

人参生长季茎中几种水解酶的活力变化

张惠, 赵雨*, 张鑫, 杨菲, 刘宏

(长春中医药大学研发中心, 长春 130117)

[摘要] **目的:** 研究人参在生长季的不同时期茎中几种水解酶的活力变化。**方法:** 以不同生长时期 5 年生人参茎为试验材料, 采用中性磷酸缓冲溶液提取粗酶液, 应用紫外分光光度法测定不同生长时期人参茎中淀粉酶 (AMY)、酯酶 (EST)、酸性磷酸酯酶 (ACP)、碱性磷酸酯酶 (ALP) 和植酸酶 (PHY) 5 种水解酶的活力。**结果:** 人参茎中 AMY 活力在人参展叶期和开花期出现活力高峰, 其他时期无明显变化; EST 活力在人参展叶期、开花期和结果期出现活力高峰, 果后参根生长期活力降低; ACP 和 ALP 活力在人参生长季的每一时期均出现活力高峰; PHY 活力在人参结果期出现活力高峰。**结论:** 在人参不同生长时期茎中 5 种水解酶活力有其各自的变化特点, 与人参的物质代谢、生长质量密切相关。

[关键词] 人参; 茎; 水解酶; 活力

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0135-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120215.1251.004 **[网络出版时间]** 2012-02-15 12:51

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120215.1251.004.html>

Changes of Hydrolase Activity of Ginseng Stems in Growing Season

ZHANG Hui, ZHAO Yu*, ZHANG Xin, YANG Fei, LIU Hong

(Changchun University of Traditional Chinese Medicine Research and
Development Center, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** In order to research at changes of several hydrolase activity of ginseng stems in the different growth stages of growing season. **Method:** With five-year old ginseng stems as material, neuter phosphoric acid buffer solution was adopted to extract thick liquid enzymes. UV spectrophotometry was applied to determine the activities of amylase (AMY), esterase (EST), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (ALP) and phytase (PHY) in ginseng stems in the different growth periods. **Result:** Activity peak of AMY was appeared in the spreading stage and the flowering stage, and no significant changes were found in other growth stage. Activity peak of EST was appeared in the spreading stage, the flowering stage, the fruit growth stage, and the activity was reduced in the root growing after fruit stage. Activity peak of ACP and ALP were appeared in every stage in the whole growing season. Activity of PHY was relatively high in the fruit growth stage. **Conclusion:** Five kinds of hydrolase activity of ginseng stems have their own characteristic changes in different periods, which may be closely related to material metabolism, growth quality of ginseng.

[Key words] Radix Ginseng; stem; hydrolase; activity

人参 *Panax ginseng* 为五加科多年生草本植物, 是我国传统珍贵中药材。了解人参生长生理特点可为提高人参产量、改善人参品质提供有效途径。酶

是基因表达的产物, 与植物生长代谢密切相关, 酶的活力变化与植物代谢的关系是研究植物生长生理的重要部分。根据催化反应性质的不同, 可将酶分为

[收稿日期] 20111101(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873371)

[第一作者] 张惠, 硕士, 从事中药学的研究, Tel:0431-86172300, E-mail:zh114193536@sina.cn

[通讯作者] * 赵雨, 教授, 博士, 从事中药学的研究, Tel:0431-86172300, E-mail:cnzhaoyu@yahoo.com.cn

6 大类,水解酶是 6 大酶类之一,参与了植物的 C, N, P 代谢。目前,人们对人参化学成分及活性的研究多数集中于人参皂苷、多糖、蛋白质及挥发性成分^[1-3],对人参中酶类的研究报道相对较少,且大多数实验是通过生化或药理方法,研究人参对某种酶性质及活力的影响,而针对人参生长季不同时期茎内水解酶的活性研究还未见报道。因此,本文以人参茎为试验材料,对其生长过程中的淀粉酶(AMY)、酯酶(EST)、酸性磷酸酯酶(ACP)、碱性磷酸酯酶(ALP)和植酸酶(PHY)5 种水解酶的活力变化进行研究,以期从酶学角度了解人参的生长发育特点,为人参中酶类的进一步研究奠定实验基础,同时为人参的质量评价提供理论依据。

1 材料

1.1 药材 试验药材为 5 年生人参茎,采自吉林农业大学人参种植试验田。于 2010 年 5 月末人参展叶期开始采集样品,一直到果后参根生长期,共采集样品 17 批。每批样品取样均在当日上午 8:00 ~ 9:00,随机采取人参约 12 株,立即带回实验室洗净,将根、茎、叶分开,本试验只取茎部。

1.2 仪器与试剂 UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司),AL204 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),5804 R 型冷冻型台式高速离心机(德国艾本德公司),DS21 型高速组织捣碎机(上海标本模型厂)。3,5-二硝基水杨酸、乙酸- α -萘酚、 α -萘酚(国药集团化学试剂有限公司),酒石酸钾钠(天津市光复科技发展有限公司),固蓝 B 盐(长春鼎国生物有限公司),对硝基苯磷酸二钠(上海晶纯试剂有限公司),植酸钠(美国 Sigma 公司)。所用试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 水解酶活力测定 5 种水解酶的活力测定均重复 3 次。

2.1.1 样品制备 取人参茎若干,称质量,按料液比 1:4 加入预冷过的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液研磨,在 4 °C 提取 20 min 后过滤。滤液 1 万 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液即为粗酶液,4 °C 冰箱中保存。

2.1.2 AMY 活力测定^[4] 取 1 mL 酶液,加入 1 mL 1% 淀粉溶液,在 40 °C 恒温水浴中准确保温 5 min,加入 2 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS),在沸水浴中加热 5 min,迅速冷却,加蒸馏水定容至 20 mL,以第一次保温前加入 DNS 试剂作为对照,540 nm 处测吸光度。根据吸光度在麦芽糖标准曲线上查出相应的麦芽糖含量,淀粉酶活力以单位时间内(1 min)

每克样品催化反应所得 1 mg 麦芽糖为 1 个酶活力单位。

2.1.3 EST 活力测定^[5] 取磷酸缓冲溶液、酶液、二次蒸馏水各 1 mL 混合,0.1 mL 乙酸- α -萘酚溶液和 0.9 mL 的固蓝 B 盐溶液混合,分别放在 2 个试管里,在 37 °C 恒温水浴下保温 10 min,拿出两管后即刻混匀,在 524 nm 处测定第 0,1,2,3 min 时的吸光度。根据吸光度在 α -萘酚标准曲线上查出相应的 α -萘酚含量。1 个酶活力单位定义为:单位时间(1 min)内每克样品与底物反应所得 1 μg 的 α -萘酚为 1 个酶活力单位。

2.1.4 ACP 活力测定^[6] 取 0.5 mL 对硝基苯磷酸(PNPP),2.3 mL 乙酸缓冲液在 37 °C 预热 10 min,加入 0.2 mL 酶液,37 °C 准确保温 10 min,加入 2 mL NaOH 终止酶反应,以先加入 NaOH 后再加酶液作为空白,然后在 405 nm 处测吸光度。根据吸光度在对硝基酚标准曲线上查出相应的对硝基酚含量。1 个酶活力单位定义为:单位时间内(1 min)每克样品反应产生 1 nmol 对硝基酚为 1 个酶活力单位。

2.1.5 ALP 活力测定^[7] 取 0.5 mL PNPP,1.5 mL 碳酸缓冲液在 37 °C 预热 10 min,加入 0.5 mL 酶液,37 °C 准确保温 5 min,加入 1 mL NaOH 终止酶反应,以先加入 NaOH 后再加酶液作为空白,然后于 405 nm 处测吸光度。根据吸光度在对硝基酚标准曲线上查出相应的对硝基酚含量。1 个酶活力单位定义为:单位时间内(1 min)每克样品反应产生 1 μmol 对硝基酚为 1 个酶活力单位。

2.1.6 植酸酶活力测定^[8] 取 0.9 mL 乙酸缓冲液与 0.1 mL 酶液混合,在 37 °C 预热 5 min,向空白管中加入终止液 2 mL,然后向每管中加入底物 2 mL,在 37 °C 反应 30 min,终止反应后混合静止 10 min,用 1 万 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。取上清在 415 nm 处测定吸光度。1 个酶活力单位定义为:单位时间内(1 min)每克样品反应所得 1 nmol 无机磷为 1 个酶活力单位。

3 结果与分析

3.1 人参茎中 AMY 活力随生育期的变化特征 人参茎中 AMY 活力在展叶期和开花期较高,最高活力值分别为 $(75.36 \pm 16.47) \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW})$ 和 $(100.29 \pm 10.99) \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW})$;结果期 AMY 活力变化不大,末期活力稍有升高,最大值为 $(45.29 \pm 17.09) \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW})$;进入果后参根生长期之后,活力无明显变化,在 $(20.70 \pm 10.56) \sim (30.23 \pm$

4.67) $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW) 波动。茎为植物转运营养物质的通道,人参展叶期是一年中茎和叶生长最旺盛的时期,在这一时期人参茎中 AMY 活力较高,表明茎细胞在不断分解淀粉,为其形态建成提供能量和营养物质;在开花期 AMY 活力仍较高,一方面可能是这时茎和叶仍处于形态建成期,另一方面可能是由于花的形成需要更高的 AMY 活力来有效的分解淀粉以提供更多的能量(图 1)。

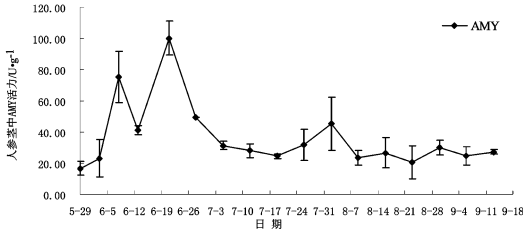


图 1 不同时期人参茎中 AMY 活力随生育期的变化 ($\bar{x} \pm s$)

3.2 人参茎中 EST 活力变化随生育期的变化特征 人参茎中 EST 活力在展叶期达到最高峰值为 $(18.34 \pm 0.20) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW); 在开花期和结果期活力值维持在 $(6.78 \pm 0.86) \sim (12.90 \pm 1.54) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW); 进入果后参根生长期以后, EST 活力水平较低, 在 $(2.72 \pm 0.21) \sim (5.32 \pm 0.59) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW) 波动。这表明在展叶期、开花期和结果期人参茎内酯类化合物代谢较快, EST 活力则升高; 而到了果后参根生长期, 人参地上部分的形态已经建成, 茎内物质代谢缓慢, 故 EST 活力处于较低水平(图 2)。

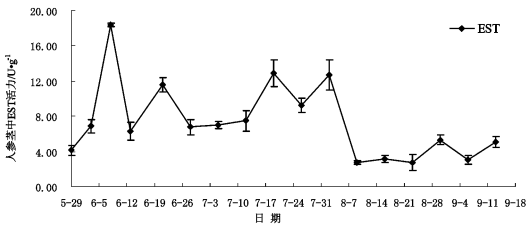


图 2 不同时期人参茎中 EST 活力随生育期的变化 ($\bar{x} \pm s$)

3.3 人参茎中 ACP 活力随生育期的变化特征 人参茎中 ACP 活力在生育期整体呈现升高趋势, 从展叶期到果后参根生长期, 每一时期都有峰值出现; 展叶期活力峰值为 $(551.58 \pm 57.01) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW); 开花期活力峰值为 $(370.39 \pm 12.35) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW); 结果期活力出现两个峰值分别为 $(673.87 \pm 16.37) \sim (735.83 \pm 51.30) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW); 果后参根生长期活力出现两个峰值分别为 $(489.64 \pm 49.50) \sim (749.84 \pm$

$37.30) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。这表明在人参的整个生育期茎内磷的代谢水平及利用率逐渐升高, 故 ACP 活力呈现上升趋势(图 3)。

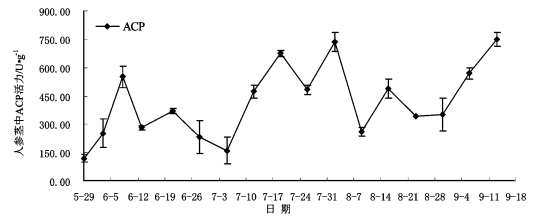


图 3 不同时期人参茎中 ACP 活力随生育期的变化 ($\bar{x} \pm s$)

3.4 人参茎中 ALP 活力随生育期的变化特征 人参茎中 ALP 活力在生长季的各个时期均有活力峰值出现, 且维持在较高水平; 展叶期活力峰值为 $(640.11 \pm 13.29) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW); 开花期活力峰值为 $(798.86 \pm 132.97) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW); 结果期活力峰值为 $(624.00 \pm 44.09) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW); 果后参根生长期活力峰值为 $(472.83 \pm 115.82) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。ALP 活力的变化特征与 ACP 活力的变化特征有相似之处, 亦表明在人参的整个生育期茎内磷的代谢水平及利用率较高(图 4)。

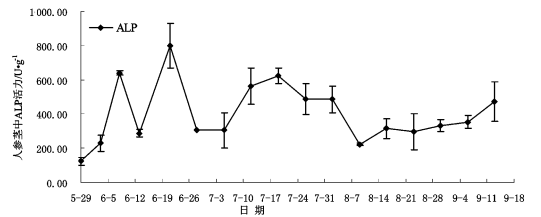


图 4 不同时期人参茎中 ALP 活力随生育期的变化 ($\bar{x} \pm s$)

3.5 人参茎中 PHY 活力随生育期的变化特征 人参茎中 PHY 的活力高峰主要出现在结果期, 两个活力峰值分别为 $(1736.98 \pm 387.47) \sim (2255.34 \pm 0.00) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW); 在展叶期和果后参根生长期分别出现了 2 个较弱的活力峰, 峰值为 $(618.77 \pm 87.47) \sim (1248.87 \pm 513.14) \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。人参茎中 PHY 活力在结果期最高, 表明在这一时期, 人参茎内植酸类物质代谢较快, 故 PHY 活力较高(图 5)。

4 讨论

植物的茎是运输营养物质的枢纽, 能将根吸收的水、无机盐以及叶片制造的有机物进行输导, 送到植物体的各部分以供其生长。茎在输导营养物质时

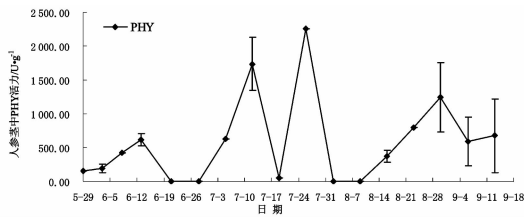


图 5 不同时期人参茎中 PHY 活力随生育期的变化 ($\bar{x} \pm s$)

需要进行一系列的酶促反应,因此,通过对茎内酶活力的考察能够反映出植物对营养物质需求量的大小。

AMY 在植物体内主要催化淀粉的水解^[9]。EST 是催化酯类化合物水解的酶系,参与植物异化作用,是脂肪合成的关键酶系之一^[10-11]。ACP, ALP 可催化磷酸酯分解为磷和相应的脂肪酸^[12-14]。PHY 是催化植酸及植酸盐水解成肌醇与磷酸(或磷酸盐)的一类酶的总称,属磷酸单酯水解酶^[15]。本文针对不同生长时期人参茎中上述 5 种水解酶的活力进行了研究,可了解到在人参不同生长发育时期 5 种酶有其各自的变化特点,分别起着不同的作用。AMY 的活力变化反映了人参在展叶期和开花期对淀粉水解物糖类的需求量较大,而其他时期需求量较小;EST 的活力变化反映了人参在展叶期、开花期和结果期对脂肪类物质的需求量大于果后参根生长期;ACP 和 ALP 的活力变化反映了人参在整个生长发育时期对全磷的需求量都较大;PHY 的活力变化反映了人参果实的形成所需磷的重要来源之一为茎中植酸的水解。

由此可见,通过测定不同生长时期人参中重要酶的酶活力,可以监测人参生长过程中某种营养元素的缺乏与否,也可为人参的质量评价提供新方法。然而,人参在生长过程中体内的酶活性受温度、土壤酸碱度、基因控制等因素的影响,有关人参酶活性的生长质量评价指标以及人参物质代谢与酶活性的内在分子机制还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 黎阳,张铁军,刘素香,等. 人参化学成分和药理研究进展[J]. 中草药,2009,40(1):164.
- [2] Chu S F, Zhang J T. New achievements in ginseng research and its future prospects[J]. Chin J Integr Med, 2009,15(6):403.
- [3] 张巍,李红艳,马晶,等. 人参水溶性蛋白的纯化工艺研究[J]. 吉林农业大学报,2008,30(1):36.
- [4] 郝建军,康宗利,于洋. 植物生理学实验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007:104.
- [5] 侯明迪. 植物酯酶法快速测定有机磷农药残留的研究[J]. 食品科学,2002,23(7):111.
- [6] 王琰. 生物化学和临床生物化学检验[M]. 北京:清华大学出版社,2005:151.
- [7] 俞建英. 生物化学实验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:255.
- [8] GB/T 18634-2002. 饲用植酸酶活性的测定-分光光度法[S].
- [9] 于洋,朴炫春,吴松权. 组培平贝母不同阶段培养体淀粉酶同工酶电泳及其活力的研究[J]. 中国农学通报,2010,26(7):52.
- [10] 李剑美,谢庆华,张云峰,等. 魔芋组织培养中不同生长阶段同工酶变化的研究[J]. 云南农业大学学报,2008,23(5):603.
- [11] 宫纪娟,金喜军,龚振平,等. 春大豆荚果发育过程中酯酶同工酶酶谱分析[J]. 作物杂志,2010(4):39.
- [12] 邱化蛟,贺明荣,常欣,等. 不同基因型冬小麦叶片酸性磷酸酯酶活性的差异[J]. 作物学报,2004,30(8):792.
- [13] 杨安刚,毛积芳,药立波. 生物化学与分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社,2001:257.
- [14] 孙君社,江正强,刘萍. 酶与酶工程及其应用[M]. 北京:化学工业出版社,2006:280.
- [15] 赵宁春,程方民,张小明. 作物种子中植酸代谢及其相关酶的研究进展[J]. 作物杂志,2008(5):10.

[责任编辑 邹晓翠]