

· 专 栏 ·

· 中药与天然药 ·

## 人参出苗期几种水解酶的活力变化

邢楠楠, 赵雨\*, 刘宏, 刘海龙, 王涵(长春中医药大学, 长春 130117)

**摘要:** 目的 研究五年生人参几种水解酶在出苗期的活力变化。方法 采用中性磷酸缓冲溶液提取粗酶液。应用紫外分光光度法分别测定淀粉酶(AMY)、酯酶(Est)、酸性磷酸酯酶(ACP)、碱性磷酸酯酶(ALP)和植酸酶的活力。结果 人参根部 Est、ACP 和 ALP 活力都是先增加后下降再增加; 幼苗 Est 活力在出苗期前 7 d 增加较快之后无明显变化, ACP 活力在出苗期第 10 天出现一个峰值, ALP 活力始终保持上升趋势; 人参根部 AMY 和植酸酶活力变化趋势相似, 在出苗期第 4 至 13 天活力迅速增加, 之后下降; 而在幼苗中两种酶的变化趋势完全相反。结论 在出苗期, 人参 5 种水解酶活力变化曲线有所差异, 这可作为人参出苗期幼苗形态不同阶段的生理指标。

**关键词:** 人参; 出苗期; 水解酶

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)05-0429-04

### Changes of Several Hydrolase Activities in the Period of Emergence in Ginseng Radix et Rhizoma

XING Nannan, ZHAO Yu\*, LIU Hong, LIU Hailong, WANG Han(*Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study changes of several hydrolase activities in the period of emergence in five years of Ginseng Radix et Rhizoma. **METHODS** Neutral phosphate buffer was selected to extract crude extract. UV was applied to determine the activities of amylase (AMY), esterase (Est), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (ALP), and phytase. **RESULTS** The trend of Est, ACP, and ALP activities increased first and then decreased to increase. Est activity increased rapidly in the first 7 days, after which there was no significant change in the period of emergence. ACP activity reached a peak on the 10th day of the period of emergence. ALP activity remained steady upward trend. The trend of AMY was similar to phytase in ginseng root. In the first 4-13 days, activity increased rapidly, then decreased. The trend of two enzymes activities was completely opposite in seedlings. **CONCLUSION** Five hydrolase activity curves are different, which can be used as a physiological index of ginseng seedling morphogenesis at different stages of period of emergence.

**KEY WORDS:** Ginseng Radix et Rhizoma; period of emergence; hydrolase

人参(*Panax ginseng* C.A.Mey.)为中国传统珍贵中药材。我国人参栽培已有 1 700 年历史, 规模化生产有 400 余年的历史<sup>[1]</sup>。人参生长生理研究对提高其产量及质量有重要指导意义。以往对其生长发育规律的研究多以皂苷、多糖含量等作为研究对象及评价指标。酶作为具有催化作用的蛋白质, 在植物生长发育过程中起着重要作用。其中水解酶存在于植物各组织中, 与植物生长及干物质积累密切相关。之前笔者已对不同产地、不同年限人参中淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶的活力进行了比较研究<sup>[2]</sup>。在已有方法的基础上本试验选取淀粉酶

(AMY)、酯酶(Est)、酸性磷酸酯酶(ACP)、碱性磷酸酯酶(ALP)、植酸酶 5 种植物中常见的水解酶, 以其酶活力作为指标研究人参出苗期的生长发育规律。

### 1 实验材料

#### 1.1 材料

实验用样品为五年生人参全株植物, 采自吉林农业大学, 经长春中医药大学研发中心姜大成教授鉴定, 均为五加科植物 *Panax ginseng* C.A.Mey., 符合中国药典 2010 年版一部的规定。从 5 月初萌芽开始每隔 3 d 采集一次样品, 共采集样品 6 次,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873371); 国家科技支撑计划资助项目(2007BAI38B02)

作者简介: 邢楠楠, 女, 硕士生 Tel: (0431)86172331 E-mail: nanxing1984@yahoo.com.cn \*通信作者: 赵雨, 男, 博士, 教授, 硕士  
Tel: (0431)86172300 E-mail: cnzhaoyu@yahoo.com.cn

标本储存于长春中医药大学生物工程实验室。

## 1.2 仪器与试剂

**1.2.1 仪器** UV-2550 紫外分光光度计(日本岛津公司); 电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂); PL203 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); AL204 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); TE212-L 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); ALC-2100.2 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); 5804 R 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); Multiskan MK3 型酶标仪(Thermo 公司)。

**1.2.2 试剂** 3,5-二硝基水杨酸(DNS, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20100118); 酒石酸钾钠(天津市光复科技发展有限公司, 批号: 2000311); 乙酸- $\alpha$ -萘酯(国药集团化学试剂有限公司, 批号: T20090212); 固蓝 B 盐(长春鼎国生物有限公司, 批号: S0084);  $\alpha$ -萘酚(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20080925); 对硝基苯磷酸二钠(PNPP, 上海晶纯试剂有限公司, 批号: 26109); 植酸钠(美国 Sigma 公司, 批号: 100918646)。所用试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

## 2 方法

### 2.1 供试样品的制备

将采集样品放入塑料袋内, 带回实验室后洗净, 然后选取质量适中、无病的人参 3 棵, 称其根及苗的重量, 用于制备待测用酶液。向样品中按料液比 1 : 4 加入预冷过的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液, 匀浆, 4 °C 冰箱中浸提 20 min, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min。取上清即为粗酶液, 4 °C 冰箱中保存。

### 2.2 AMY 活力测定<sup>[3]</sup>

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 DNS, 在沸水浴中加热 5 min, 迅速冷却, 加水定容至 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 麦芽糖为一个酶活力单位。

### 2.3 Est 活力测定<sup>[4]</sup>

取 1 mL pH 值 7.8 的磷酸缓冲溶液、1 mL 酶液、1 mL 水混合, 0.1 mL 乙酸- $\alpha$ -萘酯溶液(将 5 mg 乙酸- $\alpha$ -萘酯溶于 4 mL 无水乙醇中)和 0.9 mL 的

固蓝 B 盐溶液(将 4 mg 固蓝 B 盐溶于 20 mL 水中)混合, 分别放在两个试管里, 在 37 °C 恒温水浴下保温 10 min, 拿出两管后即刻混匀, 在 524 nm 处测定其在 30, 60, 90, 120 s 的吸光度。根据吸光度在  $\alpha$ -萘酚标准曲线上查出相应的  $\alpha$ -萘酚含量。一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  $\mu$ g 的  $\alpha$ -萘酚为 1 个酶活力单位。

### 2.4 ACP 活力测定<sup>[5]</sup>

取 0.5 mL 0.0075 mol·L<sup>-1</sup> PNPP, 2.3 mL pH4.6 的乙酸缓冲液在 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 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 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。一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。

### 2.5 ALP 活力测定<sup>[6]</sup>

取 0.5 mL 0.02 mol·L<sup>-1</sup> PNPP, 1.5 mL pH 10.0 的碳酸缓冲液在 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 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 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。一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  $\mu$ mol 对硝基酚为 1 个酶活力单位。

### 2.6 植酸酶活力测定

参照国标测定, 取 0.9 mL 0.25 mol·L<sup>-1</sup> 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, 10 200 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min。取上清在 415 nm 处测定吸光度。一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  $\mu$ mol 无机磷为一个酶活力单位。

## 3 结果与讨论

### 3.1 结果

**3.1.1 重量变化** 在出苗期的前 7 d, 根部重量明显增加约 3 倍, 之后 3 d 重量略有下降, 然后稍有增加并持续至出苗期结束。人参幼苗重量在出苗期前 13 d 以直线趋势增长, 之后 3 d 生长略加快。见图 1。

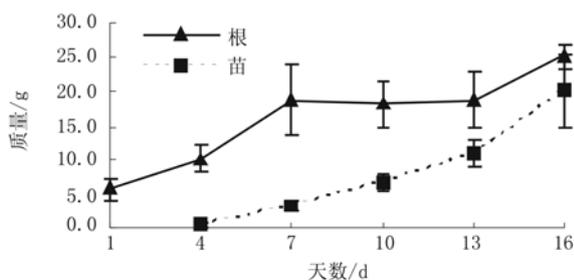


图1 人参出苗期根部与幼苗质量变化

Fig 1 Mass change of ginseng root and seedling in emergence stage

**3.1.2 AMY 活力变化** 人参根部 AMY 活力在第 4 天至 13 天迅速增加至 $(584 \pm 10)U \cdot g^{-1}$ , 尤其是在第 10 天至第 13 天活力增加较快, 之后有所下降。幼苗中 AMY 活力明显低于根部淀粉酶活力, 仅为根部活力的十几分之一。见图 2。

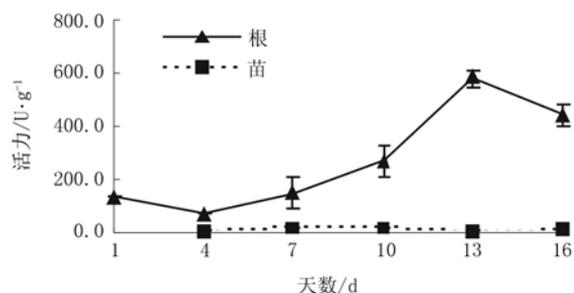


图2 人参出苗期根部与幼苗 AMY 活力变化

Fig 2 AMY activity change of ginseng root and seedling in emergence stage

**3.1.3 Est 活力变化** 根部与幼苗 Est 变化趋势相似, 在第 7 天根部与幼苗 Est 活力出现 1 个峰值分别为 $(1.92 \pm 0.21)U \cdot g^{-1}$ 和 $(2.34 \pm 0.19)U \cdot g^{-1}$ 。之后根部活力维持在 $(0.94 \pm 0.16)U \cdot g^{-1}$ 至 $(1.8 \pm 0.4)U \cdot g^{-1}$ 之间; 幼苗活力维持在 $(1.85 \pm 0.09)U \cdot g^{-1}$ 至 $(2.61 \pm 0.29)U \cdot g^{-1}$ 之间。见图 3。

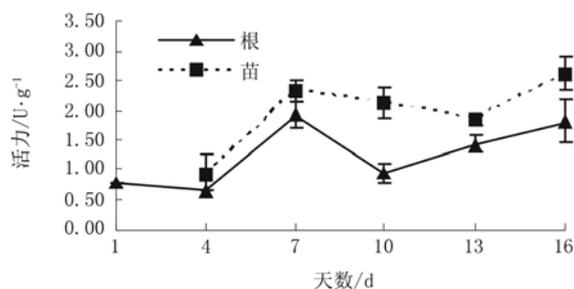


图3 人参出苗期根部与幼苗 Est 酶活力变化

Fig 3 Est activity change of ginseng root and seedling in emergence stage

**3.1.4 ACP 活力变化** 根部与幼苗 ACP 活力变化趋势相似, 根部在出苗期第 7 天时有一个活力峰值为 $(182 \pm 50)U \cdot g^{-1}$ 。幼苗在第 10 天时有一个活力峰值为 $(264 \pm 21)U \cdot g^{-1}$ , 之后 3 d 活力有所下降, 然后又开始上升直至出苗期结束达 $(354 \pm 51)U \cdot g^{-1}$ 。见图 4。

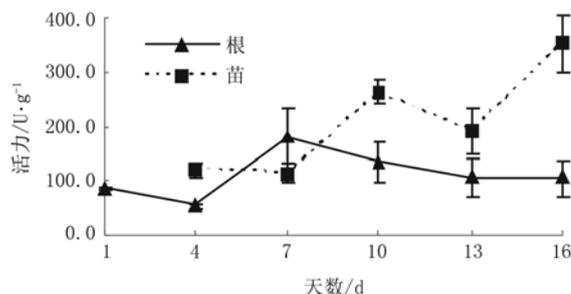


图4 人参出苗期根部与幼苗 ACP 活力变化

Fig 4 ACP activity change of ginseng root and seedling in emergence stage

**3.1.5 ALP 活力变化** 根部活力在出苗期第 7 天出现峰值为 $(128 \pm 25)U \cdot g^{-1}$ , 第 10 天之后活力无明显变化, 活力维持在 $(32.9 \pm 0.0)U \cdot g^{-1}$ 至 $(48 \pm 7)U \cdot g^{-1}$ 之间。幼苗活力在整个出苗期始终保持上升趋势, 在出苗期结束时活力增加约 5 倍。见图 5。

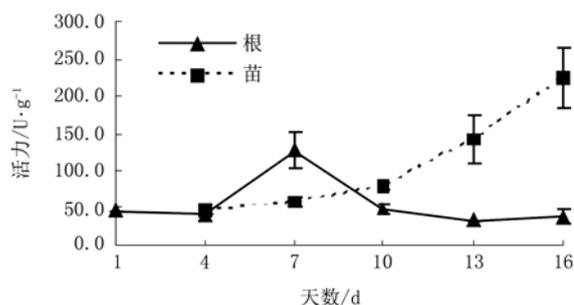


图5 人参出苗期根部与幼苗 ALP 活力变化

Fig 5 ALP activity change of ginseng root and seedling in emergence stage

**3.1.6 植酸酶活力变化** 根部植酸酶活力变化趋势与根部淀粉酶活力变化趋势相似, 从出苗期第 4 天至第 13 天活力持续升高, 之后有所下降。幼苗的植酸酶活力在出苗期初期较高, 出苗期结束时活力下降至 $(0.13 \pm 0.00)U \cdot g^{-1}$ 。见图 6。

## 3.2 讨论

淀粉是植物细胞代谢所需糖类营养物质的主要来源之一。AMY 作为淀粉被分解为麦芽糖的起始酶而起主要作用。几乎所有植物中都存在 AMY, 其对淀粉的水解能力直接影响到植物生长发育的

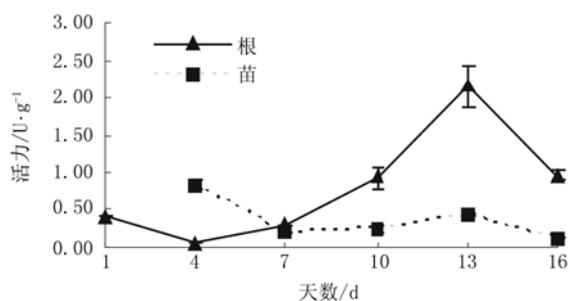


图6 人参出苗期根部与幼苗植酸酶活力变化

Fig 6 Phytase activity change of ginseng root and seedling in emergence stage

进程,其活力大小存在组织特异性。由本实验结果可知,人参根部 AMY 活力明显大于幼苗。人参根部作为储存器官在越冬前累积了大量淀粉,出苗期开始由于地上部分尚未形成,无法进行光合作用,其生长所需营养能量来自根部。这时根部代谢能力强,AMY 活力高。而幼苗中的营养能量主要用于形态建成,淀粉积累少,酶活力低。对第 7 天采集的样品观察可知,这时的幼苗刚刚钻出地面,第 10 天地上部分由黄色转为绿色,幼苗开始进行光合作用,呼吸代谢加强,生长所需葡萄糖量增加,这可能是促使 AMY 之后 3 d 活力急剧增加的原因。人参幼苗中 AMY 活力始终维持在较低水平,反映出幼苗中被分解的淀粉很少,幼苗呼吸代谢所需的葡萄糖底物或者是直接利用光合作用产物;或者是淀粉在根部被水解为麦芽糖,麦芽糖再被麦芽糖酶水解为葡萄糖,之后转运到生长部位被利用。

Est, ACP 和 ALP 是植物脂类代谢相关酶,在脂类消化吸收过程中起重要作用。Est 存在于植物各部位和不同发育时期的细胞中,主要分布在细胞质的球状颗粒内、由于它能水解非生理存在的酯类化合物,包括一些药物,因此认为可能对植物有去毒作用<sup>[7]</sup>。ACP 与 ALP 是非特异性磷酸水解酶,可作用于多种底物,与出苗过程中磷的代谢密切相关。实验结果表明,人参根部的 Est, ACP 和 ALP 变化趋势相似,说明在根部这 3 种水解酶可能是受同一因素调控所致。

植酸酶是催化植酸(肌醇六磷酸)及植酸盐水解生成肌醇,释放磷酸及其盐的一类生物催化

剂<sup>[8]</sup>。在植物体内植酸盐很难被吸收利用,植酸酶可降解植酸盐以提高植物对矿物质钙和铁的吸收利用。文铁桥等<sup>[9]</sup>研究了水稻植酸酶活性对种子萌发的影响,发现种子由休眠转入萌发状态的过程中植酸酶起着重要的作用:植酸酶活性增强,种子可以萌发;植酸酶活性被抑制,种子不能萌发。并说明了植酸酶与 AMY 在种子萌发过程中的协同作用。本实验结果表明人参根部与幼苗植酸酶活力在出苗期开始都比较高,说明植酸酶可能参与打破人参休眠使人参开始萌芽。根部植酸酶活力在下降之后迅速升高,其作用可能是促进幼苗的生长,具体机制有待进一步研究。

总之,5种水解酶的活力变化与人参出苗期幼苗的生长发育密切相关。随着人参的生长进程,5种水解酶的活力呈现不同规律的变化,这可作为人参出苗期幼苗形态不同阶段的生理指标。

## REFERENCES

- [1] FU Q, ZHAO L, WANG L S, et al. Ginseng germplasm analysis of the differences in different regions [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research(特产研究), 2008(3): 30-36.
- [2] XING N N, ZHAO Y, LIU H, et al. Comparison of activities of amylase, esterase, acid phosphatase in Radix Ginseng from different origins and different growth periods [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(1): 44-47.
- [3] HAO J J, KANG Z L, YU Y. Lab Technology of Plant Physiology(植物生理学实验技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 104-106.
- [4] HOU M D. Determination of plant esterase of organophosphorus pesticide residues [J]. Food Sci(食品科学), 2002, 23(7): 111-115.
- [5] WANG D. Experiment Course in Biochemistry and Clinical Biochemistry Test(生物化学和临床生物化学检验) [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2005: 151-153.
- [6] YU J Y. Biochemical Experimental Techniques(生物化学实验技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 255-258.
- [7] FAN S Q, LIANG S W. Experimental Guide of Modern Plant Physiology(现代植物生理学实验指南) [M]. Beijing: Science Press, 1999: 266.
- [8] LAN Y X, LIN P, WANG B Q, et al. Phytase activity of wheat in the germination process [J]. Feed Ind(饲料工业), 2001, 22(4): 31-32.
- [9] WEN T Q, ZHANG Y, FAN C C. The impact of phytase activity on seed germination [J]. J Hubei Univ(湖北大学学报), 1993, 15(3): 446-448.

收稿日期: 2010-11-22