

苹果果实转化酶的种类和特性研究

王永章 王小芳 张大鹏

(中国农业大学园艺学院)

摘要 研究表明,新红星苹果果实中存在3种形式的转化酶,即可溶性酸性转化酶、可溶性中性转化酶和细胞壁结合酸性转化酶。1)酸性转化酶的最适反应温度为40℃,而中性转化酶为50℃。DTT(二硫苏糖醇)显著提高可溶性转化酶的活性,3种转化酶活性均受到 Ag^+ 和 Hg^{2+} 的显著抑制,表明转化酶的活性部位含巯基基团。转化酶活性还受到二价阳离子 Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 的显著激活。2) Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 也能提高可溶性酸性转化酶和细胞壁酸性转化酶活性,但可溶性中性转化酶受到这些金属离子的部分抑制。3)可溶性转化酶对蔗糖的 K_m 值小于细胞壁转化酶对蔗糖的 K_m 值,而其 V_{\max} 值大于细胞壁转化酶的 V_{\max} 值,说明可溶性转化酶比细胞壁酸性转化酶对蔗糖有较大的亲和力和较强的催化速率。本文对转化酶特性与苹果果实发育的关系进行了讨论。

关键词 苹果果实; 转化酶特性

中图分类号 S661.1

Study of Invertase in Apple Fruit

Wang Yongzhang Wang Xiaofang Zhang Dapeng

(College of Horticulture Science, CAU)

Abstract The experiment conducted with 'Starkrimson' apple fruit, showed that there existed all three isoforms of invertase, namely soluble acid invertase, soluble neutral invertase and cell wall-bound invertase in developing apple fruit. The optimum temperature for acid invertase activity was 40℃, but that for neutral invertase activity was 50℃. The results also showed that DTT treatment significantly increased the activities of soluble invertases, however, it had no effect on cell wall-bound invertase. The activities of soluble acid invertase, soluble neutral invertase and cell wall-bound invertase were significantly inhibited by Hg^{2+} and Ag^+ , but enhanced by Mn^{2+} and Ca^{2+} . Moreover, Cu^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} also increased the activities of acid invertases, including soluble acid invertase and cell wall-bound acid invertase, while the activity of soluble neutral invertase was partially inhibited by these metal ions. Soluble invertases had lower K_m and higher V_{\max} compared with cell wall-bound acid invertase according to the kinetic study of invertase with sucrose as reaction substrate. The function of the invertases in sugar metabolism was discussed in relation to the fruit development.

Key words apple fruit; invertase

收稿日期: 2001-03-14

国家自然科学基金重点资助项目(39730340)

王永章, 山东省莱阳市莱阳农学院园艺系, 265200

肉质果实中糖的种类和数量是决定其品质的重要因素^[1-5]。蔗糖不但是苹果碳水化合物输入果实的一种重要形式,而且在与果实发育有关的糖代谢中起着重要的作用^[1,2,4,5]。转化酶和蔗糖合酶是参与果实中蔗糖降解代谢的2种关键酶^[1,2,4,6]。转化酶将蔗糖分解成果糖和葡萄糖,蔗糖合酶将蔗糖分解成果糖和UDPG(尿苷二磷酸葡萄糖)。由于蔗糖合酶催化的反应是可逆的^[2,4],所以转化酶在蔗糖降解代谢中起着更重要的作用^[1,2]。虽然对苹果果实的转化酶曾有研究,但均为发育过程中的活性变化规律^[3]。由于苹果果实发育过程的特殊性,即含酸量较高,酚类物质较多,组成成分复杂,本研究用苹果果实转化酶粗提液对苹果果实转化酶的种类和特性进行了初步分析,以期对苹果果实转化酶的分离、纯化提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验于1999—2000年在中国农业大学进行,试材为10年生新红星/西府海棠(*Malus domestica* Borkh cv. Starkrimson/*Malus micromalus*),在果实发育过程中定期取鲜样(盛花后60~70d),处理测定。

1.2 酶液的制备及酶活性的测定

酶液的制备参照Miron等^[7]的方法:称取5g果肉置于研钵内加少量石英砂和20mL HEPES缓冲液。HEPES缓冲液组成为:50mmol·L⁻¹ HEPES-NaOH(pH 7.5),10mmol·L⁻¹ MgCl₂,1mmol·L⁻¹ EDTA,2.5mmol·L⁻¹ DTT,10mmol·L⁻¹ 抗坏血酸和5% PVPP(聚乙烯吡咯烷酮),冰浴研磨成匀浆,12000×g离心20min,上清液用稀释10倍的提取缓冲液(不含PVPP)透析20h(去除可溶性糖)用于可溶性转化酶活性的测定。细胞壁转化酶的提取:提取可溶性蛋白后,加5mL HEPES提取缓冲液,混匀后离心弃上清留沉淀,重新加入20mL HEPES缓冲液(含0.5mol·L⁻¹ NaCl),充分混匀后低温(4℃)轻微振荡浸提24h,12000×g离心20min,取上清液透析后用于细胞壁转化酶活性的测定。上述所有操作均在0~4℃进行。

转化酶活性的测定:可溶性酸性转化酶,可溶性中性转化酶和细胞壁转化酶活性的测定按Miron等^[7]的方法进行:测定酸性转化酶的反应液组成为:0.1mol·L⁻¹ HAC-NaAC(pH 4.8),0.1mol·L⁻¹蔗糖;中性转化酶的反应液组成为:0.1mol·L⁻¹ K₂HPO₄-HAC(pH 7.2),0.1mol·L⁻¹蔗糖;37℃反应30min,用3,5-二硝基水杨酸测定形成的还原糖,以还原糖的生成量表示转化酶活性(μmol·g⁻¹·h⁻¹)。

1.3 研究内容及方法

1.3.1 pH对转化酶活性的影响 以0.1mol·L⁻¹ Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液为反应介质,设pH为3,4,5,6,7,8共6个不同水平,测定pH对转化酶活性的影响。

1.3.2 温度对转化酶活性的影响 设10,20,30,40,50,60,70℃共7个温度水平,测定可溶性酸性转化酶、中性转化酶和细胞壁酸性转化酶活性。

1.3.3 提取液NaCl浓度对细胞壁转化酶活性的影响 HEPES缓冲液中加入不同剂量的NaCl(分别为0,0.2,0.5和1.0mol·L⁻¹)提取细胞壁转化酶(方法同上)。以0.1mol·L⁻¹ HAC-NaAC(pH 4.8)或0.1mol·L⁻¹ K₂HPO₄-HAC(pH 7.2)为反应介质测定转化酶的活性。

1.3.4 DTT对转化酶活性的影响 在各反应体系中加入不同剂量的DTT,使其最终浓度分别为0,5,10,20mmol·L⁻¹,测定转化酶的活性。

1.3.5 金属离子对转化酶活性的影响 在各反应体系中加入不同种类金属离子,使阳离子最终浓度达到 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,分析对转化酶活性的影响。

上述所有处理中,转化酶(可溶性酸性转化酶、可溶性中性转化酶和细胞壁转化酶)活性的测定均重复 3~5 次。

2 结果与分析

2.1 pH 对果实转化酶活性的影响

从图 1 可以看出,在介质 pH 5 和 7 时,苹果果实可溶性转化酶活性较高,分别为 $7.23 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $5.62 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,远高于 pH 在其他值时的活性,这表明苹果果实存在可溶性酸性转化酶(pH 5)和可溶性中性转化酶(pH 7),且以酸性转化酶为主。从不同介质 pH 对细胞壁转化酶的影响可以看出,在 pH 为 4 时其活性最高($2.77 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),随着介质 pH 的升高,细胞壁转化酶的活性逐渐降低,表明苹果果实细胞壁结合的转化酶以酸性转化酶为主。

2.2 温度对果实转化酶活性的影响

介质温度影响苹果果实转化酶活性(图 2),随着反应介质温度的升高,可溶性转化酶和细胞壁转化酶的活性逐渐增加,当介质温度 40°C 时,可溶性酸性转化酶和细胞壁酸性转化酶活性达到最高,分别为 $7.83 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $1.77 \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,而可溶性中性转化酶在反应介质 50°C 时活性最高($6.42 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)。酸性转化酶在 $> 40^\circ\text{C}$ 时,活性已下降。此后,随着温度的升高,3 种转化酶活性均逐渐较低;当反应介质达到 70°C ,三者都基本失去活性。

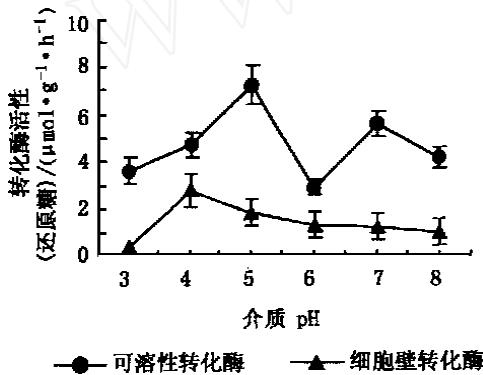


图 1 pH 对苹果果实转化酶活性的影响

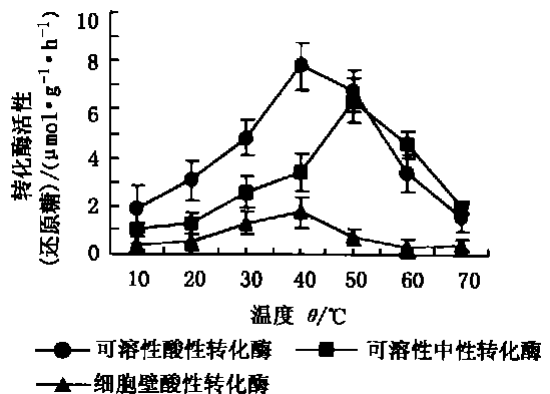


图 2 温度对苹果果实转化酶活性的影响

2.3 提取液 NaCl 浓度对细胞壁转化酶活性的影响

HEPES 提取缓冲液中 NaCl 的所用剂量影响细胞壁转化酶活性(图 3),随着提取缓冲液中 NaCl 浓度的增加,细胞壁转化酶活性逐渐增高,含 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 HEPES 提取缓冲液对细胞壁转化酶的浸提效果最好,其活性最高($2.85 \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),显著高于 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 及其他浓度($0, 0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的转化酶活性。从图 3 还可以看出,在所有 NaCl 处理中,细胞壁酸性转化酶活性均显著高于细胞壁中性转化酶活性。

2.4 DTT 对果实转化酶活性的影响

DTT 影响果实可溶性转化酶活性: 随着反应介质中 DTT 浓度的增加, 可溶性酸性转化酶和中性转化酶活性均有显著的提高, 其中对中性转化酶活性的影响尤为显著, 与对照 (DTT 0 mmol·L⁻¹) 相比, 中性转化酶活性提高了 8.02 倍 (DTT 20 mmol·L⁻¹), 酸性转化酶活性提高了 3.52 倍 (DTT 20 mmol·L⁻¹)。然而 DTT 对细胞壁酸性转化酶活性基本无影响: 介质 DTT 浓度从 5 mmol·L⁻¹ 增加到 20 mmol·L⁻¹, 细胞壁酸性转化酶活性变化较小, 与对照相比无显著差异 (图 4)。

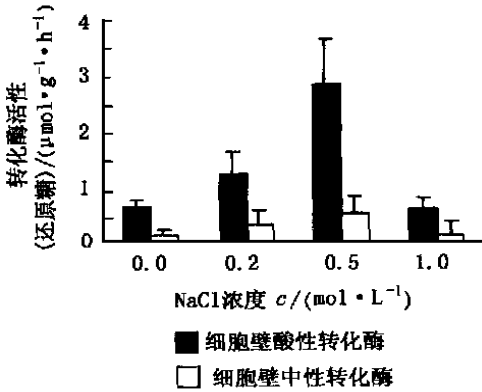


图 3 提取液 NaCl 浓度对细胞壁转化酶活性的影响

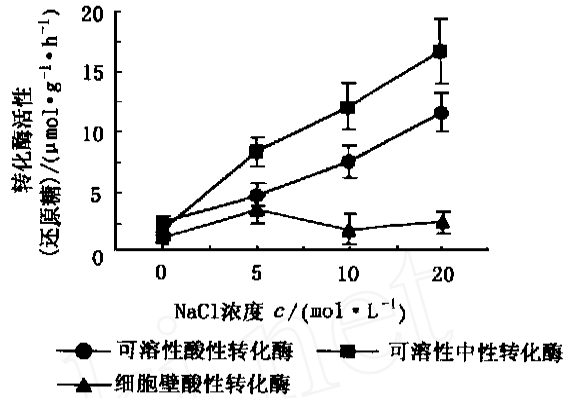


图 4 DTT 对苹果果实转化酶活性的影响

2.5 金属离子对果实转化酶活性的影响

表 1 金属离子对苹果果实转化酶活性的影响

μmol·g⁻¹·h⁻¹

处理	可溶性酸性转化酶		可溶性中性转化酶		细胞壁酸性转化酶	
	酶活性	相对活性/%	酶活性	相对活性/%	酶活性	相对活性/%
CK	5.0 c [*]	100.0	5.5 b	100.0	2.5 c	100.0
Ag ⁺	0 d	0	0 d	0	0 d	0
Hg ²⁺	0.3 d	5.0	0.1 d	2.6	0.1 d	5.1
Mn ²⁺	13.2 a	263.1	7.9 a	146.4	8.7 a	342.9
Ca ²⁺	7.8 b	155.3	8.0 a	146.6	3.3 b	130.9
Cu ²⁺	7.0 b	139.9	2.2 c	39.5	4.2 b	163.8
Mg ²⁺	5.6 c	110.8	4.6 b	84.6	3.8 b	148.8
Zn ²⁺	6.0 c	119.9	4.7 b	85.9	2.9 c	112.2

注: 数字后不同字母表示差异显著

表 1 显示, 果实可溶性转化酶 (包括酸性转化酶和中性转化酶) 及细胞壁转化酶活性均显著地受到 Ag⁺, Hg²⁺ 的抑制, 其中 Ag⁺ 完全抑制了这 3 种转化酶的活性; 而与此相反, Mn²⁺, Ca²⁺ 显著提高可溶性酸性转化酶、中性转化酶和细胞壁转化酶的活性, 为对照活性的 131% ~ 343%。从表 1 中还可以看出, Cu²⁺, Mg²⁺ 和 Zn²⁺ 也在一定程度上提高了可溶性酸性转化酶和细胞壁转化酶的活性, 但却抑制了可溶性中性转化酶的活性, 其中 Cu²⁺ 对可溶性中性转化酶

的抑制最为明显。

2.6 果实转化酶的酶促动力学特性

从表 2 可以看出, 细胞壁酸性转化酶对蔗糖的 K_m 值分别为可溶性酸性转化酶和可溶性中性转化酶 K_m 值的 1.44 倍和 1.86 倍; 可溶性酸性转化酶的 V_{max} 为细胞壁酸性转化酶的 4.12 倍; 可溶性中性转化酶的 V_{max} 为细胞壁酸性转化酶的 2.72 倍。因此表明, 与细胞壁酸性转化酶相比, 可溶性转化酶(包括酸性转化酶和中性转化酶)对蔗糖有较大的亲和力和较高的催化效率。

表 2 苹果果实转化酶酶促动力学参数

酶促动力学参数	可溶性酸性转化酶	可溶性中性转化酶	细胞壁转化酶
米氏常数(K_m)/(mmol·L ⁻¹)	1.85 b	1.58 b	4.53 a
最大反应速率(V_{max})/(μmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	9.51 a	6.93 b	1.86 c

3 讨论

现有的研究表明, 存在于植物体中的转化酶有多种形态, 且在细胞内是区隔化的: 定位于细胞壁和液泡中的转化酶主要是酸性转化酶, 而定位于胞质中的转化酶主要是中性转化酶^[8-11]。这 3 种转化酶不但在最适 pH 上有差异, 而且在其他生化特性方面也所有不同, 从而保证了根据发育的需求, 使不同亚细胞区域或不同来源的蔗糖得到有序的降解^[9, 12, 13]。本研究证实转化酶的这 3 种形式均存在于苹果果实中且在理化特性方面存在差异, 所以可以认为, 苹果果肉细胞中不同部位的蔗糖可能经历了不同的区域化降解过程^[2, 4, 5, 10]: 1) 叶片合成的蔗糖通过共质体途径直接卸入果肉细胞后, 可由定位于胞质中的中性转化酶所降解^[2, 14]; 2) 叶片合成的蔗糖卸出到果实的质外空间后^[2, 14], 可由定位于细胞壁中的酸性转化酶降解成己糖, 再由己糖载体将积累的己糖转入果肉细胞内^[3, 5]; 3) 在果肉细胞内由蔗糖合酶或蔗糖磷酸合酶催化合成的蔗糖^[5], 在发育需要时, 可由胞质中的中性转化酶所降解; 4) 输入果肉细胞液泡中的蔗糖, 可由定位于液泡中的酸性转化酶进行降解。蔗糖的来源及代谢在苹果果实发育的不同时期存在一定的差异^[3, 5], 而转化酶种类和活性的调控, 在很大程度上可能与这种发育的阶段差异性有关。

在分析测定中, 关于细胞壁转化酶的提取, 依据不同植物材料, 所用 NaCl 剂量差异较大, 一般为 0.1~1.0 mol·L⁻¹^[9, 13]。本研究结果表明, 含 0.5 mol·L⁻¹ NaCl 的提取缓冲液对苹果果实细胞壁转化酶的浸提效果最好。并且证明, 酸性转化酶为苹果果实细胞壁转化酶的主要存在形式, 这为苹果果实转化酶的纯化提供了参考依据。另外, 实验还表明, 还原性巯基试剂 DTT 可显著提高可溶性酸性转化酶和中性转化酶的活性, 而破坏巯基稳定性的 Hg²⁺ 和 Ag⁺ (1 mmol·L⁻¹) 完全抑制了各种形态转化酶的活性, 这表明苹果果实转化酶的活性部位含有巯基基团, 这与在小麦、大麦等植物上的研究结果相一致^[8, 13, 15]。Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ 和 Mn²⁺ 对酸性转化酶活性有促进作用, 表明这些金属离子有利于维护酸性转化酶的活性部位。中性转化酶与酸性转化酶相比, 其最适反应温度比酸性转化酶高出 10 ℃, Mg²⁺, Zn²⁺ 和 Cu²⁺ 也均抑制可溶性中性转化酶的活性, 所以中性转化酶和酸性转化酶可能存在不同的活性调控的机制。

从苹果果实转化酶对蔗糖的酶促动力学参数可以看出,细胞壁酸性转化酶对蔗糖的 K_m 值远大于可溶性酸性转化酶和中性转化酶的 K_m 值,可溶性酸性转化酶和中性转化酶的最大催化速率 (V_{max}) 显著高于细胞壁酸性转化酶的 V_{max} ,从而表明与细胞壁酸性转化酶相比,可溶性酸性转化酶和中性转化酶对蔗糖有较大的亲和力和转化能力。

转化酶催化的蔗糖降解具有专一性和不可逆性,本研究利用苹果果实转化酶的粗提液对转化酶的种类和特性进行了分析,使我们对苹果果实转化酶的理化特性有了初步的认识,苹果果实转化酶的分离和纯化正在此研究基础上深入进行。

参 考 文 献

- 1 王永章, 张大鹏 乙烯对成熟期红星苹果果实碳水化合物代谢的调控 园艺学报, 2000, 27 (6): 391~395
- 2 吕英民, 张大鹏 果实发育过程中糖的积累 植物生理学通讯, 2000, 36 (3): 258~ 265
- 3 Beruter J. Sugar accumulation and changes in the activities of related enzymes during development of apple fruit J Plant Physiol, 1985, 121: 331~ 334
- 4 Moriguchi T, Abe K, Sanada T, et al Level and role of sucrose synthase, sucrose phosphate synthase and acid invertase in sucrose accumulation in fruit of Asian pear. J Amer Soc Hort Sci, 1992, 117: 274~ 278
- 5 Yamaki S Physiology and Metabolism and Compartment Biochemistry of sugar metabolism and compartmentation in fruit Acta Hort, 1995, 398: 109~ 120
- 6 Beruter J, Studer M E, Rued P. Sorbitol and sucrose partitioning in the growing apple fruit J Plant Physiol, 1997, 151: 269~ 276
- 7 Miron D, Schaffer A A. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill and the sucrose accumulating in *Lycopersicon hirsutum* Humb and Bonp. Plant Physiol, 1991, 95: 623~ 627
- 8 Karupiah N, Vadlamudi B, Kaufman P B. Purification and characterization of soluble (cytosolic) and bound (cell wall) isoforms of invertases in barley (*Hordeum vulgare*) elongating stem tissue Plant Physiol, 1989, 91: 993~ 998
- 9 Fahrendorf T, Beck E. Cytosolic and cell wall-bound acid invertases from leaves of *H. rita dooica* L. : A comparison. Planta, 1990, 180: 237~ 244
- 10 Miller W B, Ranwala A P. Characterization and localization of three soluble invertase forms from *Lilium longiflorum* flower buds Physiol Plant, 1994, 92: 247~ 253
- 11 Tang X W, Ruffner H P, Scholes J D, et al Purification and characterization of soluble invertase from leaves of *Arabidopsis thaliana*. Planta, 1996, 198: 17~ 23
- 12 Obenland D M, Simmen U, Boller T, et al Purification and characterization of three soluble invertases from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves Plant Physiol, 1993, 101: 1331~ 1339
- 13 Krishan H B, Blanchette T T, Okita T W. Wheat invertases: Characterization of cell wall-bound and soluble form. Plant Physiol, 1985, 78: 241~ 245
- 14 吕英民, 张大鹏, 严海燕 糖在苹果果实中卸载机制的研究 园艺学报, 1999, 26 (3): 141~ 146
- 15 Isla M I, Vattuone M A, Sampietro A R. Essential group at the active site of *Frapaeolum* invertase Phytochemistry, 1998, 47: 1189~ 1193