的硫代葡萄糖苷被黑芥子酶分解成为异硫氰酸酯类化合物^[9,10]。现阶段的提取工艺同样是利用这一体系, 但是如果过程控制不当, 易产生环硫脒、硫氰酸、唑烷等高毒性杂质, 降低产品安全性^[11-13]。

迄今为止, 国内外均有课题组做过相关工作, 工艺简单总结如下: 使用十字花科植物为原料, 通过细胞破碎使其内源性的硫代葡萄糖苷与内源性的黑芥子酶相接触, 促使硫代葡萄糖苷水解转化为中间产物脱糖硫苷, 之后这一中间产物再通过重排反应最终转化为异硫氰酸酯, 并通过优化酶解条件加快其生成速度, 减

引用格式: Cheng L, Li S, Yuan Q. The application of myrosinase immobilized in the production of sulforaphene. *Sci Sin Chem*, 2018, 48: 676–682, doi: 10.1360/N032017-00222

少其在酶解过程中的降解, 从而增加目标产物的产量^[14~17]. 但是十字花科植物中普遍存在ESP蛋白(epithiospecifier protein), 这种蛋白可以催化中间产物生成副产物腈类物质, 大幅度减少异硫氰酸酯类化合物的产量^[18], 以往的工艺并不能很好地抑制原料中ESP蛋白的影响, 仍然会有部分底物通过ESP蛋白的催化生成腈类, 从而导致目标产物的产量较低.

如图1所示, 黑芥子酶的热稳定性明显高于ESP蛋白, 因此通过提高水解温度, 可在保证黑芥子酶酶活的同时降低ESP蛋白的酶活, 从而减少腈类物质的生成, 也有课题组通过对提取原料进行预加热达到类似的效果. 此外, 本课题组还发现异硫氰酸酯类化合物容易与水、甲醇等质子型溶剂反应, 导致其异硫氰酸基被破坏^[19,20], 丧失抗癌活性. 抗坏血酸可作为黑芥子酶的激活剂在一定浓度下大幅度提高黑芥子酶的活性, 缩短整个水解过程, 降低产物在生产过程中的降解量. 此外, 本课题组还发现异硫氰酸酯类化合物会与提取过程中产生的 H_2S 快速反应, 同样会造成异硫氰酸基被破坏^[17], 然而, 由于在ESP蛋白催化生成腈类物质的同时, 也会生成 H_2S , 因此彻底解决ESP蛋白的影响是提高莱菔素产量的关键. 在经过尝试后, 发现很难在保证黑芥子酶酶活的前提下完全抑制ESP蛋白的活性, 因此, 本课题组的目标转变为纯化黑芥子酶后将其进行固定化, 从而达到提高底物转化率的要求.

2 实验部分

2.1 试剂

实验中使用的十字花科植物种子来自相应产地, 高效液相色谱测试试剂购置于Fisher Scientific公司(美国), LX-1000EP树脂购置于西安蓝晓公司, 其他试剂购置于国药集团化学试剂有限公司(中国).

2.2 仪器

800Y中药材粉碎机: 上海旭曼机电有限公司, ZYJ-909小型榨油机: 中国贝尔斯顿设备有限公司, YS-80中试榨油机: 郑州毅胜机械设备有限公司, SPD-20A分析型高效液相色谱仪: 日本岛津公司.

2.3 萝卜硫苷提取液的制备

将20 g使用粉碎机充分粉碎的莱菔子粉末加入到

200 mL沸水中进行提取, 提取时间为30 min. 使用滤布过滤提取液后分别回收滤渣与滤液, 将滤渣重新加入到200 mL沸水中进行提取, 提取时间为30 min. 重复5次后合并5次所收集到的滤液, 测量体积后放入4℃冰箱中待用.

2.4 黑芥子酶粗酶液的制备

使用 KH_2PO_4 与 K_2HPO_4 配制pH=6.8的PBS缓冲液, 并加入二硫苏糖醇, EDTA与甘油. 取10 g充分粉碎的莱菔子(或其他十字花科蔬菜的种子)粉末加入100 mL上述缓冲液, 冰浴条件下超声20 min进行细胞破碎, 制备黑芥子酶提取液. 取上述黑芥子酶提取液在4℃条件下, 6000 r/min离心40 min, 取上清液并用上述缓冲液定容至150 mL, 在冰水浴条件下加入52.65 g硫酸铵, 待完全溶解后保持冰水浴120 min. 之后再次在4℃条件下, 6000 r/min离心40 min, 弃去上清将固体置入8000~14000 kD透析袋中透析8 h去除硫酸铵, 得到黑芥子酶粗酶液.

2.5 黑芥子酶粗酶液酶学性质表征

取按照2.3中的方法制备的萝卜硫苷标准溶液作为水解原液, 在pH=6, 温度为25℃的条件下加入黑芥子酶粗酶液酶解10 min, 之后迅速用盐酸将pH调节至2. 之后使用2.7中的方法测定萝卜硫苷水解前后的减少量, 从而计算黑芥子酶粗酶液的酶活. 黑芥子酶酶活(U)的定义: 在pH=6, 温度为25℃时, 每分钟催化水解1 μ mol萝卜硫苷所需要的酶量即为1 U. 黑芥子酶比活力单位(U/g): 每克蛋白中含有的黑芥子酶酶活.

2.6 莱菔素水解液的制备

取2.3制备得到的萝卜硫苷提取10 mL, 加入缓冲盐调节pH至6, 之后加入黑芥子酶水解萝卜硫苷, 在达到所需水解时长后使用浓盐酸将pH调节至2停止反应, 过滤去除由于pH变化沉淀的蛋白后得到莱菔素水解液.

2.7 高效液相色谱测定萝卜硫苷与莱菔素含量

使用高效液相色谱法测定萝卜硫苷含量时, 选择迪马公司(Dikma)的C-18反相色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, DiamodsilTM), 流动相的选择是甲醇和含有0.02%三氟乙酸的超纯水的混合体系, 检测波长为235 nm. 检

图1 萝卜硫苷水解途径。(1) 萝卜硫苷; (2) 莱菔素; (3) 莱菔素腈

Figure 1 Radish glucosinolate hydrolysis pathway. (1) Radish glucosinolate; (2) Sulforaphene; (3) Sulforaphene nitrile.

测方法是梯度洗脱20 min, 甲醇浓度从0 min的1%线性提高到20 min时的15%, 柱温箱设定为35℃, 流速是1 mL/min, 进样量为20 μ L. 使用高效液相色谱法测定莱菔素含量时, 选择迪马公司(Dikma, 中国)的C-18反相色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, DiamodasilTM), 流动相的选择是甲醇和含有0.02%三氟乙酸的超纯水的混合体系, 检测波长为254 nm. 检测方法是梯度洗脱20 min, 甲醇浓度从0 min的20%线性提高到20 min时的80%, 柱温箱设定为35℃, 流速是1 mL/min, 进样量为20 μ L.

2.8 树脂的预处理及酶的固定化

LX-1000EP树脂应该先进行活化预处理, 配取400 mL, 0.1 M, pH为8的磷酸缓冲液后加入称取的100 g树脂, 在室温下以200 r/min的转速充分搅拌15 min, 在此过程中维持pH在7.8~8.2, 1 h后过滤抽干, 得到活化的LX-1000EP树脂. 之后加入一定量的粗酶液, 室温震荡即可.

2.9 酶的固载率

使用考马斯亮蓝法绘制蛋白质含量标准曲线. 在10 mL磷酸缓冲液体系中用1.0 g活化后的树脂固定酶活为0.1 U/mL的粗酶液, 借助标准曲线测定可溶性蛋白含量, 从而得到酶的固载率.

3 结果与讨论

3.1 不同来源的黑芥子酶对萝卜硫苷水解的影响

通过总结前人的经验, 本课题组的想法是首先提取莱菔子中的萝卜硫苷, 之后纯化黑芥子酶, 彻底去除ESP酶, 从而阻止腈类物质的生成, 并且同时阻止了H₂S的生成, 减少了在水解萝卜硫苷的过程中莱菔素自身的降解, 从而提高莱菔素的产量. 对比不同十字花科植物中硫代葡萄糖苷与萝卜硫苷的结构, 选择了几种富含类似结构的十字花科植物, 包括: 西兰花、油菜等, 作为黑芥子酶的来源. 从表1中可以看出不同来源的黑芥子酶对萝卜硫苷的酶活差距较大, 其中西兰花来源和莱菔子来源黑芥子酶在纯化后都有较高的酶活, 均大于0.15 U/mL. 油菜籽来源的黑芥子酶次之, 酶活在0.1 U/mL左右, 另外两种植物来源的酶活较低.

3.2 不同来源的黑芥子酶对萝卜硫苷水解转化率的影响

由于黑芥子酶本身是一类同工酶, 并且每种植物本身含有的黑芥子酶也不是单一结构, 而且不同植物中所含有的ESP蛋白量也有不同, 因此首先测试了在萝卜硫苷提取液中直接加入粉碎后的不同植物, 测试其对萝卜硫苷转化率的影响. 从表1中可以看出, 未纯化的黑芥子酶的活性与莱菔素的转化率并没有太大关系, 也就表示黑芥子酶的活性与ESP蛋白的活性没有直接关系. 其中, 莱菔子中的黑芥子酶活性较高, 但是使用其未纯化的黑芥子酶水解萝卜硫苷时, 莱菔素转化率仅有20%左右, 通过测试^[17], 发现莱菔素与H₂S反应生成的降解产物含量很高, 在反应结束后的2 h内, 超过80%的莱菔素通过H₂S途径降解.

有文献报道^[18], ESP蛋白的活性可能与体系中的Fe²⁺有关, 因此, 这里选择硫酸铵沉淀法简单纯化黑芥子酶, 这样虽然可能不能将ESP蛋白完全去除, 但是可以通过最后透析的步骤完全去除Fe²⁺以及粗酶液中可能存在的H₂S, 从而不仅去除ESP蛋白的酶活, 并且阻止了莱菔素与H₂S的降解反应. 由表1也表明了通过对黑芥子酶的纯化, 可以有效地阻止腈类的生成以及莱菔素在水解过程中的损失, 从而大幅度提高了底物萝卜硫苷转化为莱菔素的转化率, 并且稳定在75%~80%, 其中来源自河北的一种油菜籽中的黑芥子酶在纯化后对萝卜硫苷转化为莱菔素的转化率达到82.2%.

表 1 不同来源的黑芥子酶酶学性质统计^{a)}Table 1 Statistics of enzymatic properties of myrosinase from different sources^{a)}

	产地	黑芥子酶粗酶液比酶活(U/mL)	底物转化率(%) (未纯化) [*]	底物转化率(%) (纯化后)
西兰花	云南	0.19±0.02	25.6±2.3	77.6±1.2
西兰花	江苏	0.16±0.03	56.8±6.3	74.6±3.2
西兰花	美国	0.20±0.05	12.2±2.5	75.4±6.2
菜菔子	江苏	0.19±0.03	12.5±1.5	74.9±2.2
菜菔子	安徽	0.15±0.01	21.8±1.6	76.2±1.5
油菜	甘肃	0.09±0.01	61.2±2.3	77.6±2.8
油菜	河北	0.11±0.01	60.1±3.3	82.2±3.1
花椰菜	安徽	0.06±0.01	23.6±2.5	76.1±2.1
白菜	辽宁	0.02±0.01	43.6±6.4	71.5±4.2

a) *: 未纯化的黑芥子酶即直接将十字花科种子粉碎后加水, 其上清液的酶活

3.3 原料预处理方式对萝卜硫苷提取率的影响

萝卜硫苷作为植物抵御虫害的一种防御机制的成分, 其本身在植物细胞内的储存就不会过于暴露, 因此首先要考虑的就是细胞破碎的效果, 此外, 由于在细胞被破碎后, 萝卜硫苷与菜菔子中本身含有的黑芥子酶在有水的环境下就会发生降解, 在原有工艺中, 细胞破碎后使用内源酶降解萝卜硫苷, 此时可以将粉碎好的原材料直接加入提取溶剂中即可, 而现在的工艺思路是需要原料接触到水之前先将其内部的酶灭活, 因此除了细胞破碎的效果之外, 还要考虑如何处理体系中原有的酶。

3.3.1 高温提取对萝卜硫苷提取率的影响

中药材电动研磨超细打粉机可以快速制备小试足量的菜菔子粉末。使用鼓风干燥器灭除原料中的酶活, 本课题组在尝试了80℃~150℃这一区间内的温度后发现, 在烘箱温度达到130℃以上0.5 h后菜菔子粉末随即出现烤糊、发黑等情况, 故后续实验选择120℃进行加热, 并考察了在120℃下加热时间对酶的影响, 这里是为了方便后续添加外源酶时不受其他因素的影响。此处的目标是在加热处理后, 再将菜菔子粉末放入水中后萝卜硫苷不发生降解。测试可知, 在120℃加热超过2 h后, 黑芥子酶完全被灭活, 因为ESP蛋白热稳定性明显低于黑芥子酶, 因此认为这种条件下ESP蛋白同样完全失活。

然而, 仅通过粉碎显然不能将所有萝卜硫苷从菜

菔子的细胞中释放出来, 再结合需要工艺中灭酶的需求, 选择使用甲醇、乙醇以及不同温度的pH=7的去离子水对一种产地为安徽的菜菔子进行萝卜硫苷提取量的测试。考虑到黑芥子酶大约在70℃以上时会快速失活, 故提取温度设置为70℃~100℃, 提取时间为30 min。分析表2结果得知, 使用热水的提取效率较高, 均大于提取原料总重的2%, 其他组别较低。推测提取率低的原因可能是由于萝卜硫苷本身容易电离并且羟基较多, 因此不易溶于有机试剂, 故效果较差; 此外由于在70℃时, 菜菔子中的黑芥子酶仍然存在一定活力, 因此会有部分萝卜硫苷通过黑芥子酶降解, 从而减少提取率。随着温度提高萝卜硫苷的提取率略有上升, 在使用沸水提取时, 提取率有明显提高, 达到3.22%, 这应该得益于植物细胞内部的细胞液也达到了沸腾, 并从内部撑破了细胞壁。因此, 又考察了沸水提取的时间对萝卜硫苷提取效率的影响。可以看出在沸水的条件下, 5 min即可达到很好的效果, 达到3.19%, 同时看出萝卜硫苷的热稳定性较好, 沸水提取5 h也没有明显降解, 提取率仍保持在3.21%。

3.3.2 物理压榨对萝卜硫苷提取率的影响

然而, 上述方式在中试生产中出现了一定问题。在中试生产中发现萝卜硫苷提取率较低, 分析原因是因为在处理百公斤级的菜菔子时所能选择的中试级粉碎机粉碎效果较差, 将得到的粉末过筛后, 分析各组分的萝卜硫苷提取率发现, 越细的粉末效果越好。而能够达

表 2 不同提取条件对萝卜硫苷提取量的影响^{a)}

Table 2 Effect of different extraction conditions on extract amount of radish glucosinolate^{a)}

提取溶剂	温度(℃)	提取时间(min)	提取量 [*] (%)
甲醇	沸腾	30	1.55±0.22
乙醇	沸腾	30	1.89±0.18
去离子水	70	30	2.11±0.09
去离子水	80	30	2.68±0.11
去离子水	90	30	2.91±0.26
去离子水	100	30	3.22±0.22
去离子水	100	5	3.19±0.16
去离子水	100	300	3.21±0.28

a) *: 提取量为提取萝卜硫苷重量占提取原料重量的比例

到小试粉碎机效果的粉末只占到总粉末的不到20%，这大大增加了萝卜硫苷提取的难度。虽然增加提取温度还是能够在一定程度上增加萝卜硫苷的提取率，但是整体来看仍然较低，本着高效节能的原则，沸水提取不是工业化生产的最优解。

由于十字花科植物种子的油量均较高，是常见的油料作物，而物理压榨可以促使油脂从细胞内释放出来，应该也可以通过破坏细胞结构促使萝卜硫苷释放，故尝试采用物理压榨的方式进行细胞破碎。分析表3中的提取效果发现，不论是小试的榨油机还是工业级榨油机处理后的莱菔子样品，在使用烘箱灭酶后，用室温的去离子水提取都有很好的萝卜硫苷提取率，均达到了小型粉碎机沸水提取的效果，提取率均达到3.2%左右，这一预处理步骤不仅减少了能源的消耗，而且缩短了处理时间，大幅度提高了产能。

3.4 黑芥子酶固定化对萝卜硫苷水解的影响

通过上文可以得出不同的处理方式对萝卜硫苷提取率的影响，而萝卜硫苷的提取率会直接影响到其水解效果。工业化生产时纯化黑芥子酶成本较高，因此选择酶固定化的方式在反应结束后回收纯化后的黑芥子酶，从而降低成本。为实现工业化生产，选择的固定化方法需操作简单，且反应之后的固定化酶与产物应较易于分离，因此固定化载体由于它价格低廉且容易保存的特性成为首选。在对一些载体的筛选后，选择了西安蓝晓公司的LX-1000EP树脂，该树脂带有特殊官能团含环氧丙基，这种官能团可以与酶共价结合，

表 3 不同预处理设备对萝卜硫苷提取量的影响^{a)}

Table 3 Effect of different equipment on the extraction amount of radish glucosinolate^{a)}

预处理设备	室温提取量(%) [*]	沸水提取量(%)
小型粉碎机	2.71±0.11	3.25±0.32
工业级粉碎机	1.03±0.09	2.15±0.26
小型榨油机	3.17±0.22	3.18±0.16
工业级榨油机	3.21±0.24	3.22±0.19

a) *: 室温提取之前均经过烘箱灭酶

LX-1000EP树脂的环氧基与酶分子的氨基直接通过共价键结合，绝大多数蛋白质均可以通过这一方法进行固定化。

3.4.1 固定化载体添加量的优化

由于在固定化过程中，过少的载体添加量会造成黑芥子酶固载率较低，而过多的载体量则势必会造成浪费。如图2所示，随着在酶活为0.1 U/mL的1 mL粗酶液中添加的载体量的增加，固载率也随之增加。在载体添加量达到0.6 g时，其固载率达到84.5%，后续进一步增加载体添加量也不在进一步提高固载率，因此选择0.6 g为载体添加量。

3.4.2 固定化时间的优化

过短时间的固定化可能会导致固定化不完全，过长时间的固定化则可能会使酶活下降，因此需要优化

图 2 载体添加量对黑芥子酶固载率的影响

Figure 2 Effect of the quantity of resin added on the immobilized yield of myrosinase.

图 3 固定化时间对黑芥子酶固载率的影响

Figure 3 Effect of the immobilized time on the immobilized yield of myrosinase.

出一个合适的时间进行固定化。如图3所示, 固定化时间小于4 h时, 随着固定化时间的延长, 固载率逐步提高, 在固定化时间达到4 h后, 其固载率可以达到80%以上, 进一步提高固定化时间固载率不再提高, 因此选择4 h作为固定化时间。

图 4 循环次数对固定化黑芥子酶活性的影响

Figure 4 Effect of cycle times on immobilized myrosinase activity.

3.4.3 固定化酶稳定性评价

如图4, 通过固定化黑芥子酶的循环酶解测试可以看出, 在循环使用10次之后, 固定化的黑芥子酶酶活略有下降, 仍然可以达到初始酶活的80%以上, 这大大降低了莱菔素生产中黑芥子酶的成本。

4 结论

通过实验研究发现, 使用外源黑芥子酶酶解萝卜硫苷比使用内源性的黑芥子酶, 可以通过降低ESP酶活性, 减少副产物的产生, 稳定提高萝卜硫苷转化为莱菔素的转化率, 降低对原材料品种的要求; 此外, 物理压榨可以在不降低提取效果的同时, 大幅度降低原料中莱菔子的植物细胞破碎的成本, 是一种适合中式生产莱菔素的原料预处理的方法; 并且, 使用环氧树脂对黑芥子酶固定化可以在不降低底物转化率的同时, 大幅度降低生产的成本。

参考文献

- Lee JH, Khor TO, Shu L, Su ZY, Fuentes F, Kong ANT. *Pharmacol Therapeutics*, 2013, 137: 153–171
- Russo GL. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74: 533–544
- Venugopal R, Liu RH. *Food Sci Human Wellness*, 2012, 1: 1–13
- Walters DG, Young PJ, Agus C, Knize MG, Boobis AR, Gooderham NJ, Lake BG. *Carcinogenesis*, 2004, 25: 1659–1669
- Wang N, Tao Q, Shen L Q, Wang KW, Wang XY, Wu A, Tang Y. *Acta Pharmaceut Sin*, 2010, 45: 934–939
- Yang M, Ren M, Qu Y, Teng W, Wang Z, Li H, Yuan Q. *RSC Adv*, 2016, 6: 70326–70334
- Yang M, Teng W, Qu Y, Wang H, Yuan Q. *Breast Cancer Res Treat*, 2016, 158: 277–286
- Yang M, Wang H, Zhou M, Liu W, Kuang P, Liang H, Yuan Q. *Oncotarget*, 2016, 7: 76656–76666
- Hayes JD, Kelleher MO, Eggleston IM. *Eur J Nutr*, 2008, 47: 73–88

- 10 Hecht SS. *Drug Metab Rev*, 2000, 32: 395–411
- 11 Vaughn SF, Berhow MA. *Ind Crops Prod*, 2005, 21: 193–202
- 12 Rask L, Andréasson E, Ekblom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 93–114
- 13 Bones AM, Rossiter JT. *Phytochemistry*, 2006, 67: 1053–1067
- 14 Muto M, Huang JW, Takahashi H. *Plant Pathol Bull*, 2004, 13: 275–282
- 15 Kim KH, Moon E, Kim SY, Choi SU, Lee JH, Lee KR. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151: 503–508
- 16 Wang N, Wang W, Huo P, Liu CQ, Jin JC, Shen LQ. *Asian Pac J Cancer Prevent*, 2014, 15: 2133–2139
- 17 Song D, Liang H, Kuang P, Tang P, Hu G, Yuan Q. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 5097–5102
- 18 Williams DJ, Critchley C, Pun S, Chaliha M, O'Hare TJ. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 8512–8521
- 19 Tian G, Li Y, Cheng L, Yuan Q, Tang P, Kuang P, Hu J. *Food Chem*, 2016, 194: 1022–1027
- 20 Tian G, Tang P, Xie R, Cheng L, Yuan Q, Hu J. *Food Chem*, 2016, 199: 301–306

The application of myrosinase immobilized in the production of sulforaphene

Li Cheng, Sitong Li, Qipeng Yuan*

State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

*Corresponding authors (email: yuanqp@mail.buct.edu.cn)

Abstract: The glucosinolate-myrosinase system which widely existed in cruciferous plants can protect plants from insects because glucosinolates will breakdown to isothiocyanates by endogenous myrosinase after plant cells are crushed. In recent years, isothiocyanates have been found to have good anti-cancer activity. Sulforaphene isolated from radish is one isothiocyanate that has the highest anticancer activity. However, when endogenous myrosinase was used to catalyze glucosinolates, the miscellaneous enzyme in the raw material would cause most of the substrate breakdown to by-product nitriles, which not only lead to a significant reduction in yield of sulforaphene, but also increased the separation difficulty. Therefore, we have developed a process for the production of sulforaphene using purified and immobilized myrosinase, which has resulted in a steady increase of the substrate conversion rate from 10% to 30% to more than 80%. It not only increased yield of sulforaphene but also increased the range of radish to choose from.

Keywords: glucosinolate, myrosinase, isothiocyanate, sulforaphene

doi: [10.1360/N032017-00222](https://doi.org/10.1360/N032017-00222)