

羊蹄叶过氧化物酶的纯化和酶学性质研究

黄国文*

湖南科技学院生命科学和化学工程学院,永州 425199

摘要:采用磷酸缓冲液浸提法提取羊蹄叶 POD,对影响酶提取的主要因素(料液比、浸提液 pH、浸提温度和浸提时间)进行单因素实验和正交实验,用 pH 沉淀和丙酮沉淀对酶进行了纯化,并研究了其酶学性质。结果表明,羊蹄叶 POD 的最佳提取条件是料液比为 1:40,提取液 pH 为 9,浸提温度是 35 ℃,浸提时间为 30 min。调节提取液的 pH 为 5 以及用 1 倍和 0.8 倍体积的丙酮沉淀提取液时蛋白相对沉淀量多和酶的比活性大。羊蹄叶 POD 以愈创木酚和 H₂O₂ 为底物的 K_m 分别是 0.12 mmol/L 和 0.62 × 10⁻³ mmol/L。CuSO₄ 对羊蹄叶 POD 活性有激活作用,而 ZnSO₄、MgSO₄、CaCl₂、KCl 和 NaCl 对 POD 活性有抑制作用。研究证明羊蹄叶 POD 的提取和纯化方法简单有效,其酶学性质为理解羊蹄植物的生长特性和酶学应用提供依据。

关键词:羊蹄叶;过氧化物酶;分离纯化;酶学性质

中图分类号:Q5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.10.017

Purification and Enzymatic Characteristics of Peroxidases from *Rumex japonicus* Houtt

HUANG Guo-wen*

Department of Biological Sciences and Chemical Engineering, Hunan College of Science and Technology, Yongzhou, Hunan 425199, China

Abstract: In this study, peroxidases (PODs) of *Rumex japonicus* Houtt leaves were extracted and purified. Its enzymatic characteristics were studied. PODs were extracted from leaves of *Rumex japonicus* Houtt using the lixiviating method with a phosphate buffer. The main factors affecting extraction, including ratio of materials to buffer, buffer pH, extraction temperature and extraction duration, were evaluated and optimized by the single factor and L₉(3⁴) orthogonal experiment. In addition, PODs were purified using pH and acetone precipitation methods for further analysis of its enzymatic properties. The results showed that the optimal extraction conditions of PODs were as follows: ratio of materials to buffer of 1:40, pH 9, extraction temperature of 35 ℃, extraction duration of 35 min. Adjusting pH to 5 and adding 0.8 ~ 1 folds of acetone in the extraction solutions can get proteins with relatively high amount and high enzymatic activity. The obtained PODs had the K_m of 0.12 mmol/L and 0.62 × 10⁻³ mmol/L for Guaiacol and H₂O₂, respectively. Only CuSO₄ enhanced the PODs activity, while ZnSO₄, MgSO₄, CaCl₂, KCl and NaCl inhibited it. The results suggested that the extraction and purification methods of PODs were simple and effective for *R. japonicus* and laid a foundation for practical application of its enzymatic properties and for understanding the growth features of *R. japonicus*.

Key words: *Rumex japonicus* Houtt; peroxidase; isolation and purification; enzymatic characteristics

羊蹄 (*Rumex japonicus* Houtt) 生于山野、路旁、湿地,在我国分布广泛,是多年生蓼科酸膜属野生草本植物,生长茂盛,花期 3~4 月,果期 5~6 月,可作野菜食用和药用。过氧化物酶(POD)存在于动物、植物和微生物体内,是一类以血红素为辅基的氧化还原酶,一般含有 Fe 和 Cu 等金属离子,催化由过

氧化氢参与的多种物质的氧化还原反应。在植物中参与生长素代谢,调节细胞壁的生物合成,调节植物的生长和发育^[1];参与植物的抗性,包括抗干旱、抗盐碱、抗病等机能,是植物的重要保护酶之一。在植物抗病过程中,过氧化物酶积极作用,产生大量活性氧来抑制和杀死入侵的病菌。同时,它可使 O₂、H₂O₂ 等转变为活性较低的物质,消除植物体内生物氧化产生的有毒物质,使植物组织及细胞得到保护^[2];也参与果实的褐变过程,催化酚类物质、谷胱甘肽、抗坏血酸的氧化,使果皮变色。在生产实践

收稿日期:2014-04-23 接受日期:2015-07-22

基金项目:湖南省科技计划重点项目(2014NK2021);湖南省高校科技创新团队支持计划(2012-318)

* 通讯作者 Tel:86-013974633170; E-mail:huanggdax@163.com

上,外源过氧化物酶能够促进植物的生长^[3],用于酚类废水的处理^[4]和酶联免疫检测^[5]。本文采用磷酸缓冲液浸提法研究羊蹄叶中过氧化物酶的提取工艺条件及其酶学性质,为理解羊蹄植物的生长特性和酶学应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

湖南科技学院周围田间生长茂盛的羊蹄叶片。本材料对照中国高等植物图鉴^[6]和中国植物志^[7]中种的描述进行识别认定。

1.1.2 主要仪器

电子天平(津岛仪器),722B型分光光度计(上海析谱仪器有限公司),恒温水浴锅(天津比朗实验仪器制造有限公司)。

1.1.3 主要试剂

愈创木酚、 H_2O_2 、 Na_2HPO_4 、 Na_2HPO_4 、 $NaOH$ 、 HCl 等为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 羊蹄叶 POD 浸提条件研究

1.2.1.1 提取羊蹄叶 POD 的单因素实验

以 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 pH 9 为提取液,浸提时间为 30 min,浸提温度为 35 °C,料液比为 1:10 为提取酶一次的条件,变动其中的因素:料液比为 1:5、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50,0.02mol/L 磷酸缓冲液 pH 为 8、9、10、11、12,温度为 20、25、30、35、40 °C,浸提时间为 15、30、45、60 和 75 min 来提取和测定浸出酶活性,确定适合浸提因素。

1.2.1.2 正交实验

根据单因素实验确定的条件,通过 $L_9(3^4)$ 正交实验得出最佳浸提条件。

1.2.2 酶活性和蛋白质含量测定方法

用愈创木酚作为底物的比色法^[8]测定提取液的 POD 活性。以每克材料提取的 POD 在每分钟内 A470 增加 0.01 为 1 个酶活性单位(U)。用双缩脲法^[9]测定提取液的蛋白质含量,以小牛血清蛋白作蛋白标准曲线为 $Y = 0.2282X - 0.0008$, $R^2 = 0.9993$ 。

1.2.3 酶的纯化

1.2.3.1 pH 沉淀

在最佳条件下提取羊蹄叶片的蛋白质溶液,用稀盐酸调 pH 成 2、3、4、5、6,在冰水中放置半小时,

4000 rpm 离心 20 min,收集沉淀,用等量的 pH9 的磷酸缓冲液溶解后测定酶活性和蛋白质含量,计算比活力。比活力等于酶活性除以蛋白质重量(mg)。

1.2.3.2 丙酮沉淀

取最佳 pH 沉淀的蛋白经过透析后加入 0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 体积预冷(-20 °C)的丙酮,-20 °C 冰箱中静置 90 min,低温离心去沉淀,通过冷冻干燥去除丙酮,沉淀用等体积磷酸缓冲液溶解,测定蛋白含量和酶活性,计算比活力。另外,测定各阶段酶的纯度、纯化倍数和酶活性回收率。其中过氧化物酶纯度用 Rz 值表示^[10], $Rz 值 = A_{403}/A_{280}$, A_{403} 代表血红素辅基的吸收, A_{280} 代表蛋白质的吸收;纯化倍数是酶纯化过程中每个步骤获得酶的比活力与粗酶液中酶比活力的比值;酶活回收率是每个纯化步骤中的酶活性与粗酶液的酶活性的比值百分数。

1.2.4 一些化合物对酶活性的影响

在测定酶活性的反应体系中分别添加 $CuSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 、 $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 KCl 、 $NaCl$ 至终浓度 6.26、12.5、25、50、100、200、400、800 mmol/L,以煮沸的酶作为对照,测定酶活性,考察其对 POD 活性的影响。

1.2.5 POD 米氏常数的测定

取 0.04% 过氧化氢 0.25、0.5、1、1.5、2 mL,分别放入 5 个干净的试管中,配制测定酶活性方法反应体系,体系中过氧化氢浓度分别为 0.59、1.18、2.35、3.53、4.71、5.88($\times 10^{-3}$) mmol/L,测定酶的反应速度。取 0.25、0.5、1、1.5、2.0 mL 浓度为 0.05 mol/L 愈创木酚放入 5 个干净的试管中,用磷酸缓冲液补足到 3.9 mL,分别加入 1.0 mL 2% H_2O_2 和 0.1 mL 酶液,配制的愈创木酚浓度分别为 2.5、5、10、15、20 mmol/L,然后测定 POD 的反应速度,用双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法),计算 K_m 。

2 结果与分析

2.1 羊蹄叶 POD 提取条件的研究

2.1.1 料液比对 POD 活性的影响

料液比是影响酶浸出的一个重要因素(图 1A),料液比为 1:30 时 POD 的活性最大,过高或者过低酶的活性较小,这可能是料液比影响酶成分的浸出和稳定。因此选择 1:30、1:40 和 1:50 作为料液比作为优化条件。

2.1.2 提取液 pH 对 POD 活性的影响

提取液 pH 对 POD 浸出有较大影响(图 1B)。在提取液 pH9 时 POD 活性最大,说明溶液 pH 影响

酶的溶出和活性,因此选择选择提取液 pH 为 8、9 和 10。

2.1.3 浸提温度对 POD 活性的影响

浸提温度对酶活性有较大影响(图 1C),35 ℃ 时 POD 活性最高,温度过低和过高酶活性较小,说明温度过低会影响酶的浸出,温度过高会引起酶的变性而失活。因此浸提温度可以选择 30、35 和 40

℃ 作为优化条件。

2.1.4 浸提时间对 POD 活性的影响

材料浸泡时间的长短会影响酶的浸出和活性。浸提时间在 30 min 时 POD 活性最大(图 1D),浸泡材料超过 30 min 以后 POD 活性减小,说明在 35 ℃ 保温较长时间酶的稳定性降低,要么变性要么降解,因此选择 15、30、45min 作为优化条件。

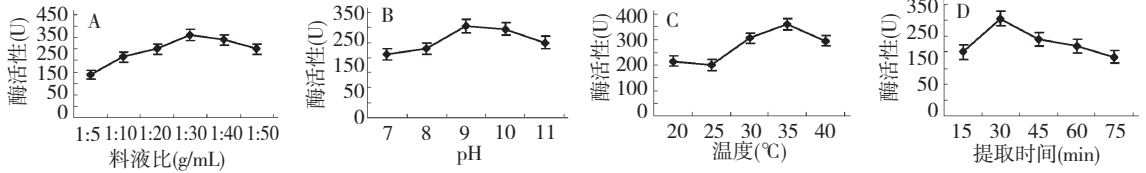


图 1 料液比 (A)、提取液 pH(B)、提取温度 (C) 及提取时间 (D) 对羊蹄叶 POD 活性的影响

Fig. 1 Effects of ratio of material to buffer (A), buffer pH (B), extraction temperature (C) and extraction duration (D) on the activity of PODs from *R. japonicas* leaves

注:图中数值表示三次测定的平均值 ± SD,下同

Note: Values were mean of three numbers ± SD. Same as below.

2.1.5 正交实验

根据料液比、提取液 pH、浸提温度、浸提时间这四个单因素实验结果,设计正交试验 $L_9(3^4)$,以浸出的 POD 活性为指标,结果和分析见表 1。由极差

分析可知,这四个因素对 POD 活性影响的程度依次是浸提时间 > 浸提温度 > 提取液 pH > 料液比,最优水平组合为料液比为 1:40,提取液 pH 为 9,浸提温度是 35 ℃,浸提时间为 30 min。

表 1 羊蹄叶 POD 提取的正交实验结果和分析

Table 1 $L_9(3^4)$ experimental results and analysis of extracting PODs from *R. japonicus* leaves

实验号 No.	料液比 Ratio of material to buffer (g/mL)	pH	浸提温度 Extraction temperature (°C)	浸提时间 Extraction duration (min)	酶活性 Enzymatic activity (U)
1	1:20	8	30	15	330.27
2	1:20	9	35	30	480.6
3	1:20	10	40	45	257.19
4	1:30	8	35	45	280
5	1:30	9	40	15	280
6	1:30	10	30	30	260
7	1:40	8	40	30	425
8	1:40	9	30	45	300
9	1:40	10	35	15	425
k1	362.02	345.09	296.76	345.09	
k2	273.33	353.53	395.2	388.53	
k3	383.33	320.06	326.73	285.47	
极差 R	21.31	33.47	98.44	103.47	
最佳水平 Optimal level	3	2	2	2	

2.2 pH 沉淀对羊蹄叶 POD 的影响

在最佳条件下提取 1 g 羊蹄叶片 POD 的溶液。用 1 mol/L HCl 调节其溶液为酸性 pH 值,经过离

心,收集沉淀测定了蛋白沉淀量,用等体积 pH 9 缓冲液溶解沉淀后测定酶的活性(图 2)以及比活力(图 3),结果显示,在 pH 为 4、5、6 时蛋白沉淀量较

高,在 pH5 时酶活性最大;酶的比活力可以作为酶纯度的度量指标,POD 酶的比活力在 pH2、pH3 和 pH5 时较大,说明这三种提取液中酶的纯度较高,但由于沉淀蛋白质的数量 pH5 时较多,重量为 1.69 mg,所以调节提取液 pH 为 5 时的沉淀蛋白质可以用于进一步纯化 POD 酶。

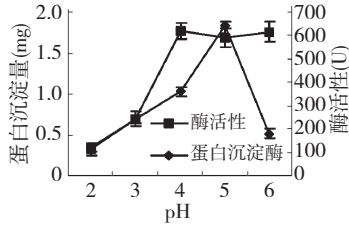


图 2 不同 pH 影响蛋白沉淀量和酶活性

Fig. 2 Effects of pH values on protein precipitation amount and enzymatic activity

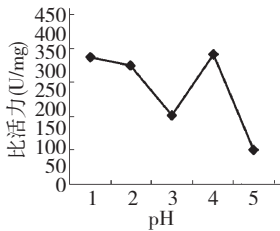


图 3 不同 pH 沉淀的酶比活力

Fig. 3 The specific activity of POD precipitated by different pHs

2.3 丙酮沉淀对羊蹄叶 POD 酶的影响

羊蹄叶 1 g 的提取液经过 pH5 沉淀获得的蛋白质,用 pH9 的磷酸缓冲液溶解,4 °C 透析一夜,透析液中加入不同体积的-20 °C 预冷的丙酮,放入-20 °C 冰箱中沉淀 1.5 h,4500 rpm 离心 15 min,收集沉淀,测定蛋白质重量,溶解沉淀经过透析后测定吸光度的变化,计算酶的活性(图 4)和比活力(图 5)。结果表明,随着丙酮体积的增加蛋白质沉淀量逐渐增

高,POD 活性在 1 倍体积的丙酮沉淀后最高,酶的比活性在 0.8 和 1 倍体积的丙酮沉淀后较高,说明用 1 倍和 0.8 体积的丙酮分级沉淀的 POD 比活力较高,纯度较好。

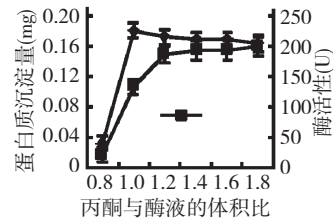


图 4 丙酮调节蛋白沉淀量和酶活性

Fig. 4 Acetone adjusting protein precipitation amount and enzymatic activity

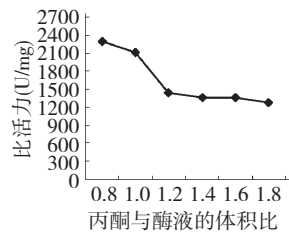


图 5 不同体积的丙酮沉淀的酶比活力

Fig. 5 The specific activity of POD precipitated by different volumes of acetone

为了研究羊蹄叶 POD 酶学性质,大量提取和纯化了 POD。称取材料 50 g,用 200 mL pH9.0 的磷酸缓冲液提取了过氧化物酶的粗酶液。粗酶液依次经过 pH5.0 沉淀和 1 倍体积的丙酮沉淀纯化了该酶,纯化结果分析见表 2。可知,50 克羊蹄叶经过 pH 沉淀和丙酮沉淀后获得 5.3 mg 的过氧化物酶,纯化倍数为 4.8,回收率为 40.8%;丙酮沉淀比 pH 沉淀的酶的纯度更高。把丙酮沉淀的过氧化物酶溶解于 100 mL pH9.0 的磷酸缓冲液中经过透析后用于其酶学性质研究。

表 2 羊蹄叶 POD 纯化过程和结果分析

Table 2 Purification processes and results of PODs from *R. japonicus*

	总酶活 Total activity (U)	总蛋白 Total protein content (mg)	比活力 Specific activity (U/mg)	R _Z Purity quotient	纯化倍数 Purification fold	回收率 Recovery (%)
粗酶液 Crude enzyme solution	27538.97	62.35	441.67	0.053	1	100
pH 沉淀 pH precipitation	15284.13	21.24	719.92	0.102	1.63	55.5
丙酮沉淀 Acetone precipitation	11235.9	5.3	2119.99	0.431	4.8	40.8

2.4 一些化合物对酶活性的影响

测定一些化合物对已经纯化的羊蹄叶 POD 活性影响(图6)。结果表明:随着 CuSO_4 浓度的增加,过氧化物相对活性增加,说明 CuSO_4 对羊蹄叶 POD 活性有激活作用; ZnSO_4 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、 KCl 、 NaCl 等化合物在各种浓度条件下 POD 酶活性(小于 250U)都低于正常提取条件下的酶活性,说明这些化合物对酶活性有抑制作用。

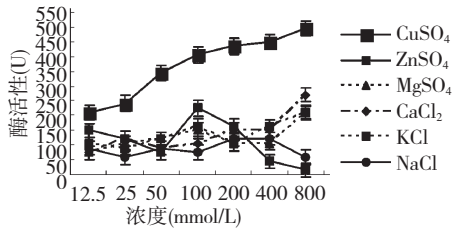


图6 一些无机盐对羊蹄叶 POD 活性的影响

Fig. 6 Effects of inorganic salts on the POD activity in *R. japonicas* leaves

2.5 POD 米氏常数的测定

在测定 POD 的反应体系中,研究 H_2O_2 和愈创木酚对 POD 的影响。随着愈创木酚浓度的增加,酶活性增加呈现先上升较快后上升缓慢的曲线(图7)。以酶活性快速增加的愈创木酚浓度(2.5 ~ 10 mmol/L),单位时间内 A470 的变化值作为反应速度,用双倒数作图,计算其 K_m 为 0.12 mmol/L。随着 H_2O_2 浓度的增加,酶活性先逐渐增加后逐渐减少(图8),说明高浓度 H_2O_2 能够氧化和破坏 POD 从而抑制酶的活性。以 POD 酶活性增加的 H_2O_2 浓度($0.59 \times 10^{-3} \sim 5.88 \times 10^{-3}$ mmol/L)的倒数和反应速度的倒数作图,计算其 K_m 为 0.62×10^{-3} mmol/L。POD 以过氧化氢为底物的米氏常数远远小于以愈创木酚为底物的米氏常数,所以 POD 对过氧化氢的亲合力远远大于对愈创木酚的亲合力。

3 讨论

本文研究了用碱性缓冲溶液提取羊蹄叶中

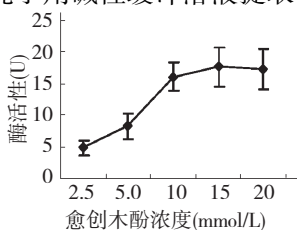


图7 愈创木酚浓度对 POD 活性的影响

Fig. 7 Effects of guaiacol on the POD activity

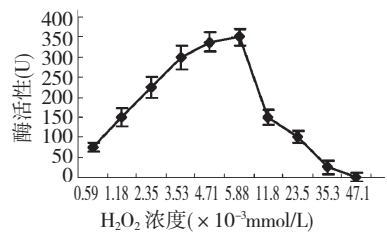


图8 H_2O_2 浓度对羊蹄叶 POD 活性的影响

Fig. 8 Effects of H_2O_2 on the POD activity

POD 的过程,确定了最佳提取工艺条件。研究了酸性 pH 和丙酮沉淀 POD 的作用,确定了纯化方案,并研究了其酶学性质。目前,已报道的提取植物 POD 的方法中,采用酸性磷酸缓冲液^[11,12]或中性偏碱性磷酸缓冲液^[13,14]来抽提 POD。根据自然界中 POD 的等电点有酸性、中性和碱性^[13],本文用碱性缓冲液提取羊蹄叶 POD。通过单因素实验和正交实验表明,羊蹄叶 POD 的最佳提取条件为料液比为 1:40,提取液 pH 为 9,浸提温度是 35 °C,浸提时间为 30 min。这些因素对提取 POD 的影响程度依次是浸提时间 > 浸提温度 > 提取液 pH > 料液比。通过对提取液 POD 的纯化表明,在调节提取液 pH5 时,沉淀的蛋白质量多和酶的比活力大;用丙酮沉淀时,以 1 倍体积的丙酮沉淀的 POD 的量较多,酶的比活力较大,所以可以用 pH5 和 1 倍体积的丙酮来纯化提取液的 POD,用 0.8 倍体积丙酮可以进一步纯化提取的 POD。POD 能催化过氧化氢氧化多种酚类物质并形成褐色产物^[12]。用不同浓度的愈创木酚与羊蹄叶 POD 在常温、pH9 的条件下反应,测得羊蹄叶 POD 的 K_m 值为 0.12 mmol/L;它比富士苹果 POD 的 K_m (129.09 mmol/L)^[11] 数值小,比冬枣果实 POD 的 K_m (0.2516 mol/L)^[15] 小很多,说明羊蹄叶 POD 氧化酚类物质的能力比富士苹果 POD 的氧化能力强,比冬枣果实 POD 氧化能力更强;用不同浓度的过氧化氢与羊蹄叶 POD 在同样条件下反应,测得羊蹄叶 POD 的 K_m 值为 0.62×10^{-3} mmol/L;它比甘蔗苗 POD 的 K_m (0.038 mol/L)^[12] 和莲藕 POD 的 K_m (9 mmol/L)^[14] 以及芦荟 POD 的 K_m (34 mmol/L)^[16] 要小很多,说明羊蹄叶 POD 氧化 H_2O_2 的能力比芦荟 POD 和甘蔗苗 POD 以及莲藕 POD 的氧化能力要大得多。不同化合物对羊蹄叶片 POD 的活性有影响。其中, CuSO_4 对羊蹄叶片 POD 活性有激活作用; ZnSO_4 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、 KCl 和 NaCl 对

POD 活性有抑制作用。

由于羊蹄叶 POD 对 H_2O_2 非常敏感,可以防止 H_2O_2 对植物的损伤,并且它的活性受到多种无机盐的抑制,所以可以用于植物的水培生根和幼苗生长。羊蹄叶中 POD 能催化 H_2O_2 氧化一些多酚类物质合成木质素促进植物生长,同时羊蹄叶中 POD 对 H_2O_2 的亲合力远远大于对愈创木酚的亲合力,说明这种酶可以用于在逆境中植物或者组织块的生长来保护植物组织。本文研究羊蹄叶片 POD 的分离纯化和其酶学性质,对理解羊蹄植物的在冬天能够正常生长的习性具有重要的意义并进一步运用其酶学性质奠定了基础。

参考文献

- 1 Yuan MD (原牡丹), Su Y (苏艳), Hou ZX (侯智霞), *et al.* Changing characteristics of auxin and the relative enzymes during the process of strawberry fruit development. *J Beijing For Univ* (北京林业大学学报), 2009, 31:169-175.
- 2 Jiang XL (蒋选利), Li ZQ (李振岐), Kang ZS (康振生). The recent progress of research on peroxidase in plant disease resistance. *J Southwest A&F Univ, Nat Sci* (西北农林科技大学学报, 自科版), 2001, 29:124-129.
- 3 Li JJ (李建军), Wang L (王琳), Li XJ (李小娟), *et al.* Effects of the Radish peroxidase on the growth in tomato seedling. *J Henan Norm Univ, Nat Sci* (河南师范大学学报, 自科学), 2006, 34:132-135.
- 4 Zhang LH (张丽华), Xue WH (薛万华), Bai PY (白培万), *et al.* Application of peroxidase in phenolic wastewater pollution control. *J Shanxi Datong Univ, Nat Sci* (山西大同大学学报), 2009, 25(6):44-47.
- 5 Gong FC, Liu P, Lin YY, *et al.* An enzyme-catalyzed reaction system using puerarin as substrates for Horseradish peroxidase and its application in immunoassays. *Acta Chim Sin*, 2012, 70:859-863.
- 6 Institute of Botany of the Chinese Academy of Sciences (中国科学院植物研究所). *Iconographia Cormophytorum Sini-*

corum Tomus I (中国高等植物图鉴 I). Beijing: Science Press, 1972. 571.

- 7 Flora of China Editorial Committee (中国科学院中国植物志编辑委员会). *Flora of China* (中国植物志). Beijing: Science Press, 1998, 25:156.
- 8 Xiao LT (萧浪涛), Wang SG (王三根). *Technique of Plant Physiology Experiments* (植物生理学实验技术). Beijing: China Agricultural Press, 2005. 103-104.
- 9 Chen JH (陈钧辉), Li J (李俊), Zhang TP (张太平), *et al.* *Biochemistry Experiments, the Fourth Edition* (生物化学实验, 第四版). Beijing: Science Press, 2008. 18-21.
- 10 Xu ZY (徐芝勇), Yan Q (严群), Qiang Y (强毅), *et al.* Purification and enzymology property investigation on soybean peroxidase. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报), 2006, 21(2):82-85.
- 11 Wang Q (王倩), Liu W (刘伟), Liu CM (刘成梅), *et al.* Characterization and effect of dynamic high-pressure microfluidization on peroxidase from fuji apple. *Food Machine* (食品与机械), 2011, 2:4-7.
- 12 He P (何平), Shi WP (施伟平), Fu XL (傅雪琳), *et al.* The purification of peroxidase from sugarcane seeding and its characteristic. *J Shanghai Jiaotong Univ, Agric Sci* (上海交通大学学报, 农科版), 2003, 21(2):131-134.
- 13 Ding XY (丁薪源), Cao JK (曹建康). Characteristics of peroxidase from fruit and vegetable research progress. *Food Sci Tech* (食品科技), 2012, 37(10):62-66.
- 14 Que RQ (阙瑞琦), Zhang LL (张丽丽), Guo XL (郭小路), *et al.* Isolation, purification and properties of peroxidase from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertnl) root. *J Southwest Univ, Nat Sci* (西南大学学报, 自科版), 2007, 29(12):63-67.
- 15 Ding XY (丁薪源), Zhou NN (周娜娜), Zhao YM (赵玉梅), *et al.* Characteristics of peroxidase from *Zizyphus jujuba* Mil. *Food Sci Tech* (食品科技), 2012, 4:31-34, 39.
- 16 Zhu H (朱鸿), Li XY (李想韵), Deng Y (邓玉), *et al.* Isolation, purification and enzymological characterization of catalase from Aloe. *Food Sci* (食品科学), 2010, 31:206-210.

(上接第 1830 页)

- 32 Huang W, *et al.* Ellagic acid from acorn fringe by enzymatic hydrolysis and combined effects of operational variables and enzymes on yield of the production. *Biores Technol*, 2008, 99:1518-1525.
- 33 Antonio AC, *et al.* Ellagic acid production from biodegradation of creosote bush ellagitannins by *Aspergillus niger* in solid state culture. *Food Bioproc Technol*, 2009, 2:208-212.

- 34 Gu YX (顾宇翔), *et al.* Analysis and application of ellagic acid in cosmetics. *China Surf Deter Cosm* (日用化学工业), 2013, 43:144-147.
- 35 Wang H (王红). 鞣花酸开发前景看好. *App Sci Technol* (应用科技), 2000, 27(2):36-36.
- 36 Zheng GY (郑光耀), *et al.* Application of subcritical water extraction in the field of plant extractives. *Chem Ind Forest Prod* (林产化学与工业), 2010, 30:108-114.