

# 芦笋过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶特性 及抑制条件的研究

李艳华,王庆国

(山东农业大学食品科学与工程学院,山东泰安,271018)

**摘要** 采用分光光度法对芦笋组织中与老化相关的过氧化物酶(POD)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)的酶学特性进行了研究。结果表明,芦笋 POD 和 PAL 的最适 pH 分别为 4.0 和 8.8,且在 pH 值 6 的柠檬酸缓冲液中酶活力均明显下降;最适温度分别为 55℃ 和 60℃,且在 20℃ 以下和 60℃ 以上活性显著降低;1mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  显著( $P < 0.05$ )抑制芦笋 POD 和 PAL 酶的活力;POD 和 PAL 最适底物浓度分别为  $70\mu\text{L}/100\text{ mL}$  和  $0.02\text{mol/L}$ ,  $K_m$  分别为  $2.694 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$  和  $0.138\text{ mmol/L}$ 。

**关键词** 芦笋,过氧化物酶,苯丙氨酸解氨酶,特性研究

芦笋肉质鲜嫩,采后极易老化,肉质变硬,纤维素和木质素含量增多,食用后留有残渣,是贮藏保鲜和加工业中的一大难题。芦笋质地老化主要表现为表皮细胞和肉质部维管束细胞的木质化<sup>[1]</sup>,而木质素含量的变化与  $\text{O}_2^-$  含量、 $\text{H}_2\text{O}_2$  含量、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂醇脱氢酶(CAD)、过氧化物酶(POD)活性变化呈显著正相关<sup>[2]</sup>,在转反义 Ntlim1 烟草植株中,苯丙烷类合成途径中的关键酶 PAL、C4L、CAD 活性受到抑制且木质素含量降低了 27%<sup>[3]</sup>。PAL 是植物次生代谢的限速酶和关键酶,能催化苯丙氨酸转化为肉桂酸,对整个代谢过程起着重要的调控作用,而 POD 则在木质素生物合成的最后一步通过催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解而使木质素单体发生聚合反应生成木质素,因此 PAL 和 POD 都能促进木质素的合成,提高组织的木质化程度<sup>[4]</sup>。

目前有关蔬菜质地老化的研究虽有一些报道,但针对芦笋采后老化的 2 种关键酶(PAL 和 POD)酶学特性研究较少。本课题针对芦笋贮藏保鲜对其品质影响较大的 PAL 和 POD 酶特性进行了较深入的探索,以期对延缓绿芦笋木质化以及绿芦笋贮藏保鲜提供技术支持。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料

芦笋:采自山东日照莒县,品种为 UC800,5 年生的优级笋。

第一作者:在读硕士研究生。

\* 山东省科技厅《果蔬运销技术体系及相关设备的研究与开发》资助项目

收稿日期:2007-03-19

缓冲液:0.1mol/L 柠檬酸缓冲液(3~6),0.1mol/L 磷酸缓冲液(6~8);Tris 缓冲液(7.2~9.0),硼酸缓冲液(7.6~9.2);20mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,丙酮等。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 酶活性测定

##### 1.2.1.1 粗酶液的提取

丙酮抽提物的制备:新鲜芦笋切碎→利用匀浆机打成匀浆→取匀浆,加入 4 倍体积的丙酮( $-20^\circ\text{C}$ )→沉淀蛋白质→在  $0\sim4^\circ\text{C}$ ,4000 r/min 下离心→将沉淀真空冷冻干燥后得丙酮抽提物。

粗酶液的提取:取 0.5g 丙酮抽提物,加入 30 mL  $0\sim4^\circ\text{C}$  预冷的 20 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH4.5)溶液,搅拌 15min,然后在 4 800r/min 下离心 15 min,倾出上清液保存在冷处,残渣再用 20 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液提取 1 次,合并 2 次上清液,贮存于冷处备用,上清液即为过氧化物酶的提取液;另取 0.5g 丙酮抽提物,加入 30 mL  $0\sim4^\circ\text{C}$  预冷的 0.2mol/L 硼酸缓冲液(pH8.8),搅拌 15 min,然后在 4 800 r/min 下离心 15 min,残渣再用 20 mL 0.2mol/L 硼酸缓冲液(pH8.8)提取 1 次,合并 2 次上清液,贮存于冷处备用,上清液即为苯丙氨酸解氨酶的提取液。

##### 1.2.1.2 酶活力测定及酶活力单位的定义

(1) POD 活力测定:参照张志良的方法<sup>[5]</sup>。以愈创木酚为底物,在 1 mL 酶液中加入 3 mL 反应混和液,组成 pH 4.5,浓度为 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液 100 mL,30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  38 $\mu\text{L}$ ,愈创木酚 70 $\mu\text{L}$ ,反应开始,立即测定 470nm 下的吸光值,每 30 s 记数以加热煮沸 5 min 的酶液作为对照。以 1 mL 酶液,1 min 内增加的 OD 值表示酶活力(u)。

(2) PAL 活力测定:参照孙广宇的方法<sup>[6]</sup>。4 mL 0.2 mol/L pH 8.8 硼砂缓冲液, 2 mL 20 mmol/L L-苯丙氨酸和 1 mL 酶提取液, 在 37℃ 下反应 1 h 后测定 290 nm 吸光值, 以煮沸 5 min 的酶液作对照。以 1 mL 酶液, 1 h 内增加的 OD 值表示酶活力(u)。

以上测定在恒温, pH 值不变的条件下进行, 其余测定方法同上, 仅改变 pH、温度、底物浓度、酶浓度、金属离子等。

### 1.2.2 芦笋 POD 和 PAL 在不同 pH 值下的活力及其耐受性测定

仅将“过氧化物酶活力测定”中的柠檬酸缓冲液进行调整, 分别为柠檬酸缓冲液(3.0~6.0), 磷酸缓冲液(6.0~8.0); 将“苯丙氨酸解氨酶活力测定”中的缓冲液进行调整, 分别为 Tris 缓冲液(7.2~9.0)和硼酸缓冲液(7.6~9.2), 其余操作同“酶活力测定”; 将酶液与缓冲液等体积混合处理 5 min, 测定酶活力。

### 1.2.3 芦笋 POD 和 PAL 在不同温度下的活力测定

在 30~70℃ 下按照“酶活力测定”方法分别测定 2 种酶的活力

### 1.2.4 底物浓度对酶促反应速度的影响的测定方法

调整反应体系中底物的浓度, 即 100 mL 缓冲液中愈创木酚调整为 14~140  $\mu$ L; L-苯丙氨酸的浓度调整为 0.002~0.1 mol/L, 其他条件同“酶活力测定”。

### 1.2.5 酶液浓度对酶促反应速度的影响的测定方法

其余条件不变, 仅改变反应体系中酶液浓度, 测定 POD 及 PAL 的酶活力。

### 1.2.6 金属离子对过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶活力的影响的测定方法

在加酶液之前, 分别加入 1 mL 1、0.1、0.01 mmol/L 的  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ , 以未加金属离子的空白作对照, 其他条件同“酶活力测定”。

## 2 结果与分析

### 2.1 芦笋 POD 和 PAL 在不同 pH 值下的活力及其耐受性

由图 1 可知, 芦笋 POD 酶的最适 pH 值为 4.0, 当  $\text{pH} < 4$  或  $\text{pH} > 6$  时, POD 酶活力迅速下降最多达 90%, 同在 pH 6 的柠檬酸缓冲液和磷酸缓冲液中, 芦笋 POD 酶活力并不相同, 在柠檬酸缓冲液中酶活力显著低于在磷酸缓冲液中的酶活力( $P < 0.05$ ), 这

主要是因为柠檬酸缓冲液有整合金属离子的作用, 而某些金属离子对 POD 有激活作用。数据显示, 芦笋 POD 在不同 pH 值下的活力及其耐受性变化趋势相似, 处理 5 min 后, 酶活力残存都小于 50%, 在 pH 8 的磷酸缓冲液中残存仅为 16%, 在 pH 6 的柠檬酸缓冲液中残存最少, 仅为 13.7%。

由图 2 可知, Tris 缓冲液中芦笋 PAL 的最适 pH 值在 8.4 和 8.8 左右, 这是因为芦笋 PAL 存在同工酶; 芦笋 PAL 酶在 pH 6 的柠檬酸缓冲液中的活力最小, 这与柠檬酸整合金属离子的能力有关; 在不同 pH 值下处理 5 min 后, 芦笋 PAL 酶活力残存在 80% 左右, 说明芦笋 PAL 在 pH 7~9 的环境中酶活力相对稳定, 这与他人在银杏叶 PAL 上的研究有差别<sup>[7]</sup>。

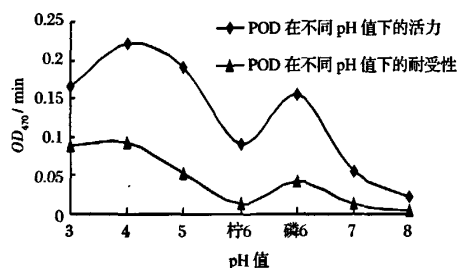


图 1 芦笋 POD 在不同 pH 值的活力及其耐受性

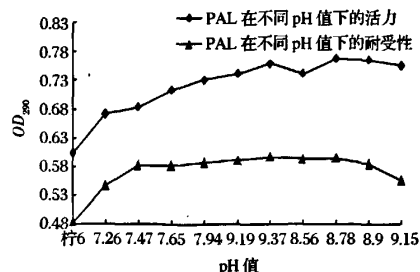


图 2 芦笋 PAL 在不同 pH 值下的活力及其耐受

### 2.2 芦笋 POD 和 PAL 在不同温度下的活力

结果表明, 温度对芦笋 POD 和 PAL 酶的活力有显著影响( $P < 0.05$ ), 在 30℃~65℃ 之间 2 者的酶活力较高, 适宜温度分别为 55℃、60℃; 当温度低于 30℃, 高于 65℃ 时两者的酶活力均迅速下降。

### 2.3 底物浓度对酶促反应速度的影响

由图 4 和图 5 可知, 在 POD 和 PAL 酶促反应中, 随着底物浓度的增大, 酶促反应速度也增大, 当 2 者的底物浓度分别为 70  $\mu$ L/100 mL 和 0.02 mol/L 时, 反应速度达到最大值 0.3382 和 0.7424; 当底物浓度增大到 84  $\mu$ L/mL 和 0.04 mol/L 时, 反应速度

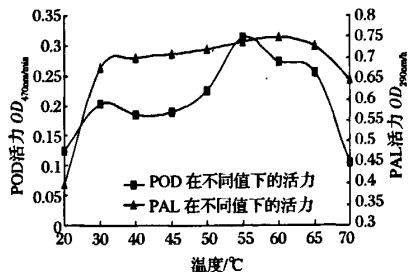


图3 芦笋 POD 和 PAL 在不同温度下的活力

减小;再增大到  $98 \mu\text{L}/\text{mL}$  和  $0.04 \text{ mol}/\text{L}$  时,反应速度又增加,之后保持缓慢上升趋势。以上实验结果说明,在 POD 和 PAL 酶促反应中质量定律和反馈抑制在相互作用,因为是对酶提取液进行处理,所以 2 酶促反应的底物愈创木酚和 L-苯丙氨酸不是诱导酶合成,即调控酶的生成量(数量)产物反馈作用的表现可推断是改变其酶的构象,这与前人的报道相似<sup>[7]</sup>。

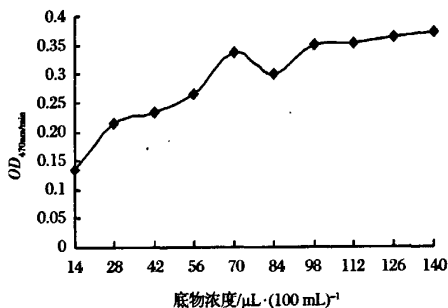


图4 底物浓度对 POD 酶促反应速度的影响

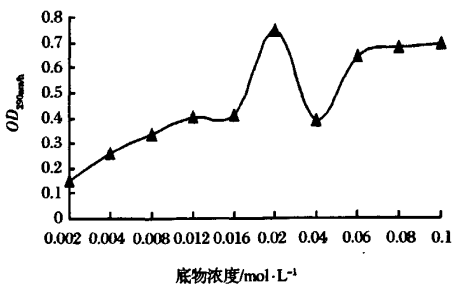


图5 底物浓度对 PAL 酶促反应速度的影响

## 2.4 酶液浓度对酶促反应速度的影响

实验结果(见图6)表明,反应速度随着酶液浓度的增加而增加,与酶液浓度呈正相关;当酶液浓度达到一定时( $1.6 \text{ mL}$ ),反应速度减缓;之后其增加速度趋于零,2者变化趋势相似。据文献报道,当酶浓度较高而底物浓度不足时将产生限制因子,反应速度与酶浓度之间不再保持线性关系,另一种解释是酶作用

的产物增加对酶产生抑制作用,从而导致反应速度增长量的下降<sup>[8]</sup>。

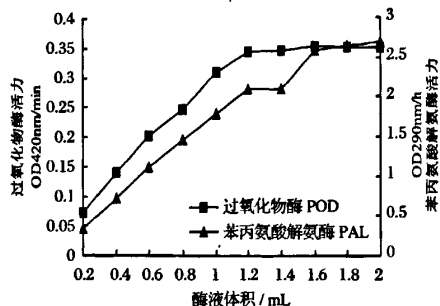


图6 酶液浓度与反应速度的关系

## 2.5 金属离子对过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶活力的影响(表1)

实验结果显示,  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  和  $\text{Ba}^{2+}$  显著 ( $P < 0.05$ ) 抑制芦笋 POD 酶的活力,  $1 \text{ mmol}/\text{L}$   $\text{Ca}^{2+}$  极显著 ( $P < 0.01$ ) 抑制芦笋 POD 酶的活力,而  $0.1$ 、 $0.01 \text{ mmol}/\text{L}$   $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对芦笋 POD 酶活力没有影响;  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  对芦笋 PAL 产生极显著的激活作用,  $1 \text{ mmol}/\text{L}$  的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $0.1 \text{ mmol}/\text{L}$   $\text{Mg}^{2+}$ 、 $0.01 \text{ mmol}/\text{L}$   $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  可以显著抑制芦笋 PAL 酶的活力,而  $1 \text{ mmol}/\text{L}$   $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $0.1 \text{ mmol}/\text{L}$   $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  对芦笋 PAL 酶活力无影响。

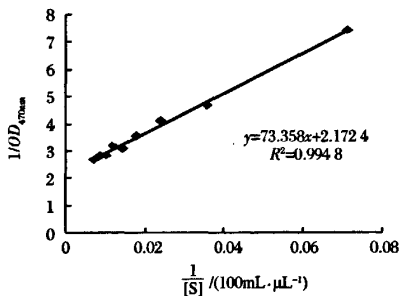


图7 POD 双倒数作图

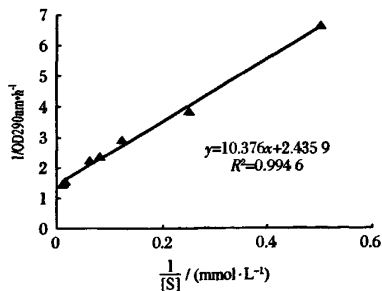


图8 PAL 双倒数作图

表1 金属离子对 POD 和 PAL 活力的影响

金属离子浓度 /mmol · L <sup>-1</sup>	过氧化物酶活力 (OD470nm/ min)	苯丙氨酸解氨酶活力 (OD290nm/h)	金属离子浓度 /mmol · L <sup>-1</sup>	过氧化物酶活力 (OD470nm/ min)	苯丙氨酸解氨酶活力 (OD290nm/h)
0	0.2210	0.766	0	0.2210	0.766
Na <sup>+</sup>			Ba <sup>2+</sup>		
1	0.1205	0.720	1	0.1377	0.836
0.1	0.1196	0.714	0.1	0.1318	0.838
0.01	0.1155	0.710	0.01	0.1178	0.817
K <sup>+</sup>			Ca <sup>2+</sup>		
1	0.1311	0.805	1	0.0798	0.720
0.1	0.1036	0.825	0.1	0.2353	0.714
0.01	0.1175	0.835	0.01	0.2453	0.710
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			Mg <sup>2+</sup>		
1	0.2565	0.728	1	0.2519	0.760
0.1	0.2599	0.730	0.1	0.2539	0.716
0.01	0.25	0.713	0.01	0.2489	0.711

## 2.6 动力学曲线与 Km

根据实验结果(图4和图5),用 Hanes 双倒数作图,结果见图7和图8。Km 即为直线在 X-轴截距的相反数,计算可得:芦笋 POD 对愈创木酚的 Km 是  $2.694 \times 10^{-4}$  mol/L, PAL 对 L-苯丙氨酸的 Km 是 0.138 1 mmol/L。从以上数据可以推论:芦笋 POD 与愈创木酚的亲合力极强,而芦笋 PAL 与 L-苯丙氨酸的亲合力较小,产生结果的原因与酶的结构、酶的纯度和同功酶等有关。

## 3 结论与讨论

实验研究发现,芦笋 POD 酶在 pH6 的柠檬酸缓冲液和大于 pH8 的碱性环境中活性最低,且在这 2 种环境中处理 5 min 后其残余酶活分别为 13.7% 和 16%;芦笋 PAL 酶在 pH6 的柠檬酸缓冲液和 pH 值大于 9 的碱性环境中活性显著降低,这为芦笋的贮藏保鲜提供了理论依据;在生产中可以使用柠檬酸适当改变体系的 pH 值,使其远离芦笋 POD 和 PAL 酶的最适 pH4 和 8.8。

芦笋 POD 和 PAL 酶在 30~60℃ 下有较高的活性,而在低温(<20℃)和高温(>60℃)下活性较低,因此生产中要对采后芦笋进行及时预冷并在低温下(0~1℃)贮藏,这样可以减轻芦笋嫩茎的老化进程,提高贮藏品质。

本实验还发现,1mmol/L Ca<sup>2+</sup> 显著( $P < 0.05$ )抑制芦笋 POD 和 PAL 酶的活力,但于新<sup>[11]</sup>等研究发现 Ca<sup>2+</sup> 对草菇 POD 的酶促反应作用微弱,抑制机理有待于进一步研究。

芦笋 PAL 是一种诱导酶,POD 是逆境条件下酶促防御系统的关键酶之一,各种类型的低温、机械损

伤、光(白光、蓝光、红光、紫外光)、病原菌感染、毒素处理、昆虫取食、矿物质营养、悬浮细胞的稀释和外源植物激素都可以诱导 PAL 和 POD 基因的表达,且这种诱导是转录水平上的诱导。植物体内有一种 PAL 的内源性抑制物质, PAL-inhibitor (PAL-I) 参与了 PAL 活性的调节,这已在印度小黄瓜<sup>[9]</sup>、向日葵<sup>[10]</sup>中得到证实。有研究报道<sup>[11]</sup>, PAL 的抑制剂有许多种类,包括肉桂酸、β-香豆酸、L-2-氨基-3-苯丙酸、2-氨基乙酸以及某些氨基酸如组氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、氟苯丙氨酸等,其中肉桂酸和 β-香豆酸是很有效的抑制剂,黄酮作为末端产物可抑制 PAL 酶,从而抑制植物木质素的合成与增加。

## 参 考 文 献

- 1 Chang D C N. Fine structural changes of asparagus spears during storage [J]. Acta Horticulture, 1983, 138:305~312
- 2 John M, David M, Malley O, et al. Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant Pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase [J]. Plant Biology, 1997, 94: 8255~8260
- 3 Khwaoka A, Kaothien P, Yoshida K, et al. Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis [J]. Plant Journal, 2000, 22(4): 289~301
- 4 王守正, 王海燕, 李洪连, 等. 瓜类作物诱导抗病机制的研究 [J]. 河南农业科学, 2001, 3:20~23
- 5 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003:154~155
- 6 孙广宇, 宗兆锋. 植物病理学实验技术 [M]. 北京: 中国农业出版, 2002:116~118
- 7 王燕, 刘卫红, 杜何为, 等. 银杏叶中苯丙氨酸解氨酶特性的研究 [J]. 湖北农业科学, 2004, (5):72~74

- 8 郑杰, 冯作山, 刘宗林, 等. 新疆阿魏菇多酚氧化酶特性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(3): 56~59
- 9 Billett E. Wallace W. Smith H. A specific and reversible macromolecular inhibitor of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic acid-4-hydroxylase in Gherkins [J] Biochem Biophys Acta, 1978, 524: 239
- 10 Greasy L. Phenylalanine ammonia lyase inactivating system in sunflower leaves [J]. Phytochemistry, 1976, 15: 673~675
- 10 于新, 黄小丹, 冯彤, 等. 草菇多酚氧化酶及过氧化物酶特性的研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1998, 11(3): 27~33

## Study on Peroxidase and *L*-Phenylalanine Ammonia-lyase Activity and Influence Factors in Green Asparagus

Li Yanhua, Wang Qingguo

(Department of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018 China)

**ABSTRACT** This paper made a through study by spectrophotometry for many characteristics of Peroxidase and *L*-Phenylalanine ammonia-lyase relating to the senescence of UC800 asparagus. The results showed that the optimum pH were 4.0 and 8.8, and the optimum temperature were 55°C and 60°C, respectively. When pH value was 6 of citric acid buffer, and the temperature was below 20°C or above 60°C, the enzymatic activities of POD and PAL decreased remarkably. And 1mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  could inhibited the enzymatic activities of POD and PAL of asparagus. The optimum substrate concentration and  $K_m$  value of POD and PAL were 70  $\mu\text{L}/100 \text{ mL}$ ,  $2.694 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  and 0.02mol/L, 0.138 1 mmol/L, respectively.

**Key words** asparagus, Peroxidase, *L*-Phenylalanine ammonia-lyase, characteristics

会 讯

### 梅特勒—托利多“食品及饮料行业客户研讨会”在广州成功举办

**METTLER TOLEDO**

为了更好地促进新的分析技术和方法在食品及饮料行业中的应用,2007年11月8日,梅特勒—托利多公司在广州华夏大酒店成功举办了“食品及饮料行业客户研讨会”。



国际知名公司的在华机构纷纷派出技术专家前来参加,会议上云集了百事(中国)、箭牌糖果、吉百利糖果、东莞雀巢、美赞臣(广州)等40多家企业的近百名业内人士,参会代表主要是来自质量管理、研发、生产及设备管理等部门的技术及高级管理人员。

会上,梅特勒—托利多公司的技术和行业应用专家们向与会者介绍了实验室中最新的分析技术,如具有“一键滴定”功能的超越系列滴定仪,数据可靠、操作简单,且能自动清洗的密度/折光率仪,模块化的热分析仪,技术不断创新的电子天平等,以及它们在该行业中的应用,并与大家分享了最新的市场概况及与行业相关的国内外法规。会议始终在和谐而浓厚的学术气氛中进行,参会代表们充分利用休息时间参观并亲手操作了梅特勒—托利多最新产品的样机,并与技术人员就感兴趣的话题进行了细致而融洽的交流。



会议受到各方嘉宾的一致好评,梅特勒—托利多公司也向所有参会者表示了感谢,并表示将继续关注该行业,努力用最前沿的分析仪器及应用技术促进该行业的成长。本次研讨会为广大客户提供了一个与梅特勒—托利多公司文化、产品以及人员接触和沟通的平台,这样的平台加深了彼此之间的了解,有利于更快、更好地建立相互信赖的长期合作关系。