

EDTA 和金属离子对多聚半乳糖醛酸酶酶活力的影响及其动力学研究

刘小林^{1,3}, 伍志权², 卓怡³, 黄卓烈³

(1. 江西宜春学院 生命科学学院, 江西 宜春 336000; 2. 佛山市中南农业科技有限公司检测中心, 广东 佛山 528200; 3. 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:实验以 EDTA 和不同金属离子为效应物, 果胶为反应底物, 研究不同浓度的 EDTA, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ 和 Ba^{2+} 对多聚半乳糖醛酸酶(PG)催化活性的影响。结果表明, 一定浓度的 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对 PG 有激活作用, 对 PG 产生最大激活作用的浓度分别为 0.3 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.3 mmol/L 和 0.6 mmol/L, EDTA, Ca^{2+} , Ag^+ 和 Ba^{2+} 对 PG 有抑制作用, Na^+ 和 K^+ 对 PG 活性没有影响。动力学研究表明, 0.3 mmol/L Na^+ 和 K^+ 处理后, PG 的 K_m 和 V_{max} 基本没有发生变化, 2 mmol/L EDTA 和 0.3 mmol/L Ca^{2+} 处理后, PG 的 K_m 和 V_{max} 均下降, 0.3 mmol/L Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 处理后, PG 的 K_m 和 V_{max} 都上升, 0.3 mmol/L Ag^+ 和 Ba^{2+} 处理后, PG 的 K_m 上升, V_{max} 下降。

关键词:多聚半乳糖醛酸酶; 金属离子; 动力学

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1000-2286(2010)01-0153-06

A Study on the Effects of EDTA and Different Metal Ions on Enzyme Specific Activity of Polygalacturonase and Its Kinetics Analysis

LIU Xiao-lin^{1,3}, WU Zhi-quan², ZHUO Yi³, HUANG Zhuo-lie³

(1. College of Life Science, Yichun University, Yichun 336000, China; 2. Test Center, Foshan Zhongnan Agricultural Technology Co. Ltd., Foshan 528200, China; 3. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this experiment, EDTA and different metal ions were used as effectors, and pectin as substrate in order to study the effects of EDTA and different metal ions on enzyme specific activity of polygalacturonase (PG). The metal ions included Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ and Ba^{2+} . The result showed that the enzyme specific activity of PG increased after the treatment with certain concentrations of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} and Fe^{3+} . The concentration which caused the max activation of PG of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} and Fe^{3+} were 0.3 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.3 mmol/L and 0.6 mmol/L, respectively. EDTA, Ca^{2+} , Ag^+ and Ba^{2+} restrained the activity of PG. Na^+ and K^+ but had no effect on the activity of PG. Kinetics analysis shown that the treatment of Na^+ and K^+ with the concentration of 0.3 mmol/L had no effect on K_m and V_{max} of PG. The treatment with 2 mmol/L EDTA and 0.3 mmol/L Ca^{2+} decreased the K_m and V_{max} of PG. And after the treatment of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} and Fe^{3+} with the concentration of 0.3 mmol/L, the K_m and V_{max} of PG increased. However, the treatment of 0.3 mmol/L Ag^+ and Ba^{2+} increased the K_m of PG and decreased V_{max} of PG.

收稿日期: 2009-11-10 修回日期: 2009-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10074016)

作者简介: 刘小林(1966-)男, 副教授, 博士, 主要从事农学与生物技术研究, E-mail: LXL7519@yahoo.com.cn; *

通讯作者: 黄卓烈, 教授, E-mail: zhuolieh@scau.edu.cn.

Key words: polygalacturonase; metal ion; kinetics analysis

多聚半乳糖醛酸酶 (EC 3.2.1.15) 是降解植物果胶骨架结构的主要酶之一^[1], 能随机地从多聚半乳糖醛酸内部打开 α -1,4-糖苷键, 产生聚合度为 10~14 的寡聚半乳糖醛酸^[2], 与植物果实的软化, 脱落和种子成熟, 植物组织的抗病性有关^[3-6], 在提高果汁的出汁率、果汁的澄清、果泥的生产、净化果皮及果酒的酿造等方面具有较大的应用价值和前景^[7-9]。目前已知的酶中, 大约有 1/3 的酶蛋白需要金属离子的存在才能充分表现其活性。大部分金属离子在酶的反应过程中作为辅因子, 促进酶的反应。根据金属离子与蛋白质结合作用的大小不同, 可将金属蛋白酶分子分为两类, 包括与 Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} 等过渡态离子紧密结合的金属蛋白酶 (如烟草蔗糖酶) 和与 K^+ , Na^+ , Mg^{2+} 等碱性离子松散结合的金属蛋白酶 (如菠萝蛋白酶)。与酶紧密结合的金属离子和底物之间离子的相互作用可使底物适当定向, 以利于反应的发生或稳定带电荷的过渡态中间物; 金属离子与底物弱的相互作用可以释放少量的自由能, 与酶-底物之间的结合相似, 有利于酶与底物分子的结合。本实验以不同金属离子为效应物, 果胶为反应底物, 研究不同浓度的 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ 和 Ba^{2+} 对 PG 催化活性的影响, 以筛选出对 PG 有激活作用的金属离子。

1 材料和方法

1.1 材料

多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 为 Fluka 公司产品, 桔子果胶 (99%) 为 Sigma. 公司产品, 考马斯亮蓝 G-250: Fluka 公司产品, 其他试剂是国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质含量测定 参照 Bradford^[10]的方法, 以牛血清白蛋白为标准。

1.2.2 酶活力测定 参照王小敏等^[11]的方法进行改进, 酶促反应体系 pH4.0, 反应温度为 55 °C, 反应时间是 30 min, 采用 DNS 法测定生成的半乳糖醛酸量。在上述反应条件下, 每分钟产生 1 μg 半乳糖醛酸的酶量定义为 1 单位 PG 酶活 (U)。

1.2.3 多聚半乳糖醛酸酶的分离纯化 参照汤鸣强等^[12]的方法, 称取 1.5 g 多聚半乳糖醛酸酶粗酶溶于磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH4.0) 中, 并定容至 24 mL, 4 °C 条件下离心 (10 000 r/min, 10 min), 取上清液。在酶液中加入一定量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 使其饱和度达到 60%, 调节溶液的 pH 至 4.0, 在 4 °C 静置 12 h, 4 °C 条件下离心 (10 000 r/min, 20 min), 弃沉淀。往上清液中加入一定量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 使其饱和度达到 100%, 调节溶液的 pH 至 4.0, 在 4 °C 静置 12 h, 4 °C 条件下离心 (10 000 r/min, 20 min), 弃上清液。用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH4.0) 将沉淀溶解, 4 °C 条件下透析 12 h, 用 PEG-6000 浓缩样品。

取 6 mL 样品溶液, 用葡聚糖凝胶 (Sephadex-G75) 对样品进行凝胶层析过滤分离, 层析柱的规格是 2 cm \times 30 cm, 用 0.05 mmol/L (pH4.0) 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液进行洗脱, 流速为 1 mL/min, 在部分收集器上收集, 每管 4 mL, 检测洗脱液的蛋白质含量和酶活性, 收集合并高活性的部分。

1.2.4 不同浓度金属离子对 PG 活性的影响 将 PG 置于含有不同浓度 EDTA 和 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ , Ba^{2+} 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (0.05 mmol/L, pH 4.0) 中, 30 °C 保温 1 h 后, 参照方法 1.2.2, 测定 PG 活性, 研究不同浓度 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ 和 Ba^{2+} 中保温 1 h 对 PG 活性的影响。金属离子的浓度设置为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 mmol/L 和 1.0 mmol/L; EDTA 的浓度设为 0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mmol/L。

1.2.5 动力学参数测定 参照林建成等^[13]的方法, 将 PG 置于含有 2 mmol/L 的 EDTA 和 0.3 mmol/L Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ 和 Ba^{2+} 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (0.05 mmol/L, pH4.0), 30 °C 中保温 1 h 后, 参照方法 1.2.2, 测定 PG 活性, 以酶反应速率的倒数 (1/V) 为纵坐标, 以底物浓度的倒数 (1/S) 为横坐标, 绘制 Lineweaver-Burk 曲线, 计算出 K_m 值和 V_{\max} 值。果胶的浓度设置为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mmol/L 和 1.6 mmol/L。

2 结果分析

2.1 PG 的分离纯化结果

PG 的分离纯化过程中酶活力变化见表 1,由表 1 可知 经盐析后 酶的比活力是粗酶的 1.72 倍。经 Sephadex G75 凝胶层析柱洗脱 测定洗脱液蛋白质含量 (OD_{280nm}) 和检测洗脱液的酶活性 ,得到 2 个蛋白峰 ,第一蛋白峰基本上没有酶活性 ,蛋白质含量较低 ,第二蛋白峰蛋白质含量高 ,酶活性也高(图 1) ,酶的比活力是粗酶比活力的 3.82 倍(表 1)。

表 1 PG 的分离纯化过程中酶活力的变化

Tab.1 Diversification of enzyme specific activity during the process of purification of PG

纯化步骤 Purification step	总体积 /mL Total volumn	总蛋白 /mg Total protein	总活性 /U Total activity	比活性 / (U · mg ⁻¹) Enzyme specific activity	活力回收率 /% Retrieve rate	纯化倍数 Purification multiple
粗制酶 Coarse PG	24.00	474.86	16 640	35.04	100	1.00
硫酸铵沉淀 Salt out	6.00	110.74	6 685.2	60.38	40.17	1.72
葡聚糖凝胶 G75 Sephadex G75	6.00	34.31	4 323.2	134.20	25.90	3.82

2.2 不同金属离子对 PG 催化活性的影响

不同浓度 EDTA 对 PG 比活力的影响如图 2 所示 ,由图 2 所知 ,EDTA 对 PG 的酶活性有抑制作用 ,PG 的比活力随着 EDTA 浓度上升而下降。不同浓度碱金属离子对 PG 比活力的影响如图 3 所示。由图 3 所知 ,Na⁺ ,K⁺ 对 PG 的酶活性基本上没有影响 ,Ca²⁺ 对 PG 的酶活性有抑制作用 ,PG 的比活力随着 Ca²⁺ 浓度上升而下降。

不同浓度过渡金属离子对 PG 比活力的影响如图 4 所示。由图 4 所知 ,低浓度的 Cu²⁺ ,Zn²⁺ ,Mn²⁺ ,Fe²⁺ ,Fe³⁺ 对 PG 有激活作用 ,当 Cu²⁺ ,Zn²⁺ ,Mn²⁺ ,Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 达到一定浓度的时候 ,其对 PG 的激活程度会随 Cu²⁺ ,Zn²⁺ ,Mn²⁺ ,Fe²⁺ ,Fe³⁺ 浓度的上升而下降。Cu²⁺ ,Zn²⁺ ,Mn²⁺ ,Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 对 PG 产生最大激活作用的浓度分别为 0.3 ,0.4 ,0.3 ,0.3 和 0.6 mmol/L 酶比活力分别是 403.25 ,324.67 ,281.33 ,384.82 ,427.69 U/mg。

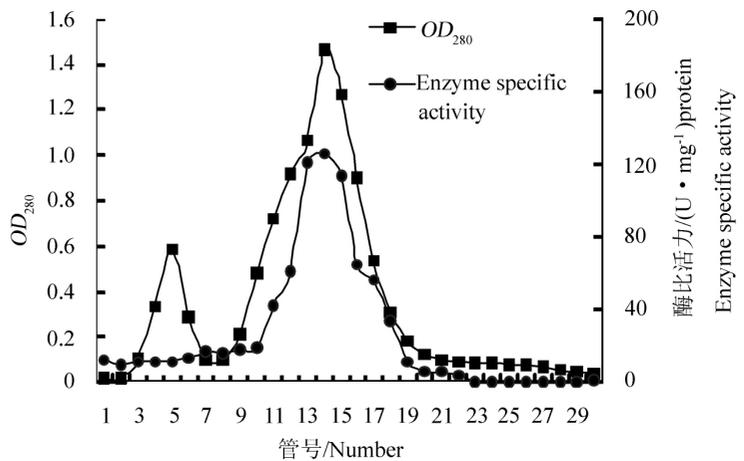


图 1 PG 的 Sephadex G-75 凝胶层析图谱(2 cm × 30 cm)

Fig.1 Elution pattern of PG on Sephadex G-75 coloume(2 cm × 30 cm)

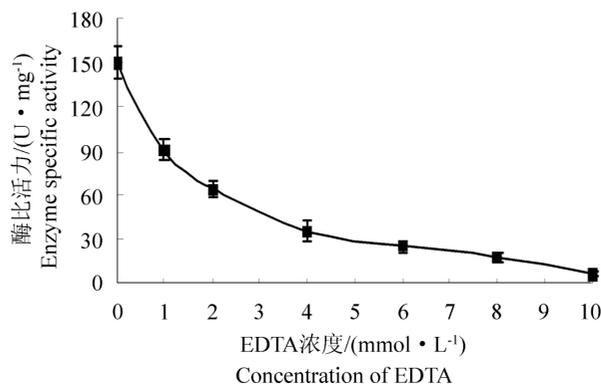


图 2 不同浓度 EDTA 对 PG 活性的影响

Fig.2 The effect of different concentration of EDTA on Enzyme specific activity of PG

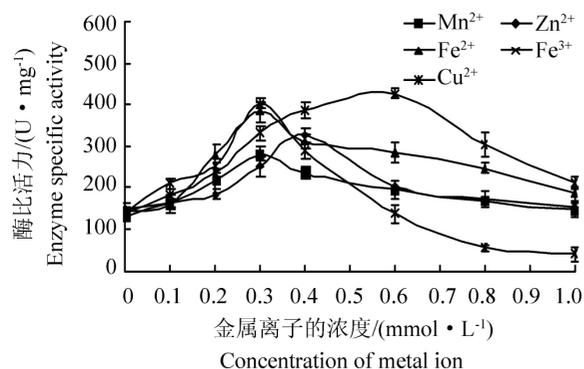
与缓冲液中保温 (134. 20 U/mg) 相比, 酶比活力分别提高 192. 27% ,118. 38% ,116. 02% , 170. 62% 和 208. 90% ,表明过渡金属离子对 PG 的激活作用有所不同。

不同浓度重金属离子对 PG 比活力的影响如图 5 所示。由图 5 所知, Ag^+ 和 Ba^{2+} 对 PG 的酶活性有抑制作用, PG 的比活力随 Ag^+ 和 Ba^{2+} 浓度的上升而下降。 Ag^+ 对 PG 的抑制作用显著于 Ba^{2+} 。

2.3 不同金属离子对 PG 动力学参数的影响

2 mmol/L EDTA 和 0.3 mmol/L 不同碱金属离子处理后 PG 的 Lineweaver - Burk 曲线如图 6 所示, 经 2 mmol/L EDTA 和 0.3 mmol/L 的 Na^+ K^+ 和 Ca^{2+} 中处理后, 根据双倒数作图法计算出 PG 的 K_m 分别为 2. 78 3. 40 ,

3. 88 和 3. 18 mg/mL, V_{max} 分别为 277. 78 500. 00 555. 56 和 344. 83 U/mg 与缓冲液相比(K_m 为 3. 68 mg/mL , V_{max} 为 526. 32 U/mg) 经 0.3 mmol/L 的 Na^+ K^+ 中处理后 K_m 和 V_{max} 基本没有发生变化, 而经 2 mmol/L



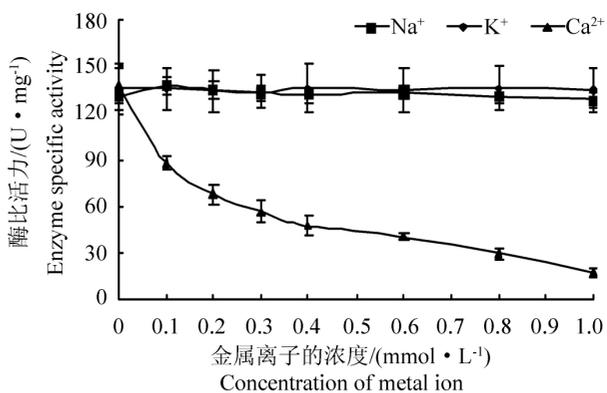
过渡金属离子种类包括: Fe^{3+} Fe^{2+} Cu^{2+} , Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 。

The kind of transition metal ion included Fe^{3+} Fe^{2+} Cu^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} .

图 4 不同浓度过渡金属离子对 PG 活性的影响

Fig. 4 The effect of different concentration of transition metal ion on Enzyme specific activity of PG

EDTA 和 0.3 mmol/L Ca^{2+} 中保温处理后, PG 的 K_m 有所下降, V_{max} 下降。表明经过 0.3 mmol/L 的 Na^+ K^+ 中处理后, PG 与底物的亲和力和最大反应速率没有发生明显改变。而经 0.3 mmol/L Ca^{2+} 中处理后, PG 与底物的亲和力有所上升, 最大反应速率大幅下降, 由此推断, EDTA 和 Ca^{2+} 引起 PG 酶活力下降主要是通过最大反应速率下降实现的。0.3 mmol/L 不同过渡金属离子处理后 PG 的 Lineweaver - Burk 曲线如图 7 所示, 经 0.3 mmol/L 的 Fe^{3+} , Fe^{2+} Cu^{2+} Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 处理后, 根据双倒

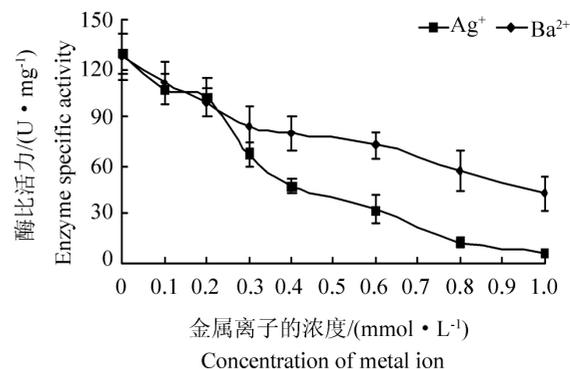


碱金属离子种类包括: Na^+ K^+ 和 Ca^{2+} 。

The kind of alkali metal ion included Na^+ K^+ and Ca^{2+} .

图 3 不同浓度碱金属离子对 PG 活性的影响

Fig. 3 The effect of different concentration of alkali metal ion on Enzyme specific activity of PG

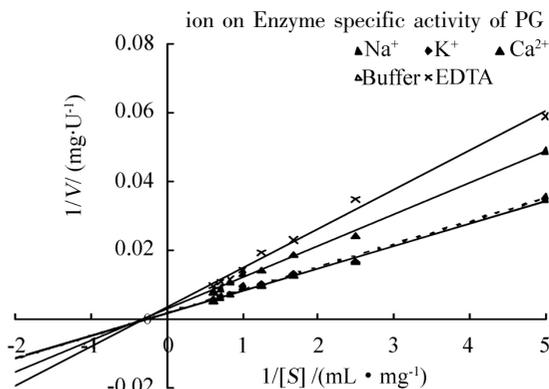


重金属离子种类包括: Ag^+ 和 Ba^{2+} 。

The kind of heavy metal ions includes Ag^+ and Ba^{2+} .

图 5 不同浓度重金属离子对 PG 活性的影响

Fig. 5 The effect of different concentration of heavy metal ion on Enzyme specific activity of PG

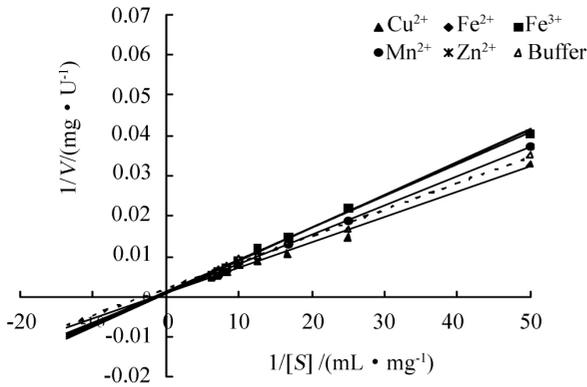


碱金属离子种类包括: Na^+ K^+ 和 Ca^{2+} 。

The kind of alkali metal ion included Na^+ K^+ and Ca^{2+} .

图 6 EDTA 和不同碱金属离子处理后 PG 的 Lineweaver - Burk 曲线

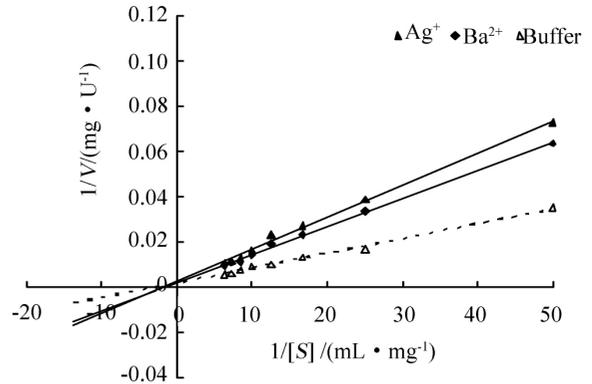
Fig. 6 The Lineweaver - Burk curves of PG after the treatment of different alkali metal ion



过渡金属离子种类包括: Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 。

The kind of transition metal ion included
 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} and Zn^{2+} .

图7 不同过渡金属离子处理后 PG 的 Lineweaver - Burk 曲线
Fig. 7 The Lineweaver - Burk curves of PG after
the treatment of different transition metal ion



重金属离子种类包括: Ag^+ 和 Ba^{2+} 。

The kind of heavy metal ion included
 Ag^+ and Ba^{2+} .

图8 不同重金属离子处理后 PG 的 Lineweaver - Burk 曲线
Fig. 8 The Lineweaver - Burk curves of PG after
the treatment of different heavy metal ion

数作图法计算求出 PG 的 K_m 分别为 7.27、10.00、8.57、6.67 和 7.48 mg/mL, V_{max} 分别为 909.09、1000、1428.57、858.32 和 705.33 U/mg, 与缓冲液相比 (K_m 为 3.68 mg/mL, V_{max} 为 526.32 U/mg), K_m 和 V_{max} 均上升, 表明经 0.3 mmol/L Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 处理后, PG 和 COS-PG 与底物的亲和力下降, 最大反应速率上升。由此推断, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 引起 PG 和 COS-PG 酶活力提高主要通过最大反应速率上升实现的。

0.3 mmol/L 不同重金属离子处理后 PG 的 Lineweaver - Burk 曲线如图 8 所示, 经 0.3 mmol/L 的 Ag^+ 和 Ba^{2+} 处理后, 根据双倒数作图法计算求出 PG 的 K_m 分别为 5.38 mg/mL 和 5.21 mg/mL, V_{max} 分别为 384.62 U/mg 和 434.78 U/mg, 与缓冲液相比 (K_m 为 3.68 mg/mL, V_{max} 为 526.32 U/mg), K_m 上升, V_{max} 均下降, 表明经 0.3 mmol/L Ag^+ 和 Ba^{2+} 处理后, PG 和 COS-PG 与底物的亲和力下降, 最大反应速率下降。由此推断, Ag^+ 和 Ba^{2+} 引起 PG 酶活力下降主要通过最大反应速率下降和对底物亲和力下降共同作用实现的。

3 讨论

在蛋白质中, 与金属离子可能配位的部位或基团是 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{ArOH}(\text{Tyr})$ 、 $-\text{OH}(\text{Ser}, \text{Thr})$ 、 $-\text{SH}(\text{Cys})$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}_2$ 和咪唑基团 (His)。-SH (Cys) 特别重要, 因为在许多酶中, 它常作为催化活性部位, 并且易受金属离子 (如 Hg^{2+} 、 Mn^{2+} 等) 的影响。张勇侠等^[14]的研究表明, EDTA 对 ACPase (猪精液酸性磷酸酶) 有抑制作用, 并认为 EDTA 由于螯合酶活性中心的金属离子而使酶活性降低, 并由此推断 ACPase 是金属酶。本研究结果表明, EDTA 对 PG 有抑制作用, 而且酶比活性随 EDTA 浓度的上升而下降, Na^+ 、 K^+ 对 PG 基本上没有影响, Ca^{2+} 对 PG 有抑制作用, 一定浓度的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 对 PG 有激活作用; 由此推断 PG 是过渡态离子紧密结合的金属蛋白酶。

PG 经 2 mmol/L EDTA 处理后, K_m 下降, V_{max} 下降, PG 与底物的亲和力上升, 最大反应速率下降。由此推断, EDTA 引起 PG 酶活力下降主要是通过最大反应速率下降实现的, 类似于反竞争性抑制。0.3 mmol/L 的 Na^+ 、 K^+ 处理后, K_m 和 V_{max} 基本没有发生变化, 表明 PG 底物的亲和力和最大反应速率没有发生明显改变。0.3 mmol/L Ca^{2+} 处理后, PG 的 K_m 有所下降, V_{max} 下降, 类似于反竞争性抑制。廖金花^[15]的研究指出, Mn^{2+} 对鲍鱼碱性磷酸酶的激活作用主要是通过 V_{max} 的增大和 K_m 值的缩小实现的, 其效应是混合型激活作用。刘映秋等^[16]认为 Cu^{2+} 对三级结构的影响可能是因为蛋白质表面存在可以结合金属离子的位点, Cu^{2+} 结合在蛋白质分子上, 导致蛋白质三级结构发生变化, 芳香族基团外露, 更加亲水或者蛋白质结构变得更加松散, 导致酶活力变化。本研究的结果表明, 0.3 mmol/L Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、

Fe^{3+} 处理后, PG 的 K_m 和 V_{max} 都上升, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 引起 PG 和 COS-PG 酶活力提高主要通过最大反应速率上升实现的。由此推断, 果胶分子首先与 PG 和 COS-PG 的结合亚基上 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 结合, 形成金属离子-酶-底物复合物, 然后进行水解作用, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 存在不利于酶分子与底物结合, 但有利于酶的催化, 表现为经 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 处理后, PG 的 K_m 和 V_{max} 值均有所上升。

PG 在提高果汁的出汁率、果汁的澄清、果泥的生产和净化果皮及果酒的酿造等方面^[17-18] 具有较大的应用价值和前景。试验表明, 一定浓度的 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 对 PG 有激活作用, 这为 PG 在食品工业上的应用将提供更广阔的前景。目前, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 等金属离子对 PG 的激活机理尚有待进一步的研究, 未来如何利用分子改造的方法提高 PG 的稳定性, 结合金属离子的激活作用, 更大程度地发挥 PG 在食品工业上的使用价值, 将是今后 PG 研究的重要课题。

参考文献:

- [1] Ronald P, Vries D, Jaap V, et al. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides [J]. *Microbiol Mol Biol R* 2001, 65(4):497-522.
- [2] Cook B, Clay R, Bergmann C, et al. Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase inhibiting proteins [J]. *Mol Plant - Microbe Interact*, 1999, 12(8):703-711.
- [3] Kristen A, Alan B. Polygalacturonases: Many genes in search of a function [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117:337-343.
- [4] Scott S, Cheng Y, Cervone F, et al. Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases [J]. *Appl Environ Microb*, 1998, 64(1):1497-1503.
- [5] David A. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening [J]. *The Plant cell*, 1999(11):2203-2216.
- [6] Pietro A, Madrid M, Caracuel Z, et al. *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus [J]. *Molecular Plant Pathol* 2003, 4(1):315-325.
- [7] 钦传光, 丹·娃伦亭娜, 丁诺·狄安娜. 果胶酶高产菌种的筛选 [J]. *中国酿造* 2000, 108(4):14-15.
- [8] Sakamoto T, Bonnin E, Thibault J. A new approach for studying interaction of the polygalacturonase inhibiting proteins with pectins [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 162(1):280-284.
- [9] 岳强, 曾新安, 于淑娟, 等. 不同果胶酶对于红葡萄酒颜色的影响研究 [J]. *酿酒* 2005(5):11-12.
- [10] Bradford R M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976(72):248-254.
- [11] 王小敏, 吴文龙, 阎连飞, 等. 分光光度计法测定果胶酶活力的方法研究 [J]. *分析检测* 2007, 28(5):227-229.
- [12] 汤鸣强, 谢必峰, 吴松刚. 黑曲霉 SL2-111 聚半乳糖醛酸酶的纯化和特性 [J]. *药物生物技术* 2005, 12(1):10-14.
- [13] 林建成, 杨文杰, 朱丽华, 等. 商品果胶酶 (*Aspergillus niger*) 的催化动力学研究 [J]. *甘肃农业大学学报* 2006, 41(1):81-85.
- [14] 张勇侠, 黄新河, 刘鑫, 等. 部分金属离子及 EDTA 对瘦肉型猪 (PIC344) 精液酸性磷酸酶活性与荧光光谱的影响 [J]. *畜牧兽医学报* 2005, 36(7):686-689.
- [15] 廖金花, 陈清西. 金属离子对鲍鱼碱性磷酸酶活性的影响 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版* 2004, 43:12-15.
- [16] 刘映秋, 杜林方, 张年辉. 金属离子等因素对蕹菜类囊体膜蛋白磷酸酯酶荧光性质的影响 [J]. *四川大学学报: 工程科学版* 2005, 35(1):74-79.
- [17] 陈松河, 林耀辉, 刘新民. 固定化果胶酶澄清果汁的条件及效果 [J]. *亚热带植物通讯*, 1996, 25(1):6-12.
- [18] 屈慧鸽, 李荣, 缪静, 等. 果胶酶对红葡萄酒主要成分的影响 [J]. *酿酒科技* 2005(1):71-73.