

绿芦笋中可溶态和结合态过氧化物酶的鉴定

王 璋 陆 伯 勋

摘 要

用0.05M 磷酸钠缓冲液(pH7.0)和含有1.0M 氯化钠的同一缓冲液将绿芦笋中可溶态和以离子态结合的过氧化物酶分别萃取出来。通过下述的连续步骤将这两种形态的过氧化物酶纯化:硫酸铵分级沉淀, SephacrylS-200 柱色谱和 ConA-Sepharose 4B 柱色谱。两种不同形式的过氧化物酶的纯化倍数分别为237和53倍。用等电聚焦法从可溶态过氧化物酶中检出11种具有不同等电点的同功酶;从结合态过氧化物酶中则检出8种同功酶。采用三类氢给予体和不同的缓冲液,测得两种不同形态的酶具有类似的最适pH范围4.2—5.0。两种不同形态的酶在pH4.5时的最适温度在50℃左右。两者在70℃和90℃时的热失活曲线呈双相形态。

一、引 言

过氧化物酶广泛地分布在高等植物中。Maehly (1955)^[1], Paul (1963)^[2], Saunderson 等 (1964)^[3], Whitaker (1972)^[4], Scott (1975)^[5], Burnette (1977)^[6] 和 Lilly Vamos-Vigyazo (1981)^[7] 曾评论这个课题。Joslyn 和 Bedford (1940)^[8] 和 Joslyn^[9] 曾报导热烫条件对芦笋风味残留和酶活力的影响。Winter (1969)^[10] 曾报导热烫时过氧化物酶性质的变化。他指出:芦笋中过氧化物酶破坏的速度主要取决于颗粒的大小和热转移的速度。Haard 等 (1974)^[11] 曾报导新鲜收割的芦笋的底部、茎部和尖部中过氧化物酶的活力是不同的。他们还报导在芦笋的三个不同部位中,过氧化物酶的同功酶的分布是不同的和外源乙烯对同功过氧化物酶的影响。Haard 和 Tobin (1971)^[12], Haard (1973)^[13], Haard 和 Marshall (1976)^[14], Gkinis 和 Fennema (1978)^[15], Lee (1973)^[16] 和 Kahn 等 (1981)^[17] 曾证明在植物组织中过氧化物酶以可溶态、离子结合态和共价结合态存在。迄今为止,关于芦笋中纯化的过氧化物酶的性质还未见报导。

本文叙述从芦笋中分离和纯化可溶态和离子结合态过氧化物酶的步骤,并介绍这两种形态的过氧化物酶的一些性质。

*陆伯勋:美国加利福尼亚大学食品科学及工艺系教授。

本文收到日期 1983 年 11 月 8 日

二、材料和方法

绿芦笋

加利福尼亚大学戴维斯校农场提供了新鲜收割的绿芦笋, 芦笋的品种为 UC157。将收割下来的芦笋从顶部起切下 15cm 长的嫩尖, 嫩尖底部的直径为 1—2cm。芦笋嫩尖经洗净, 淋干后在鼓风冷冻器(-50°C)中冻结。将冻结的芦笋密封在尼龙袋中并贮藏在 -25°C 的冷库中。

过氧化物酶的萃取

从绿芦笋嫩尖萃取粗制的过氧化物酶的步骤参照了 Gkinis 和 Fennema (1978)^[15] 的方法, 但有些变动, 具体步骤如下:

除了另有注明外, 所有的萃取和纯化步骤是在 4°C 下进行。将冻结的芦笋解冻后切成小块。将 1000 g 芦笋小块和 1000ml 0.05M 磷酸钠缓冲液(pH7.0) 及 50 g PVP (聚乙烯聚吡咯烷酮)在 Waring 捣碎器中搅切 2 分钟, 然后转移到 Virtis 均质器中均化 1 分钟。将均浆压挤通过 6 层纱布, 残渣被保留下来作进一步萃取之用。滤液在 $18,000 \times g$ 离心力下离心分离 30 分钟, 将所得之上层清液定义为可溶态过氧化物酶。用去离子水反复洗涤从压挤均浆所得之残渣直到在洗涤下来的溶液中不含过氧化物酶的活力为止。将经过洗涤的残渣分散在 1500ml 含有 1M 氯化钠的 0.05M 磷酸钠缓冲液(pH7.0), 搅拌过夜, 然后压挤通过 6 层纱布。滤液在 $18000 \times g$ 离心力下离心 30 分钟, 将所得之上层清液定义为离子结合态过氧化物酶。

纯化

在 0°C 下, 用硫酸铵分别处理可溶态和离子结合态过氧化物酶萃取液达到 90% 饱和度, 然后在 $18000 \times g$ 离心力下离心 30 分钟。将所得之沉淀分别溶解于用来萃取可溶态和离子结合态酶的缓冲液。将所得之溶液对着 0.05M 醋酸钠(pH3.8)缓冲液透析 16 小时, 在透析进行最初的 8 小时后更换缓冲液一次。透析物在 $18000 \times g$ 的离心力下离心 30 分钟, 弃去沉淀。用 Amicon 超滤器及 ym-10 膜对上层清液进行超滤浓缩。经浓缩的酶液再对着含有 0.8M NaCl 的 0.05M 磷酸钠缓冲液(pH6.0)透析。

经透析的酶液施放到 SephacrylS-200(Pharmacia Fine Chemicals) 柱 ($2.6 \times 100\text{cm}$) 中, 此柱事先已用含有 0.8M NaCl 的磷酸钠缓冲液(pH6.0)平衡。然后用相同的缓冲液洗脱, 流速 30ml/时。用 Perkin Elmer 575 分光光度计在 280nm 波长测定每一分部 (6.5ml) 的蛋白质消光和过氧化物酶活力(具体步骤见下述)。将可溶态过氧化物酶溶液分为两部分后依次上柱。将含有过氧化物酶活力的分部合并, 经超滤浓缩后再对着含有 0.2M NaCl 的 0.05M Tris-HCl (pH7.4) 缓冲液透析。将所得之透析液施放到 ConA-Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemical) 柱 ($1.6 \times 40\text{cm}$), 在进样前, 此柱已用含 0.2M NaCl 的 0.05M Tris-HCl 缓冲液(pH7.4)平衡。用相当于 1.5 倍柱体积的同一缓冲液洗柱, 然后用含有 1.0M NaCl 和 0.3M α -甲基-D-甘露糖甙的 0.05M Tris-HCl 缓冲液(pH7.4)洗脱。每一分部的体积为 4ml, 流速为 10ml/小时。测定每一分部中蛋白质含量和过氧化物酶活力。将含有过氧化物酶活力

的分部合并后对着蒸馏水透析。透析液经冷冻干燥后贮藏在冷冻器中作进一步研究之用。

过氧化物酶的测定

用分光光度法在 470nm 波长测定过氧化物酶的活力。具体步骤参照 Kahn 等 (1981)^[17] 的方法后加以修改, 简述如下: 检验混合物含有 0.225ml 0.3% H_2O_2 , 0.225ml 1% 愈创木酚水溶液和 2.5ml 0.2M 醋酸钠缓冲液 (pH4.5)。在检验混合物达到 30℃ 时加入 0.01—0.02ml 酶液使反应开始。初步试验表明此反应体系的最适 pH 在 4.5 左右。使用 Perkin Elmer 575 分光光度计测定消光随时间变化, 此分光光度计装备有恒温小室和自动记录仪。从曲线的直线部分的斜率计算酶的活力。将每分钟光密度增加 1 定义为一个酶单位。

蛋白质含量

用 Bio—Rad 蛋白质检验法 (Bio—Rad 实验室 1979)^[18] 测定蛋白质含量, 用牛血浆 γ 球蛋白作为蛋白质标准。

最适 pH

采用三类氢给予体和不同的缓冲液测定过氧化物酶的最适 pH。具体步骤如下:

1. 采用愈创木酚作为氢给予体和 0.2M 醋酸钠缓冲液 (pH3.6—5.6) 及 McIlvaine 柠檬酸盐—磷酸盐缓冲液 (pH3.0—6.6);

2. 采用邻—苯二胺作为氢给予体, 参照 Vetter 等^[19] (1958) 的方法后加以修改。具体步骤简述如下: 反应混合物含有 0.2ml 0.3% H_2O_2 , 0.1ml 1% 邻—苯二胺的乙醇 (95%) 溶液和 2.6ml 柠檬酸盐—磷酸盐缓冲液 (pH3.0—6.6)。此混合物在 30℃ 平衡后加入 0.01ml 酶液。在 430nm 波长下记录消光随时间变化。按前述相同方法计算过氧化物酶活力。

3. 第三种方法是根据 Worthington Enzyme Manual (1972)^[20] 而改变的, 此法的氢给予体是邻—联甲氧基苯胺。检验混合物含有 0.03ml 0.3% H_2O_2 , 0.025ml 1% 邻—联甲氧基苯胺甲醇溶液, 2.9ml 柠檬酸盐—磷酸盐缓冲液 (pH3.0—6.6) 和 0.01ml 酶溶液。在 30℃ 和 460nm 波长下记录消光随时间的变化。

最适温度

测定芦笋过氧化物酶的活力随温度而变化, 然后确定酶的最适温度。测定的温度范围是 30℃—60℃, 测定的温度间隔是 5 度。反应混合物的组成和在“过氧化物酶的测定”一节中所描述的相同。

热处理

参照 Wang Dimarco (1972)^[21] 的方法后加以改变。具体步骤如下: 将长度为 15cm, 外径为 3mm 和厚为 0.6mm 的 Pyrex 玻璃管密封一端。用毛细管将溶解于 0.05M 醋酸钠缓冲液 (pH5.0) 中的过氧化物酶引入上述的玻璃管。先将盛有酶液的玻璃管在恒温水浴中予热到 45℃, 然后转移到另一个水浴, 温度为 70℃ 或 90℃。在确定的加热时间达到后, 立即将玻璃管在冰浴中快速冷却。用邻—苯二胺作为氢给予体按照前述步骤测定酶的活力。

聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦

芦笋过氧化物酶等电聚焦是参照“聚丙烯酰胺凝胶电泳实验室技术”(Pharmacia Fine Chemicals, 1980)^[22]所述的步骤而加以改变的。凝胶的长度和直径分别是10cm和0.5cm。单体的总浓度是7.5%，亚甲基双丙烯酰胺的浓度占总单体浓度的3%。两性电解质试剂(pH 3—10)(Farmacia Fine Chemicals)在凝胶中的浓度为1:15(V/V)。加入10%甘油以改进凝胶的一致性(Righetti和Druysdale, 1973)^[23]。电泳仪的上下两室分别盛有阴极电解液(0.01M 乙二胺)和阳极电解液(0.01M 亚氨基二醋酸)。将酶的样品溶解于含有15%蔗糖的1:15两性电解质溶液后施加到已经预先聚焦的凝胶中去。在酶染色的凝胶中施加样品的量相当于一个酶单位，而在蛋白质染色的凝胶中样品的量为150微克。在不变的电压(500V)和4℃下聚焦9.5小时。酶染色的步骤基本上参照Lee(1973)^[16]的方法，除了染色的时间仅用10分钟。染色溶液由0.03% H₂O₂，0.05% 邻—联甲氧基苯胺和0.2M 醋酸钠缓冲液(pH 4.5)组成。蛋白质染色采用资料^[22]所述的步骤。将没有施加样品的空白凝胶切成20片相同厚度的切片。用0.8ml 0.01M 氯化钾溶液萃取每一切片6小时。用微型复合电极测定每一萃取液的pH，从而确定沿着凝胶长度的pH梯度。

SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳测定芦笋过氧化物酶的分子量。除了分离凝胶和浓缩凝胶中的总单体浓度分别为12%和4%外，其他步骤按照Laemmli(1973)^[24]方法。采用Bio-Rad实验室的SDS凝胶电泳标准，它包括溶菌酶，大豆胰蛋白酶抑制剂，碳酸酐酶，卵白蛋白，牛血清白蛋白和磷酸化酶B，其分子量分别为14,300，21,000，30,000，43,000，68,000和94,000道尔顿。从比较芦笋过氧化物酶样品和蛋白质标准在凝胶中产生的蛋白质带的移动距离计算芦笋过氧化物酶的分子量范围。

三、结果和讨论

芦笋过氧化物酶的纯化

芦笋过氧化物酶纯化的结果总如表一、表二。可溶态和离子结合态过氧化物酶在0.05M 醋酸钠缓冲液(pH3.8)中是稳定的。在硫酸铵分步沉淀后，酶液对着0.05M 醋酸钠缓冲液(pH3.8)透析，96%以上的可溶态酶活力和92%的离子结合态酶活力保留在溶液中，而90%和74%的蛋白质沉淀下来。经过透析，可溶态和离子结合态过氧化物酶的比活力显着增加。采用SephacrylS-200柱(2.6×100cm)通过凝胶过滤色谱纯化过氧化物酶。图1和图2表明了可溶态和离子结合态过氧化物酶从SephacrylS-200柱上洗脱的过程。从图中可看到两种形态的酶都以单一峰的形式被洗脱下来，而且具有类似的洗脱体积，它们分别为292.5ml和299ml。已经证明多种植物过氧化物酶是糖蛋白。Maehly(1955)^[1]曾报告碳水化合物在辣根过氧化物酶中的含量是18.4%。Darbyshire(1973)^[25]也曾研究碗豆根中过氧化物酶的本质。刀豆球蛋白(ConA)是从刀豆粗粉中分离出来的一种外源聚集素，它能结合含有α-D-吡喃甘露糖基，α-D-吡喃葡萄糖基和空间结构类似的残基的碳水化合物(Goldstein1965)^[26]。Brattain等(1976)^[27]使用ConA Sepharose柱(2.5×25cm)研究了各种不同纯度的辣根过氧化物酶，其RZ值(A403/A275)分别从0.62，1.20和2.45增加到2.78，2.95，3.08。从图3和图4可以看到大部分可溶态和离子结合态的过氧化物酶被吸附在ConA-Sepharose

表一 芦笋中可溶态过氧化物酶的纯化

步 骤	容 积 (ml)	活 力 (单位/ml)	总单位	蛋白质含量 (mg/ml)	总蛋白质 (mg)	比活力 (单位/mg)
粗制萃取液	1390	1.80	2502	5.93	8242	0.304
硫酸铵分步沉淀	320	5.75	1840	13.3	4256	0.432
转移到0.05M醋酸 钠缓冲液(pH3.8)	433	4.10	1775	1.01	437	4.06
SephacrylS-200柱	145	9.50	1378	0.837	121	11.4
Con A Sepharose柱	8	106	848	1.46	11.7	72.5

表二 芦笋中离子结合态过氧化物酶的纯化

步 骤	容 积 (ml)	活 力 (单位/ml)	总单位	蛋白质含量 (mg/ml)	总蛋白质 (/mg)	比活力 (单位/mg)
粗制萃取液	1500	3.1	4650	0.740	1110	4.19
硫酸铵分步沉淀	132	32	4224	6.67	880	4.80
转移到0.05M醋酸钠 缓冲液(pH3.8)	186	21	3906	1.24	231	17.1
SephacrylS-200柱	68	46.4	3155	0.741	50.4	62.6
Con A Sepharose柱	8	198	1584	0.865	6.92	229

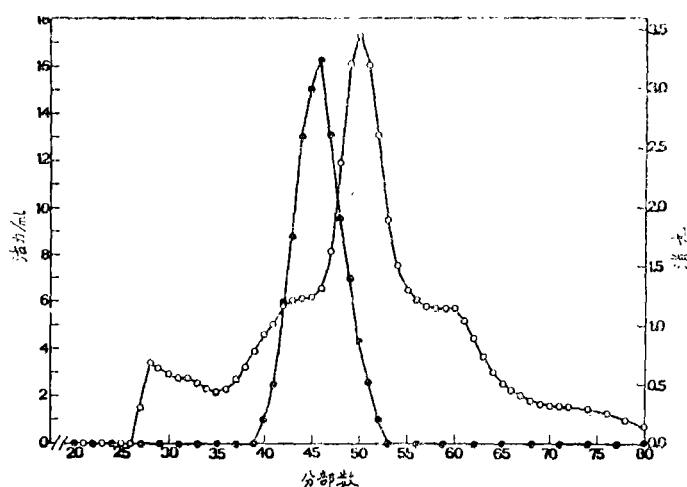


图1 可溶态芦笋过氧化物酶的 Sephadex 200 色谱

样品被分成两部分后分两次进样。用含有 0.8M 氯化钠的 0.05M 磷酸钠缓冲液(pH6.0)平衡和洗脱柱(2.6×100cm)。每一分部的体积是 6.5ml。在 280nm 波长下测定消光(○)和按文中所述的步骤测定酶的活力(●)。

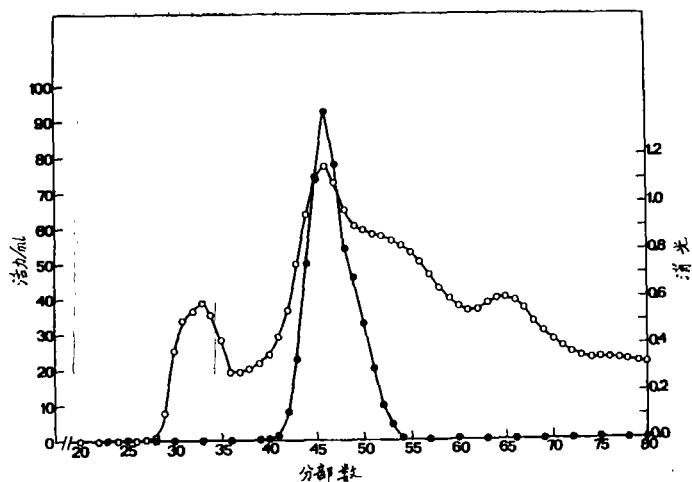


图2 离子结合态芦笋过氧化物酶的SephacrylS-200色谱

除了样品一次进样，其他条件和在图1中所描述的相同。

4B柱上，而大部分未吸附的蛋白质被起始缓冲液从柱上洗出。芦笋可溶态和离子结合态过氧化物酶经纯化后其比活力分别提高273倍和53倍。离子结合态过氧化物酶的比活力是可溶态的3倍，其原因是大部分可萃取的蛋白质存在于可溶态过氧化物酶的粗制萃取物中。可溶态和离子结合态过氧化物酶的RZ值分别为0.25和0.59。Shannon等(1966)^[28]曾报导辣根过氧化物酶同工酶的RZ值从2.5至4.19。虽然不同来源的过氧化物酶的RZ值是不同的(Whitaker1972)^[4]，但从本研所得到的芦笋过氧化物酶的RZ值指示了两种形态的酶仅是部分纯化的。

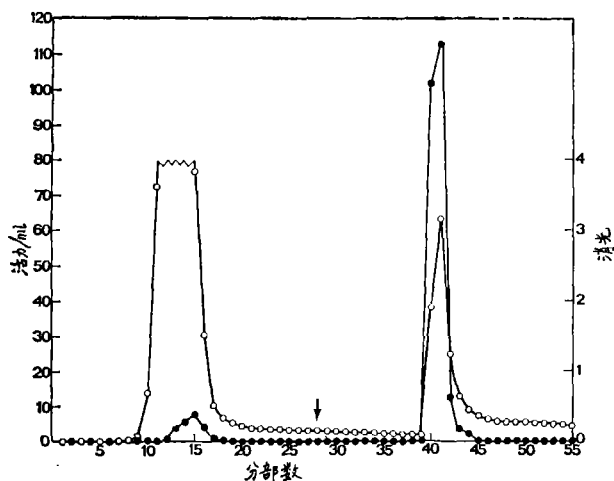


图3 可溶态芦笋过氧化物酶的ConA-Sepharose4B色谱。

用含有0.2M氯化钠的0.05M Tris-HCl缓冲液(pH7.4)平衡柱(1.5×40cm)。在被箭头指出的位置开始用含有0.3M α-甲基-D-甘露糖甙和1.0M氯化钠的相同缓冲液洗脱柱。每一分部的体积是4ml。在280nm波长下测定消光(○)和按文中所述步骤测定酶的活力(●)

最适 pH

当采用不同的氢给予体和缓冲液时,可溶态和离子结合态过氧化物酶的最适 pH 从 4.2 至 5.0(图5)。它们的最适 pH 随不同的氢给予体而增加的次序是愈创木酚, 邻-联甲氧基苯胺和邻-苯二胺。在同 Vamos-Vigazo (1981)^[1]搜集的数据比较后,可以看出芦笋过氧化物酶的最适 pH 类似于青刀豆(5.0), 马铃薯(5.0—5.4)和菠萝(4.2)。

最适温度

在 30℃—50℃ 的温度范围

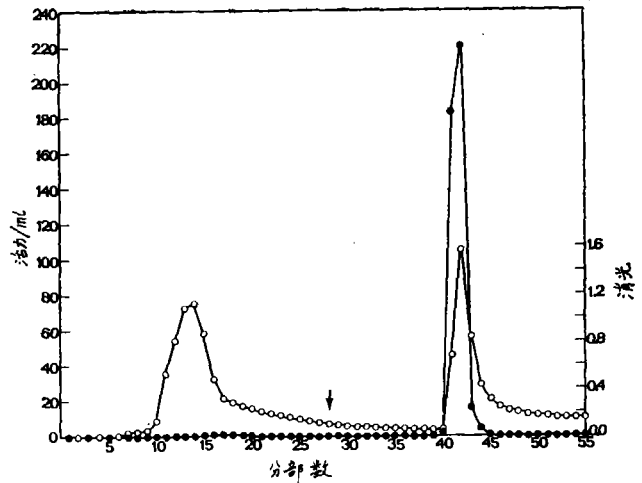


图4 离子态芦笋过氧化物酶的 ConA-Sepharose4B 色谱

条件与图 3 中所描述的相同。

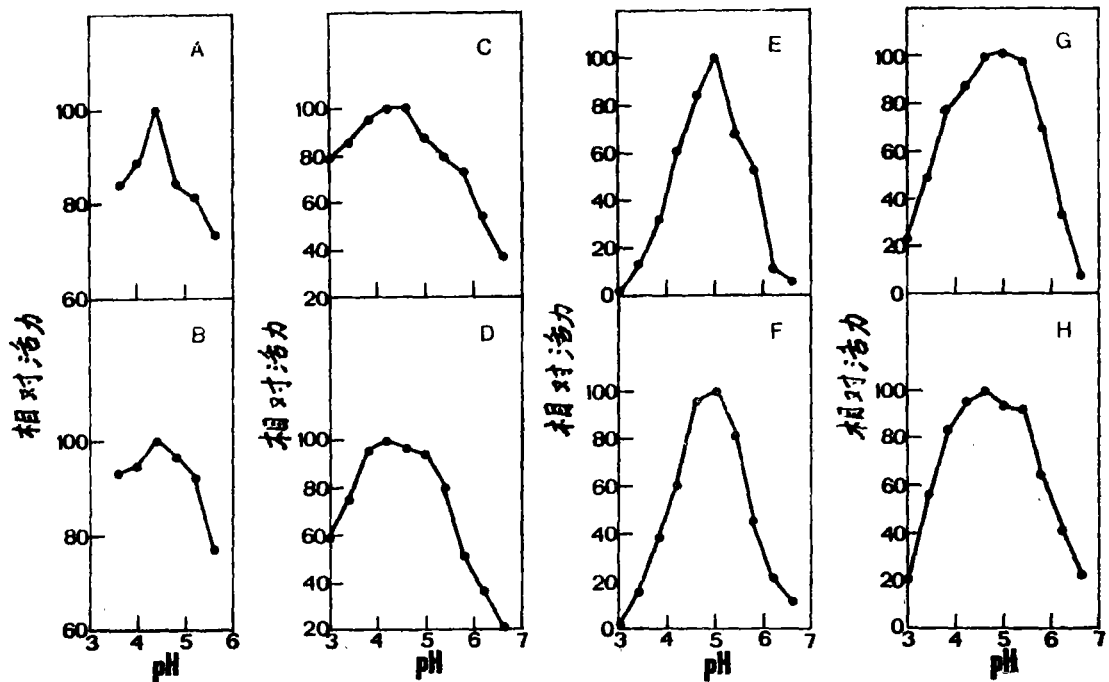


图5 pH 对可溶态和离子结合态芦笋过氧化物酶的活力的影响。

- A. 可溶态过氧化物酶, 缓冲液: 醋酸钠, 氢给予体: 愈创木酚;
- B. 离子结合态过氧化物酶, 缓冲液: 醋酸钠, 氢给予体: 愈创木酚;
- C. 可溶态过氧化物酶, 缓冲液: 柠檬酸钠-磷酸钠, 氢给予体: 愈创木酚;
- D. 离子结合态过氧化物酶, 缓冲液: 柠檬酸钠-磷酸钠, 氢给予体: 愈创木酚;
- E. 可溶态过氧化物酶, 缓冲液: 柠檬酸钠-磷酸钠, 氢给予体: 邻-苯二胺;

- F. 离子结合态过氧化物酶, 缓冲液: 柠檬酸钠-磷酸钠, 氢给予体: 邻-苯二胺;
 G. 可溶态过氧化物酶, 缓冲液: 柠檬酸钠-磷酸钠, 氢给予体: 邻-联甲氧基苯胺。
 H. 离子结合态过氧化物酶, 缓冲液: 柠檬酸钠-磷酸钠, 氢给予体: 邻-联甲氧基苯胺。

内两种形态过氧化物酶的活力随温度升高而增加(图6)。当温度超过 50℃ 时, 过氧化物酶变得不稳定, 测定酶活力的消光对时间图不再呈现直线关系, 因此在温度高于 50℃ 的条件下很难从酶反应的初速度正确地测定酶的活力。Joslyn 和 Redford(1940)^[8] 曾报导芦笋过氧化物酶活力在 20℃—60℃ 温度范围内未曾因热烫而有可觉察到的变化, 但是在 55℃ 加热时它稍受影响。本研究中的过氧化物酶比起芦笋中的粗制酶具有较低的热稳定性。

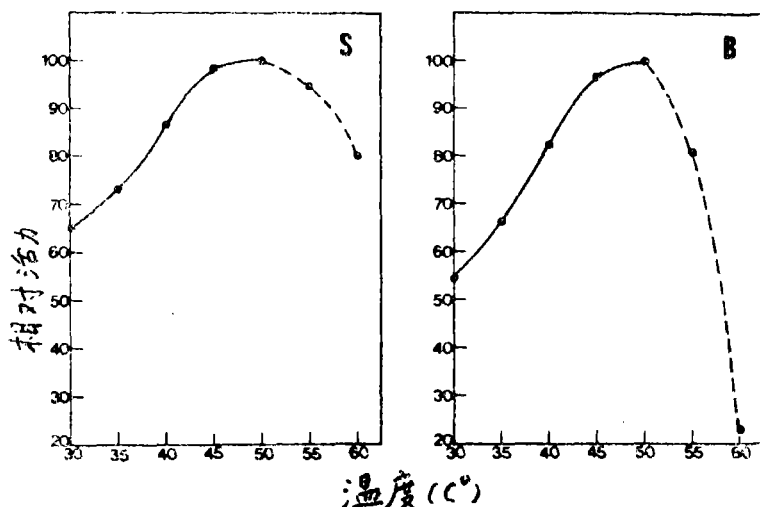


图6 温度对可溶态(S)和离子结合态(B)芦笋过氧化物酶活力的影响。

虚线指示在高温时过氧化物酶变得不稳定。

热稳定性

在 70℃ 和 90℃ (pH5.0) 条件下热处理, 使可溶态和离子结合态过氧化物酶失活的结果可见图 7。从百分残余活力(对数座标)对热处理时间作图所得的曲线表明: 两种形态的过氧化物酶在两个不同的温度下的热失活曲线都呈双相形态。按照 Yamamoto 等 (1962)^[29] 的观点, 曲线的第一部分代表过氧化物酶的易失活部分, 而曲线的第二部分代表酶的耐热部分。参照他们的方法, 将代表酶耐热部分的曲线外延至零时间后, 可以计算出在 70℃ 时可溶态和离子结合态的过氧化物酶的耐热部分分别占酶的总活力的 12% 和 31%; 在 90℃ 时则仅为 3% 和 4%。从图 7 可以看到: 在 70℃ 时热处理 30 秒约 65% 的离子结合态酶失活, 而可溶态酶仅 32% 失活。这个结果指示了离子结合态过氧化物酶的易失活部分较可溶态酶的易失活部分更不稳定。从图 6 也能看到这个类似的差别: 当温度超过 55℃ (pH4.5) 时, 离子结合态过氧化物酶的活力比可溶态酶的活力下降得更快。根据 Winter (1969)^[10] 的报导, 在热烫时, 芦笋中过氧化物酶活力的破坏遵循一级动力学。他并没有提到在芦笋过氧化物酶中存在耐热部分。这一分歧或许是因为本研究工作中所采用的热处理样品的方式不同于 Winter 的方法的缘故。

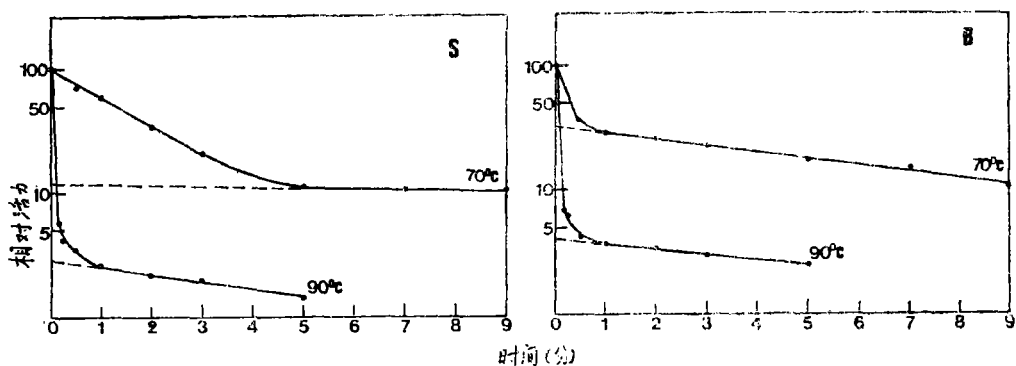


图7 可溶态(S)和离子结合态(B)芦笋过氧化物酶在70℃和90℃时的热稳定性。

聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦

可溶态和离子结合态过氧化物酶聚焦在含有两性电解质(pH3—10)的聚丙烯酰胺凝胶中。图8显示了凝胶经酶和蛋白质显色后的结果,在凝胶的下面指出了沿凝胶长度方向的pH梯度。从整个凝胶至少可以检出11种可溶态过氧化物酶的同功酶和8种离子结合态过氧化物酶的同功酶。虽然从两种不同形态的过氧化物酶中可以看出一些同功酶的pI值是类似的,但是通过比较两个凝胶上主要同功酶带后仍然可以看出两种不同形态的过氧化物酶具有不同的同功酶模式。从pH 3.82到4.90可溶态过氧化物酶具有4条较强的同功酶带,而离子结合态过氧化物酶仅有一条同功酶带(pI 4.5)是较强的。在凝胶的另一端,可溶态过氧化物酶具有一条强的(pI 7.83)和一条弱的(pI 7.87)同功酶带,而离子结合态过氧化物酶在pH 7.85—8.55具有一条宽而强的同功酶带。一些pI值超过8.55的同功酶可能没有进入凝胶。在两个凝胶的中部,由于同功酶较弱,因此有几个同功酶很难从图上确证。众所周知,植物过氧化物酶由许多同功酶组成。Delincee和Radola(1970)^[30]曾报导,采用两性电解质的pH范围为3—10的薄层等电聚焦可以从一个较纯的辣根过氧化物酶样品中鉴定出8种同功酶,而从一个较不纯的样品中可检出20种同功酶。在比较蛋白质染色凝胶和

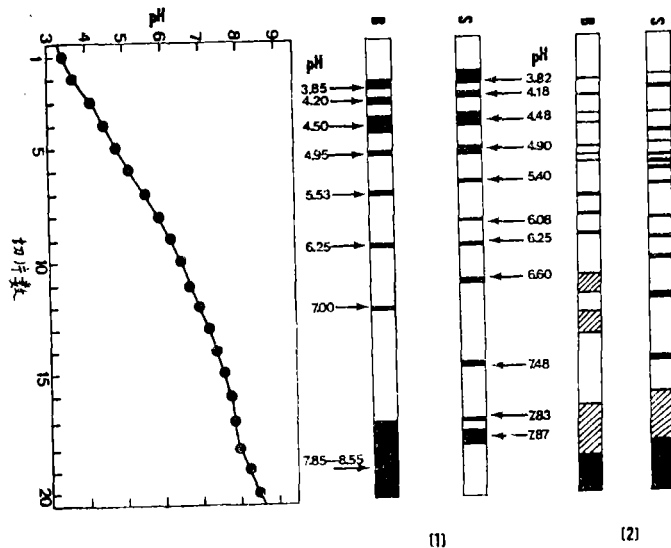


图8 可溶态和离子结合态芦笋过氧化物酶的等电聚焦

聚丙烯酰胺凝胶单体总浓度为7.5%,两性电解质(pH3—10)的浓度为1:15(v/v)。施加到每一凝胶中去的酶量如下:酶染色凝胶(1)—1个酶单位;蛋白质染色凝胶(2)—150μg。S代表可溶态过氧化物酶;B代表离子结合态过氧化物酶。在稳定电压(500v)下聚焦9.5小时。

没有进入凝胶。在两个凝胶的中部,由于同功酶较弱,因此有几个同功酶很难从图上确证。众所周知,植物过氧化物酶由许多同功酶组成。Delincee和Radola(1970)^[30]曾报导,采用两性电解质的pH范围为3—10的薄层等电聚焦可以从一个较纯的辣根过氧化物酶样品中鉴定出8种同功酶,而从一个较不纯的样品中可检出20种同功酶。在比较蛋白质染色凝胶和

酶染色凝胶后，可以看到对两种不同形态的酶来说，蛋白质带的数量都是多于同功酶带的数量，因此本研究所使用的酶样品仅是部分纯化的。等电聚焦实验曾重复进行多次，从实验中所得到的芦笋过氧化物酶同功酶的模式具有良好的重现性。

分子量

图 9 显示了 Laemmli 非连续缓冲液体系 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。三个凝胶分别代表分子量标准(A)，可溶态过氧化物酶(S)和离子结合态过氧化物酶(B)。部分纯化酶的大部分蛋白质带位于大豆胰蛋白酶抑制剂(分子量 21,000 道尔顿)和牛血清白蛋白(分子量 68,000 道尔顿)之间。可溶态过氧化物酶样品在凝胶上的主要蛋白质带的分子量范围是 33,000—48,000 道尔顿。而离子结合态过氧化物酶样品的主要蛋白质带分子量范围是 34,000—47,000 道尔顿。根据 Vamos—Vigyazo(1981)^[1]提供的数据，不同的水果和蔬菜中的过氧化物酶的分子量是在 30,000 和 54,000 道尔顿之间。本研究所得到的结果是接近于这个数值的。

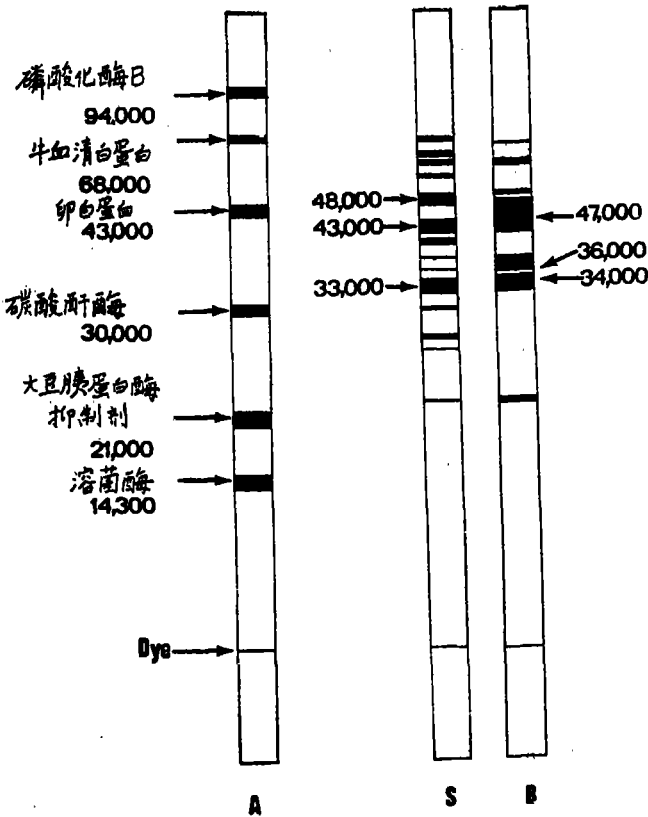


图 9 可溶态和离子结合态芦笋过氧化物酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

凝胶A：分子量标准；凝胶S：可溶态过氧化物酶；凝胶B：离子结合态过氧化物酶。数字指出了蛋白质带的估计分子量。

四、结 论

绿芦笋中可溶态和离子结合态过氧化物酶由许多同功酶组成。这两种不同形态的过氧化物酶具有不同的同功酶模式,但是这个差别不是非常显著的。它们的其他性质也略有不同。

主 要 参 考 文 献

- [1] Maehly, A. C. 1955. Plant peroxidase. In: Methods in Enzymology. Vol. 2, Ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. Academic press, New York and London.
- [2] Paul, K. G. 1963. Peroxidase In "The Enzymes" Vol. 8, Ed by Boyer, P. D., Lardy, H., and Myrback, K. Academic Press, New York and London.
- [3] Saunders, B. C., Holmes-Seidle, A. C. and Stark, B. P. 1964. "Peroxidase" Butterworth, Washington, D. C.
- [4] Whitaker, J. R. 1972. Catalase and Peroxidase. In: "Principles of Enzymology for the Food Science" Marcel Dekker, Inc., New York.
- [5] Scott, D. 1975. Oxidoreductases, In: "Enzymes in Food Processing", 2nd ed. Reed, G., Ed., Academic press, New York, Chap. 9.
- [6] Burnette, F. S. 1977. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a Review. J. Food Sci. 40:1.
- [7] Vamos-Vigyazo, Lilly 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and Vegetables. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, September 49.
- [8] Joslyn, M. A. and Bedford, C. L. 1940. Enzyme activity in frozen vegetables. Asparagus Ind. Eng. Chem. 32:702.
- [9] Joslyn, M. A. 1949. Enzyme activity in frozen vegetable tissue. Adv. Enzymol. 9:613.
- [10] Winter, E. 1969. Behaviour of peroxidase during blanching of vegetables. Z. Lebensin Unters. Forsch 141:201.
- [11] Haard, N. F., Sharma, S. C., Wolfe, R., and Frenkel, C. 1974. Ethylene induced isoperoxidase changes during fiber formation in postharvest asparaqus. J. Food Sci 39:452.
- [12] Haard, N. F. and Tobin, C. L. 1971. Patterns of soluble peroxidase in ripening banana fruit. J. Food Sci 36:854.
- [13] Haard, N. F. 1973. Upsurge of particulate peroxidase in ripening banana fruit Phytochemistry 12:555.
- [14] Haard, N. F. Marshall, M. 1976. Isoperoxidase changes in soluble and particulate fractions of sweet potato root resulting from cut injury, ethylene and black rot infection. Physiol. Plant Pathol. 8:195.

- [15] Gkinis, A. M. and Fennema, O. R. 1978. Changes in soluble and bound peroxidases during low-temperature storage of green beans. *J. Food Sci* 43:527.
- [16] Lee, T. T. 1973. On extraction and quantitation of plant peroxidase isoenzymes. *Physiol. Plant* 29:198.
- [17] Kahn, V., Goldshmidt, S., Amir, J., and Granit, R. 1981. Some biochemical properties of Soluble and bound potato tuber peroxidase. *J. Food Sci.* 46:756.
- [18] Bio Rad Protein Assay, BioRad Laboratories, January 1979.
- [19] Vetter, J. L., Steinberg, M. P. and Nelson, A. I. 1958. Quantitative determination of peroxidase in sweet corn. *J. Agric. Food Chem.* 6:39.
- [20] Worthington Biochem Corp. 1972. Worthington Enzyme Manual p. 43. Worthington Biochem Corp., Freehold, N.J. 07728 USA.
- [21] Wang, S. S. and Dimarco, G. R. 1972. Isolation and characterization of the native, thermally inactivated and regenerated horseradish peroxidase isozymes. *J. Food Sci.*, 37:574.
- [22] Anon 1980. Polyacrylamide Gel Electrophoresis-Laboratory Techniques, Pharmacia Fine Chemical ABS 75104 Uppsala, Sweden.
- [23] Righetti, P. G. and Drysdale, J. W. 1973. Small scale fraction of proteins and nucleic acids by isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 209, 163.
- [24] Laemmli, U. K., Favre, M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T₄. *J. Mol. Biol.* 80:575
- [25] Darbyshire, B. 1973. The Glycoprotein nature of indoleacetic acid oxidase/peroxidase fractions and their development in pea roots. *Physiol. Plant.* 29:293.
- [26] Godstein, I. J., Hollerman, C. E., and Smith, E. E. 1965. Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of Concanavalin with polysaccharides. *Biochemistry* 4:876.
- [27] Brattain, M. G. Marks, M. E., and pretlow, T. G. 1976. The purification of horseradish peroxidase by affinity chromatography on Sepharose-Bound Concanavalin. *Anal. Biochem.*, 72:346.
- [28] Shannon, L. M., Kay, E., and Lew, J. Y. 1966. Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.* 241:2166.
- [29] Yamamoto, H. Y., Steinberg, M. P. and Nelson, A. I. 1962. Kinetic studies on the heat inactivation of peroxidase in sweet corn. *J. Food Sci.* 27:113.
- [30] Delincee, H. and Radola, B. J. 1970. Thin-layer isoelectric focusing on sephadex layers of horseradish peroxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, 200:404.

Characterization of Soluble and Bound Peroxidases in Green Asparagus

Wang Zhang Luh Bor-shun

Abstract

Soluble and ionically bound peroxidases were extracted from green asparagus with 0.05M sodium phosphate (pH 7.0) and the same buffer containing 1.0 M NaCl, respectively. The two forms of peroxidase have been purified 237 and 53 folds, respectively, through ammonium sulphate fractionation, and successive chromatography on Sephacryl S-200 and ConA-Sepharose 4B columns. Eleven isoenzymes with different pI values were detected from the soluble form using isoelectric focusing and eight from the ionically bound form. The two forms of peroxidase showed a similar optimum pH range of 4.2—5.0 using three kinds of hydrogen donor with different buffers. The optimum temperature of the two peroxidase forms at pH 4.5 was around 50°C. Heat inactivation of both forms at 70° and 90°C was observed to be biphasic.