

牡丹品种‘胡红’开花和衰老过程中花瓣脂肪酶活性的变化

史国安^{1,*}, 郭香凤¹, 高双成¹, 李昕¹, 李友军¹, 包满珠²

¹河南科技大学农学院, 洛阳市牡丹生物学重点实验室, 河南洛阳 471003; ²华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要: 以牡丹品种‘胡红’为材料, 采用改良铜皂法测定了牡丹花发育过程中花瓣脂肪酶活性的变化。结果表明, 牡丹花瓣粗脂肪酶作用的最适 pH 为 6.5, 最适温度为 35 ℃。OP 乳化剂提高酶活性 3.5 倍, Mg²⁺ 对酶活性没有影响。露色期(I级)脂肪酶活性和游离脂肪酸含量最高, 之后各时期酶活性逐渐下降并维持在低水平; 而游离脂肪酸含量在盛花期(V级)有一小高峰。

关键词: 牡丹; 开花和衰老; 花瓣; 脂肪酶活性

Change in Lipase Activity in Petal during Flowering and Flower Senescence of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. ‘Huhong’

SHI Guo-An^{1,*}, GUO Xiang-Feng¹, GAO Shuang-Cheng¹, LI Xin¹, LI You-Jun¹, BAO Man-Zhu²

¹College of Agriculture, Luoyang Key Laboratory of Peony Biology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; ²Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, College of Horticultural and Forestry Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: Using peony (*Paeonia suffruticosa*) cv. ‘Huhong’ as the experimental material, we investigated the change in lipase activity of petal during flowering and flower senescence by the improved copper soap method. The results indicated that the optimum pH value was 6.5 and that optimum temperature was 35 ℃ for lipase activity. OP could increase the lipase activity by 3.5-fold, but Mg²⁺ had no effect. The peaks of lipase activity and free fatty acid content occurred at bud color-occurring stage. The lipase activity kept at low level from bud soft stage to wilting, peak of free fatty acid content occurred at full opening stage.

Key words: *Paeonia suffruticosa*; flowering and flower senescence; petal; lipase activity

脂肪酶(EC 3. 1. 1. 3)属胞内酶, 可催化酯类化合物分解、合成和酯交换; 脂肪酶具有化学选择性和高度立体异构专一性, 在食品、药品、化工等行业得到广泛应用(Patel 2006)。关于植物脂肪酶的研究, 无论是在植物生理方面, 还是植物保藏方面都具有很重要的意义(夏小乐等 2008)。

脂肪酶广泛存在于各种植物体内, 在脂肪酶的作用下甘油酯水解产生游离脂肪酸和甘油。植物离体的叶、果实和种子仍含有较高的脂肪酶活力, 而且脂肪酶的活性直接影响植物的生长发育过程(李丙东等 1993)。Brown 等(1991)和 Hong 等(2000)认为, 膜结构的破坏是植物衰老的一个早期典型特征。在酯酰水解酶作用下, 从膜脂双分子层上释放出游离脂肪酸, 被乙醛酸循环的酶代谢, 能够诱导衰老过程的启动。Borochoy 等(1982)研究月季花衰老时发现, 衰老启动时酯酰水解酶活性的升高伴随着膜功能的丧失。但国内对植物花瓣中脂肪酶

的研究很少。

史国安等(1999; 2008; 2009)指出, 活性氧代谢失衡是牡丹花衰败迅速的重要原因, 其中超氧自由基起着主要作用。王荣花等(2005)研究结果表明, 牡丹开花与衰老过程中花瓣不饱和脂肪酸含量降低, 不饱和指数下降, 膜脂过氧化加剧导致细胞膜透性增加。这些结果揭示脂质代谢在牡丹开花和衰老过程中可能起着重要作用。本文研究了牡丹花瓣中脂肪酶的某些性质与活性变化, 以期阐明牡丹开花和衰老的生理基础以及切花保鲜技术提供理论依据。

收稿 2010-10-11 修定 2010-11-28

资助 国家自然科学基金项目(30740013)、河南省自然科学基金项目(0611030600)、河南省重大科技专项(091100110100)和洛阳市科技支撑计划项目(0901063A)。

* 通讯作者(E-mail: gashi1963@163.com; Tel: 0379-64283552)。

材料与方法

供试材料为牡丹品种‘胡红’(*Paeonia suffruticosa* Andr. cv. ‘Huhong’) 采自洛阳市新华丰牡丹园。在‘胡红’花立蕾后, 选择生长状况一致的花蕾做标记留做样品。于晴天上午 8:00 左右, 按史国安等(2008; 2009)的标准, 从同一花圃 6 年株龄的牡丹上采摘不同发育状态的花朵, 分别是露色期(I 级)、绽口期(II 级)、初放期(III 级)、半开期(IV 级)、盛开期(V 级)和始衰期(VI 级)。采集样品放入聚乙烯保鲜袋内保湿立即带回实验室, 拨去外层花瓣后取内层花瓣置于 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱备用。

试验所用设备仪器如下: 赛多利斯 BS-200S 型分析天平(北京塞多利斯天平有限公司); pHS-3 型数显酸度计(江苏金坛市荣华仪器制造有限公司); JY92-II 超声波细胞粉碎机(上海新芝生物技术研究所); Sigma 3K18 台式高速冷冻离心机; UV-755B 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。试验所用试剂均为化学纯或分析纯试剂。

取 3.0 g 冷冻保存的牡丹花瓣, 加 8 mL 样品提取液(含 1% 巯基乙醇, $65\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS, pH 6.5)冰浴中研磨至匀浆, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $10\ 000\times g$ 离心 30 min, 将上清液再于 $12\ 500\times g$ 离心 30 min, 上清液为粗酶提取液, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

参照高贵等(2002)和张弛等(2003)的方法进行乳化底物的制备。取 150 mL 4% 聚乙烯醇(polyvinylalcohol, PVA)和 50 mL 橄榄油, 冰浴超声波乳化 5 min, 反复 2 次, 制成乳白色的橄榄油乳化底物, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存备用。

称取 5 g 乙酸铜, 溶解于 100 mL 蒸馏水中, 过滤, 用吡啶将滤液的 pH 值调至 6.1, 得到铜显色剂。

对江慧芳等(2007)采用的铜皂法进行改进。将 1 mL 底物乳化液与 3 mL PBS 混合后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下预热后, 加入 1 mL 粗酶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 加入 5 mL 甲苯终止反应, 振荡萃取生成的游离脂肪酸, 于 $3\ 000\times g$ 离心 5 min, 取 3 mL 上层有机相加入 1 mL 显色剂反复振荡, 使产生的脂肪酸与 Cu^{2+} 结合充分, 再次离心后取上层含有脂肪酸铜的甲苯溶液在 715 nm 处测定吸光值。以未反应的做空白。用改良铜皂法分别研究反应时间、底物浓度、酶液用量、温度、pH 值以及乳化剂聚乙二醇辛基苯基醚(polyglycol octylphenyl ether, OP)和 Mg^{2+} 对脂肪

酶活性的影响。

取 1 mL 粗酶提取液, 加入 5 mL 甲苯振荡萃取游离脂肪酸, 用油酸做标准曲线, 按铜皂法测定测定花瓣中游离脂肪酸含量。可溶性蛋白质含量用紫外分光光度法测定。

实验测定重复 3~4 次, 采用 Excel 数据处理系统对数据进行统计分析。

实验结果

1 牡丹花瓣中粗脂肪酶的部分酶学性质

1.1 脂肪酶与底物生成产物的吸收光谱图

为了找出油酸铜的最大吸收波峰, 测定了油酸铜在 550~750 nm 范围内的吸光值。由图 1 可知, 反应体系在可见波长 715 nm 处有最大吸收峰(A_{715}), 可用于检测脂肪酶的活性。因此以下实验均在 715 nm 波长下比色测定脂肪酶的活性。

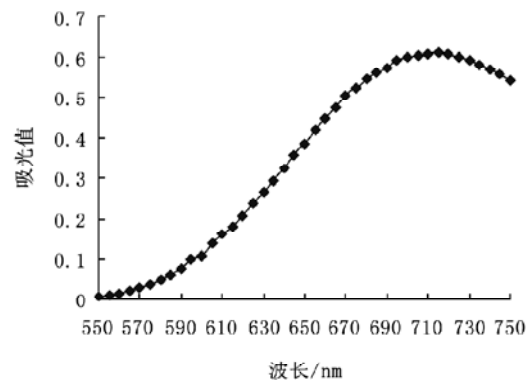


图 1 油酸铜的吸收光谱

Fig.1 Absorption spectrum of copper oleate

1.2 酶促反应时间进程

在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.5 反应条件下测定不同反应时间对应的脂肪酶活性。图 2 显示, 粗酶活性随着反应时间的延长而增大, 即反应产物脂肪酸含量的增加。根据粗酶的反应进程曲线, 60 min 以前酶活性随时间变化很快, 近似为线性关系, 60 min 后酶活性变化趋于平稳。因此, 在以后的酶活性测定过程中, 反应时间均控制在 60 min 以内, 以便测定脂肪酶的初速度。

1.3 酶液用量对粗脂肪酶活性的影响

在脂肪酶促反应体系中, 设定底物浓度的条件下, 酶活性取决于酶液的用量。0~1.0 mL 的粗酶

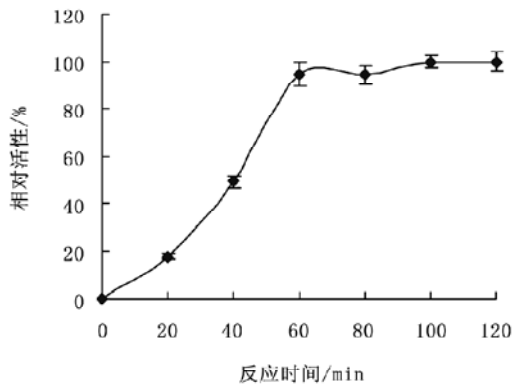


图2 反应时间对脂肪酶活性的影响
Fig.2 Effect of reactive time on lipase activity

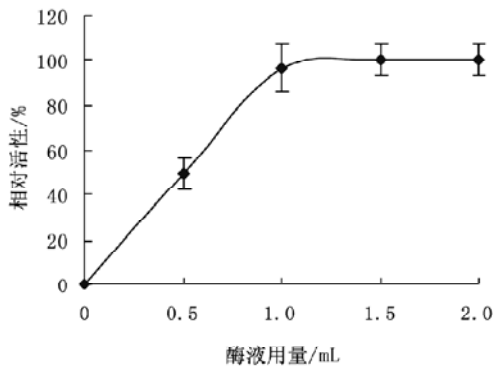


图3 酶液用量对脂肪酶活性测定的影响
Fig.3 Effect of enzyme extract volume on lipase activity determination

液用量范围内,脂肪酶活性变化呈一级反应关系,超过 1.0 mL 后酶活性趋于饱和。

1.4 温度对粗脂肪酶活性的影响

图4所示,牡丹花瓣脂肪酶在 35 °C 时活性最高,为脂肪酶的最适温度,高于或低于 35 °C 时酶活性急剧下降,15 °C 时仅有 60% 的酶活性。15 °C 至 35 °C 时,温度对牡丹花瓣脂肪酶酶促反应的加速起主导作用;但温度继续升高时,高温对酶蛋白的破坏起主导作用,脂肪酶的活性呈下降趋势,至温度更高时脂肪酶失活。

1.5 pH 值对脂肪酶活性的影响

由图5可知,牡丹花瓣脂肪酶对 pH 变化非常敏感。在一定反应体系 pH 值范围内,随着反应体系 pH 值的升高,‘胡红’花瓣脂肪酶比活也逐渐提高。但当反应体系 pH 值达到 6.5 时,脂肪酶比活就不再

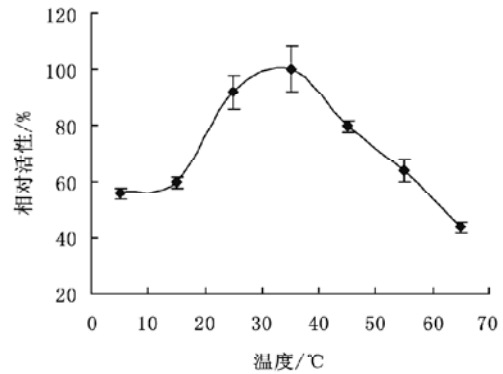


图4 牡丹花瓣脂肪酶催化反应的最适温度
Fig.4 The optimum temperature of lipase in peony petals

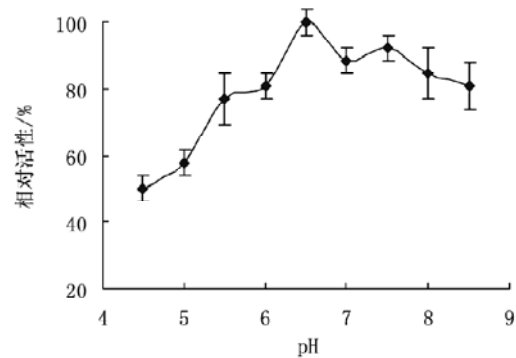


图5 牡丹花瓣脂肪酶催化反应的最适 pH
Fig.5 The optimum pH of lipase in peony petals

提高。由于脂肪酶除在 pH 6.5 附近有一活性高峰外,在 pH 7.5 附近还有一活性肩峰,因此推断在‘胡红’花瓣中脂肪酶可能有两种同工酶类型,即酸性脂肪酶和碱性脂肪酶。

1.6 乳化剂 OP 和 Mg^{2+} 对脂肪酶活性的影响

随着反应体系中乳化剂 OP 的含量增高,花瓣脂肪酶比活也逐渐提高。但当反应体系中乳化剂 OP 的含量达到 0.25% 时,脂肪酶活性出现峰值,比对照提高 3.5 倍(图 6)。表明乳化剂 OP 能够显著促进酶与反应底物的接触,从而提高脂肪酶活性。反应体系中加入 Mg^{2+} ,结果表明 Mg^{2+} 对脂肪酶的活性没有显著影响。

2 牡丹花瓣中脂肪酶活性和游离脂肪酸含量的变化

图7所示,‘胡红’花瓣脂肪酶活性在露色期(I 级)处于最高值,从绽口期(II 级)到始衰期(VI 级)酶

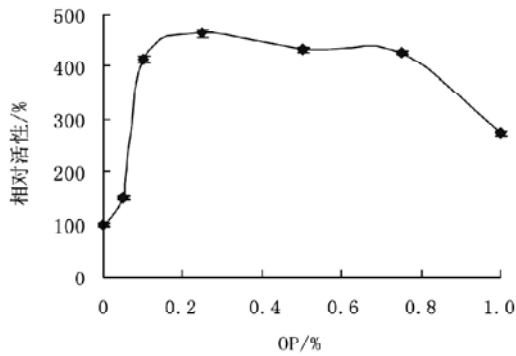


图6 乳化剂OP对脂肪酶活性的影响

Fig.6 Effect of OP on lipase activity in peony petals

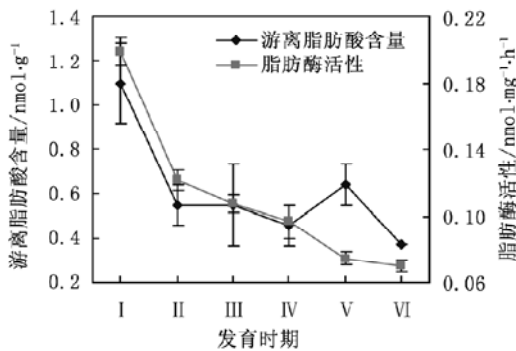


图7 牡丹开花和衰老过程中花瓣游离脂肪酸含量和脂肪酶活性的变化

Fig.7 Changes of free fatty acids content and lipase activity of peony petals during flowering and flower senescence

活性持续下降, 始衰期脂肪酶比活仅为露色期的40%左右。这是因为‘胡红’花瓣在其整个开放期间呼吸代谢十分旺盛, 要消耗大量的能量, 在露色期(I级)启用其体内储存物质-脂肪, 将脂肪分解为脂肪酸, 同时启动脂肪酶激活机制, 提高脂肪酶的活性, 在露色期(I级)较短时间内就能分解大量的脂肪, 为其整个开花期间所需能量做准备。盛花期(V级)呼吸高峰过后, 游离脂肪酸含量出现小幅回升, 始衰期(VI级)随着花瓣细胞膜系统的解体游离脂肪酸含量降到最低。说明膜脂肪代谢与开花期间的能量需求有关。

讨 论

1 牡丹花瓣中粗脂肪酶的部分酶学性质

脂肪酶是一种蛋白质, 不适宜的温度会破坏活

性部位三维结构的完整性, 而活性部位三维结构是保持酶活性的关键(王璋 1996)。牡丹花瓣中脂肪酶的最适温度为35℃左右, 温度超过35℃脂肪酶活性迅速下降。牡丹花瓣中脂肪酶的最适脂酶pH 6.5, 在pH 7.5有一肩峰, 推测牡丹花瓣脂肪酶有两种同工酶类型, 即pH 6.5酸性脂肪酶和pH 7.5碱性脂肪酶。由于脂肪酶具有明显的界面活性, 作用在反应体系的亲水-疏水界面层, 作用位点是脂肪分子的1(或3)位酯键, 乳化剂OP能够显著提高脂肪酶活性。 Mg^{2+} 对牡丹花瓣中的脂肪酶没有明显的激活作用。

2 牡丹开花和衰老过程中脂肪酶的作用

‘胡红’属于呼吸跃变型花卉, 在半开期(IV级)到盛花期(V级)出现呼吸高峰(史国安等 2011)。在牡丹开花和衰老的过程中需要消耗大量的呼吸底物, 产生足够的能量推动开花过程, 特别是花瓣的扩张生长; 花朵开放后, 花瓣细胞膜降解功能下降, 加速细胞内含物发生外撤与再分配。而膜脂降解可能是花瓣细胞死亡程序的中心步骤(van Doorn和 Woltering 2008)。我们的试验结果表明, 牡丹开花和衰老过程中超氧阴离子是引起膜脂过氧化的主要活性氧(史国安等 2008)。推测在牡丹开花和衰老过程中, 初期高活性的脂肪酶促进膜磷脂降解, 产生游离脂肪酸, 部分脂肪酸通过三羧酸途径生成糖为呼吸代谢提供底物, 另一部分脂肪酸在脂氧合酶参与下启动膜脂过氧化作用, 促使芳香物质的生产与细胞膜的降解。因此, 脂肪酶活性升高是牡丹开花和衰老的早期事件, 在活性氧信号传递体系中的重要作用值得进一步研究。

参考文献

- 高贵, 韩四平, 王智, 翁梁, 王柏婧, 冯雁, 曹淑桂, 高淑娟(2002). 脂肪酶活力检测方法的比较. 药物生物技术, 9 (5): 281~284
- 江慧芳, 王雅琴, 刘春国(2007). 三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进. 化学与生物工程, 24 (8): 72~75
- 李丙东, 项时康, 林榕辉, 朱智伟(1993). 棉花种子萌发过程中脂肪酶活性研究. 棉花学报, 5 (2): 37~44
- 史国安, 郭香凤, 包满珠(2008). 牡丹花不同发育时期脂质过氧化代谢的相关性研究. 西北农林科技大学学报, 36 (8): 183~189
- 史国安, 郭香凤, 高双成, 范丙友, 包满珠(2009). 牡丹花发育过程中花瓣抗氧化活性的变化. 园艺学报, 36 (11): 1685~1690
- 史国安, 郭香凤, 韩建国, 孙鲜明, 杨正申(1999). 牡丹开花和衰

- 老期间乙烯及膜脂过氧化的研究. 西北农业大学学报, 27 (5): 50~53
- 史国安, 郭香凤, 孔祥生, 张国海, 包满珠(2011). 呼吸速率和内源激素含量的变化与牡丹开花衰老的关系. 园艺学报, 38 (2): (出版中)
- 王荣花, 刘雅莉, 李嘉瑞(2005). 不同发育阶段牡丹和芍药切花开花生理特性的研究. 园艺学报, 32 (5): 861~865
- 王璋(1996). 食品酶学. 北京: 中国轻工业出版社, 72~122
- 夏小乐, 杨博, 王永华, 王小宁(2008). 小麦胚芽脂肪酶的研究进展. 现代食品科技, 24 (10): 1068~1070
- 张驰, 刘信平, 周大寨, 田国政(2003). 硒对花生种子萌发和脂肪酶活力的影响. 湖北农业科学, (3): 36~37
- Borochoy A, Halevy AH, Shinitzky M (1982). Senescence and the fluidity of rose petal membranes: relationship to phospholipid metabolism. *Plant Physiol*, 69 (2): 296~299
- Brown JH, Paliyath G, Thompson JE (1991). *Plant Physiology: A Treatise*. San Diego: Academic, 227~275
- Hong Y, Wang TW, Hudak KA, Schade F, Froese CD, Thompson JE (2000). An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (5): 8717~8722
- Patel RN (2006). Biocatalysis: synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Curr Org Chem*, 10: 1289~1321
- van Doorn WG, Woltering EJ (2008). Physiology and molecular biology of petal senescence. *J Exp Bot*, 59: 453~480