

# 韭菜过氧化物酶的分离纯化及性质

敬海明, 邓 玉, 成丽丽, 赵 芯, 刘玉杰, 唐云明\*

(西南大学生命科学学院, 重庆市甘薯工程研究中心, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

**摘 要:** 经匀浆、抽提、硫酸铵分级沉淀、CM-Sepharose 离子交换层析、Superdex-200 凝胶过滤层析, 获得电泳纯的韭菜过氧化物酶(POD)。该酶比活力达到 14031.41U/mg, 纯化倍数为 102.96, 回收率为 10.85%。该酶分子质量约为 28.4kD, 最适温度 40℃、最适 pH 值为 4.6。该酶在 20~40℃以及 pH 4.0~8.0 有较好的稳定性, 在最适条件下测得其  $K_m$  值为 18.15mmol/L。低浓度草酸、 $Zn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  等对该酶有较强激活作用; 甲醇、乙醇、异丙醇、SDS、抗坏血酸(AsA)以及  $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  等对该酶有较强的抑制作用。

**关键词:** 韭菜; 过氧化物酶; 分离纯化; 性质

## Isolation, Purification and Characterization of Peroxidase from Chinese Chives

JING Hai-ming, DENG Yu, CHENG Li-li, ZHAO Xin, LIU Yu-jie, TANG Yun-ming\*

(Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Chongqing Sweet-potato Engineering Research Center, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** Electrophoresis-pure peroxidase (POD) from Chinese chives was obtained after sample homogenization, extraction, ammonium sulfate precipitation, CM-Sepharose chromatography and Superdex-200 gel filtration. The purified POD had an activity of 14031.41U/mg. The purification factor was 102.96 and the recovery rate was 10.85%. The molecular weight of this enzyme was 28.4 kD, the optimum temperature and pH were 40 °C and 4.6, respectively. The POD enzyme was stable under 20–40°C and pH 4–8. The  $K_m$  of this enzyme was determined to be 18.15 mmol/L under optimum conditions. Its activity could be strongly activated by low concentrations of oxalic acid,  $Zn^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ , but inhibited by methanol, ethanol, isopropanol, SDS, ascorbic acid,  $Mn^{2+}$  and  $Fe^{3+}$ .

**Key words:** Chinese chives; peroxidase; isolation and purification; characterization

中图分类号: Q554.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)15-0226-05

过氧化物酶(peroxidase, POD)是一类以血红素为辅基的氧化酶, 在生物界中广泛存在, 主要催化  $H_2O_2$  和有机过氧化物对多种有机物和无机物的氧化作用<sup>[1]</sup>。作为一种抗氧化剂, 参与了细胞木质化, 生长激素的氧化, 次生物质代谢、植物防卫反应等多种生理过程<sup>[2-4]</sup>, 该酶现已广泛的应用于环保、食品工业、医学诊断、生物传感器等行业<sup>[5-8]</sup>。目前, 该酶主要来源于辣根中, 且国内该酶大部分来源靠进口, 因此寻找低成本来源的 POD 尤为重要。

韭菜(*A. tuberosum* Rott, ex Spr.)属百合科多年草本植物, 来源广泛, 四季均可取材, 且又含有挥发油及硫化物, 具有良好的药用价值。故本实验主要从韭菜中分离纯化 POD 并研究其部分酶学性质, 以期为

该酶的来源及进一步研究和韭菜的综合开发利用提供科学参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

韭菜购自重庆市北碚区天生丽街永辉超市。

CM-Sepharose、Superdex-200、凝胶过滤层析分子质量标准品、蛋白质 SDS-PAGE 标准品 美国 GE 公司; 丙烯酰胺和甲叉-双丙烯酰胺 瑞士 Fluka 公司; 其余试剂都为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

GL-21M 高速冷冻离心机 湖南湘仪仪器有限公司; UV-2550 型分光光度计 日本岛津公司; AKTA prime

收稿日期: 2011-07-28

基金项目: 重庆市科委重点攻关项目(CSTC2011AB1027)

作者简介: 敬海明(1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail: jinghming@163.com

\* 通信作者: 唐云明(1960—), 男, 教授, 博士, 主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail: tbright@swu.edu.cn

plus 蛋白质纯化系统 美国 GE 公司; 冷冻干燥仪 德国 Uni Equip 公司; 垂直板电泳槽、电泳仪 美国 Bio-Rad 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 粗酶液的提取

新鲜韭菜, 用双蒸水清洗, 擦干, 称质量后剪碎, 按 1:2(m/V) 的比例加入预冷的 0.05mol/L pH7.2 的磷酸盐缓冲液, 匀浆后 4℃ 条件下静置抽提 2h; 然后在 4℃ 条件下 10000r/min 离心 30min, 取上清液; 加入硫酸铵至 35% 饱和度, 4℃ 静置 2h 后, 10000r/min 离心 20min, 收集上清液; 再加入硫酸铵至 70% 饱和度, 4℃ 盐析 2h, 10000r/min 离心 20min, 取沉淀, 用提取缓冲液将其全部溶解, 在 4℃ 条件下透析即得粗酶液<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.2 CM-Sepharose 层析

经 0.05mol/L 磷酸缓冲液(pH6.0)平衡层析柱后, 上样粗酶液 10mL, 用 0~1mol/L 的 NaCl 溶液(含 0.05mol/L、pH6.0 的磷酸缓冲液)进行线性梯度洗脱, 流速 0.5mL/min, 每管收集 5mL; 测定各管酶活性和蛋白含量, 收集活性较高的酶液, 透析脱盐, 冷冻干燥后进行凝胶过滤。

#### 1.3.3 Superdex-200 层析

取上述酶液 3mL 上样于 Superdex-200 层析柱, 用提取缓冲液洗脱, 流速 0.3mL/min, 每管收集 3mL; 测定每管酶活性和蛋白含量; 收集活性较高的酶液, 透析脱盐冷冻干燥后, 于 -20℃ 冰箱保存备用。

#### 1.3.4 POD 纯度鉴定以及分子质量测定<sup>[10]</sup>

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯度鉴定, 12% 分离胶、5% 浓缩胶, 加样量 10μL。经 SDS-PAGE 和凝胶过滤层析测定其分子质量。

#### 1.3.5 蛋白质含量的测定

采用紫外分光光度法和 Bradford 法(考马斯亮蓝染料法)测定<sup>[11]</sup>。

#### 1.3.6 POD 活性的测定

按照陈贻竹等<sup>[12]</sup>的方法进行。测定体系为 3mL, 其中含 2.775mL 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)、0.1mL 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.1mL 4% 愈创木酚。加入 0.025mL 酶液后开始反应, 在 25℃ 条件下记录 470nm 波长处 2min 内光密度(OD)值的变化值。一个酶活力单位(U)定义为: 在测定条件下每分钟引起 OD 值改变 0.01 所需的酶量。

#### 1.3.7 POD 性质的研究<sup>[9,13]</sup>

##### 1.3.7.1 POD 最适温度和最适 pH 值

分别在不同温度(20~70℃)和不同 pH 值(2.2、3.0、4.0、4.6、5.0、5.6、6.0、7.0、8.0)的条件下测定酶活力。二者均以最适条件下测得的酶活力作为 100%, 其余各条件下测得的酶活力分别与之相比即得相对酶活力。

##### 1.3.7.2 POD 热稳定性和 pH 值稳定性

分别将酶液放置在不同温度(20~60℃)和不同 pH 值(2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)条件下, 每隔 1h 测定该酶液的活力。温度稳定性以 25℃ 的酶活力为 100%, pH 值稳定性以 pH 7.0 的酶活力为 100%, 其余温度和 pH 值条件下测得的酶活力分别与之相比即得相对酶活力。

##### 1.3.7.3 米氏常数(K<sub>m</sub>)的测定

在最适温度和最适 pH 值条件下, 以不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.01、0.02、0.03、0.04、0.05mol/L)为底物, 测定 POD 的活力, 采用双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法)<sup>[10]</sup> 求出该酶的 K<sub>m</sub> 值。

##### 1.3.7.4 不同有机溶剂对 POD 活性的影响

分别将甲醇、乙醇、异丙醇这 3 种有机溶剂与缓冲液和酶液混合, 混合后体积分数分别为 10%、20%、30%、40%、50%, 在 25℃ 条件下作用 30min, 再测定 POD 活力, 以不加有机溶剂时的酶活力为 100%。

##### 1.3.7.5 不同化合物对 POD 活性的影响

分别将 NaCl、AsA、SDS、KSCN、尿素、草酸配成 100mmol/L 母液, 再按一定比例分别与缓冲液和酶液混合, 混合后终浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05mol/L, 在 25℃ 条件下作用 30min, 再测定 POD 活力, 以不加化合物时的酶活力为 100%。

##### 1.3.7.6 不同金属离子对 POD 活性的影响

分别将各种金属离子配成 100mmol/L 母液, 再按一定比例分别与缓冲液和酶液混合, 混合后终浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05mol/L, 在 25℃ 条件下作用 30min, 再测定 POD 活力, 以不加金属离子时的酶活力为 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 韭菜 POD 的分离纯化

粗酶液经 CM-Sepharose 层析后, 所得的结果如图 1 所示, 表明杂蛋白和 POD 达到了较好的分离效果, 收集活性峰, 透析冷冻干燥后经 Superdex-200 层析, 结果如图 2 所示。酶的整个分离纯化结果如表 1 所示, 该酶的回收率较低, 还需优化实验条件进一步提高其纯度。

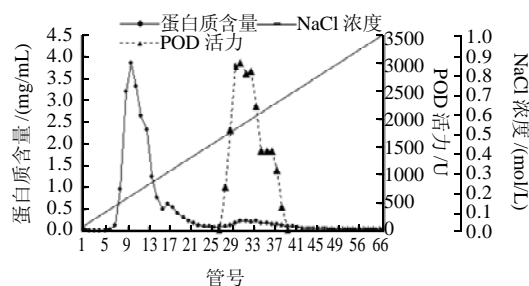


图1 韭菜 POD 的 CM-Sepharose 离子交换层析  
Fig.1 Elution profile of POD from Chinese chives on CM-Sepharose column

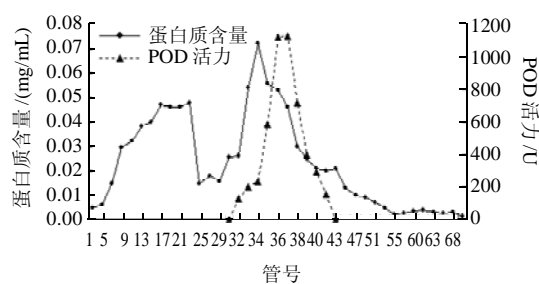


图2 韭菜 POD 的 Superdex-200 凝胶过滤层析

Fig.2 Elution profile of POD from Chinese chives on Superdex-200 column

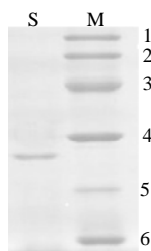
表1 韭菜过氧化物酶的纯化

Table 1 Summary of separation and purification of POD from Chinese chives

纯化步骤	总蛋白/mg	酶总活力/U	酶比活力/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
匀浆后离心	2325.30	316895.00	136.28	100.00	1.00
硫酸铵沉淀	1110.00	161549.00	145.54	50.98	1.07
CM-Sephrose	47.82	102728.40	2148.33	32.42	15.76
Superdex-200	2.45	34376.95	14031.41	10.85	102.96

## 2.2 韭菜 POD 分子质量

收集图2活性峰,透析冷冻干燥后样品经SDS-PAGE,显示为单一条带(图3),说明该POD样品已达到电泳纯。测得其亚基相对分子质量约为28.4kD;通过Superdex-200凝胶过滤层析测得的全酶相对分子质量约为29kD,由此基本上可断定韭菜POD是由单一亚基组成,与大多数文献报道相符<sup>[9,14-20]</sup>。



M. 分子质量标准品; S. 韭菜过氧化物酶 28.4kD; 1. 兔磷酸化酶 B 97.0kD; 2. 牛血清蛋白 66.0kD; 3. 鸡卵清蛋白 45.0kD; 4. 牛碳酸酐 30.0kD; 5. 大豆胰蛋白酶抑制剂 20.1kD; 6.  $\alpha$ -牛乳清蛋白 14.4kD。

图3 韭菜 POD 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE of purified POD from Chinese chives

## 2.3 韭菜 POD 的部分理化性质研究

### 2.3.1 韭菜 POD 最适温度和热稳定性

由图4可知,韭菜POD的最适反应温度为40℃。由图5可知,在20~40℃韭菜POD有较好的热稳定性,保温5h后剩余活力仍有轻微的激活作用,但在温度超过50℃保温1h后,酶活力丧失达60%以上,此后变化不大。

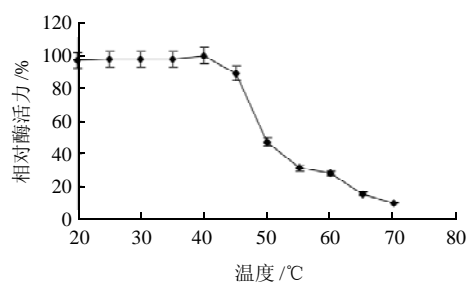


图4 温度对韭菜 POD 活力的影响

Fig.4 Effect of temperature on the activity of POD from Chinese chives

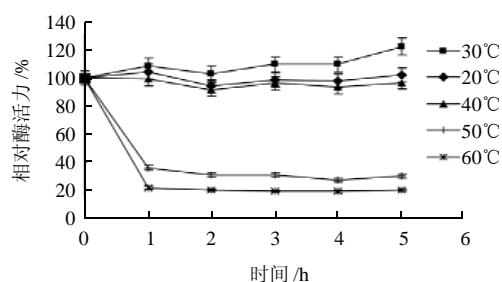


图5 韭菜 POD 的热稳定性

Fig.5 Thermal stability of POD from Chinese chives

### 2.3.2 韭菜 POD 最适 pH 值和 pH 值稳定性

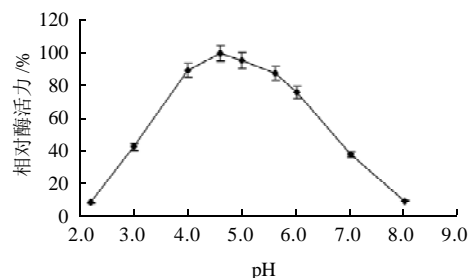


图6 pH 值对韭菜 POD 活力的影响

Fig.6 Effect of pH on the activity of POD from Chinese chives

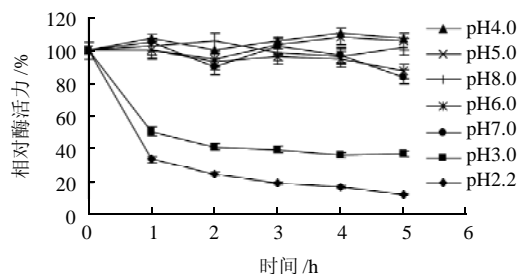


图7 韭菜 POD 的 pH 值稳定性

Fig.7 pH stability of POD from Chinese chives

由图6可知,韭菜POD的最适反应pH值为4.6。由图7可知,在pH4.0~8.0的环境下,稳定性较好,但pH值低于3.0及以下,放置1h后酶活力会丧失50%以上,随后变化趋势逐渐减缓。

### 2.3.3 韭菜 POD 米氏常数的测定

采用双倒数作图法(图 8), 在最适作用条件下, 用韭菜 POD 催化不同浓度(0.01~0.05mol/L)的  $\text{H}_2\text{O}_2$  与愈创木酚反应, 测定 POD 活力, 从而求得该酶的  $K_m$  值为 18.15mmol/L。

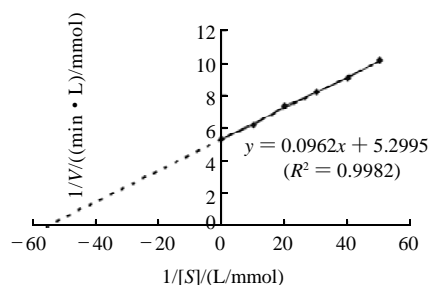


图 8 双倒数法测韭菜 POD 的米氏常数

Fig.8 Lineweaver-Burk plot for  $K_m$  determination of POD from Chinese chives

### 2.3.4 不同有机溶剂对韭菜 POD 活性的影响

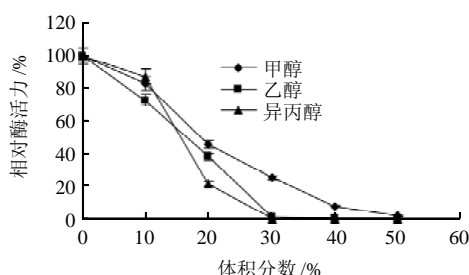


图 9 甲醇、乙醇、异丙醇对韭菜 POD 活力的影响

Fig.9 Effects of methanol, ethanol and isopropyl alcohol on the activity of POD from Chinese chives

由图 9 可知, 甲醇、乙醇、异丙醇 3 种有机溶剂均对该酶有较强的抑制作用, 随着有机溶剂体积分数的增大, 抑制作用越明显, 当体积分数达到 30% 时, 甲醇抑制了该酶 70% 以上的活性, 乙醇及异丙醇基本上完全抑制了该酶活性。

### 2.3.5 不同化合物对韭菜 POD 活性的影响

由图 10 可知, 不同化合物以及同一化合物的不同浓度对韭菜 POD 活性的影响存在着较大的差异。草酸对该酶的作用具有两重性: 低浓度时有明显激活作用, 但浓度超过 0.01mol/L, 则会明显抑制相对酶活力, 达到 0.03mol/L 时相对酶活力则完全被抑制; 尿素、KSCN 对该酶活力有轻微的抑制作用; 而 SDS、AsA 对该酶活力具有很强的抑制作用, 在 0.01mol/L 的 AsA 浓度下就可以完全抑制该酶活力。

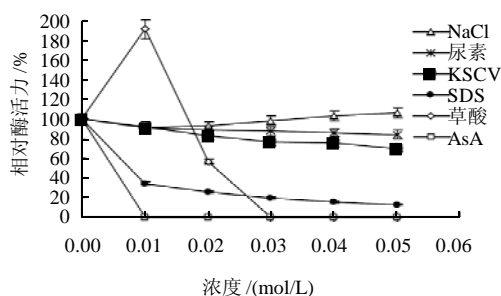


图 10 不同化合物对韭菜 POD 活力的影响

Fig.10 Effects of various compounds on the activity of POD from Chinese chives

### 2.3.6 不同金属离子对韭菜 POD 活性的影响

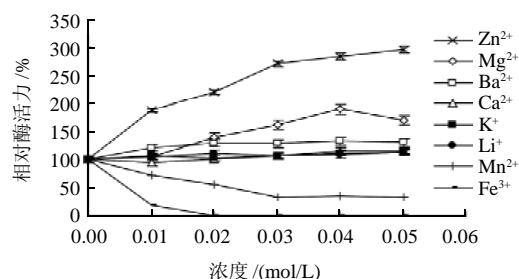


图 11 不同金属离子对韭菜 POD 活力的影响

Fig.11 Effect of metal ions on activity of POD from Chinese chives

由图 11 可知,  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对该酶有很强的激活作用, 说明这两种离子有可能促进了该酶空间构象的改变, 从而提高了酶的催化活性;  $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Li}^{+}$  对该酶有轻微的激活作用; 而  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  对该酶有明显的抑制作用, 在 0.02mol/L 的  $\text{Fe}^{3+}$  浓度条件下就可以完全抑制酶活力。

## 3 讨论

本实验通过一系列方式获得的电泳纯韭菜过氧化物酶, 与其他材料来源的 POD 相比有以下特点: 首先, 取材方便, 一年四季均可, 价格相对又便宜; 其次, 使纯化步骤简便化, 但仍获得了较高的比活力, 纯化倍数和回收率。韭菜 POD 在 20~40℃ 有较好的热稳定性, 5h 以内温度对酶活力还有轻微的激活作用, 最适反应温度为 40℃; pH 值耐受范围较广, 在 pH4.0~8.0 的环境下, 5h 以内酶活变化不大, 最适 pH4.6。该酶的分子质量约为 28.4kD,  $K_m$  值为 18.15mmol/L, 这些理化性质与其他来源的 POD 差异比较如表 2 所示。说明不同种属间的过氧化物酶在性质上是有差异的, 且这又与它们所处的生物体环境相适应。

表2 不同来源的POD理化性质间的比较

Table 2 Physicochemical properties of POD of different origins

指标	差异相近	差异较大
最适温度	女贞果实 <sup>[14]</sup> 、黄孢原毛平革菌 (LiP 40℃, MnP 45℃) <sup>[15]</sup> 、 莲藕(35℃) <sup>[16]</sup> 、荔枝果皮 (35℃) <sup>[17]</sup> 、豆壳(45℃) <sup>[18]</sup>	乳(55℃) <sup>[19]</sup> 、 甘薯叶(60℃) <sup>[9]</sup> 、
最适 pH 值	黄孢原毛平革菌 <sup>[15]</sup> 、 莲藕(pH5.0) <sup>[16]</sup> 、豆壳(pH5.0) <sup>[18]</sup> 、 乳(pH5.0~5.5) <sup>[19]</sup> 、	甘薯叶(pH5.6) <sup>[9]</sup> 、黄 孢原毛平革菌 <sup>[15]</sup> 、 女贞果实(pH 6.5) <sup>[14]</sup> 、 荔枝果皮(pH 6.5) <sup>[17]</sup>
相对分子 质量	枇杷果肉(22.6kD) <sup>[20]</sup> 、 甘薯叶(35kD) <sup>[9]</sup> 、莲藕 <sup>[16]</sup> 、豆壳 <sup>[18]</sup>	乳(75kD) <sup>[19]</sup> 、
$K_m$ 值	莲藕 <sup>[16]</sup> 、甘薯叶(29.1mmol/L) <sup>[9]</sup>	豆壳 <sup>[18]</sup> 、女贞果 实(6.2mmol/L) <sup>[14]</sup>

不同有机溶剂、化合物、金属离子对 POD 活性均有一定影响,这是由 POD 的结构特点决定的, Halpin 等<sup>[21]</sup>研究表明,铁离子是 POD 活性中心的必需成分,即 POD 是一种由单一肽链与卟啉构成的血红素蛋白,脱辅基蛋白分子必须与血红素结合才构成全酶<sup>[4]</sup>。当随着有机溶剂体积分数增大,酶活性越来越低,主要是因为酶在水溶液中,空间构象的稳定由氢键、疏水键、范德华力等维持,在酶分子表面形成了一个极性水化层,但有机溶剂的加入却破坏了该水化层,使溶液的极性降低了,从而导致了维持酶构象的次级键遭到破坏,引起空间构象的改变,让酶活性中心的微环境变化导致酶活性的丧失。有机化合物草酸对该酶具有双重性,原因可能是:在低浓度条件下,草酸的加入让酶的构象发生了一定改变,降低了酶活性,但这也使更多的该酶活性中心暴露了,从而使酶的结合部更加有利于结合底物,且后者的影响程度超过了前者,从而在整体上来说该酶的活性增高了,但在高浓度条件下,它又表现出了类似有机溶剂的特性,使该酶的空间构象遭到了更大的破坏,从而不能维持酶活性中心的存在,进而引起酶活性的完全丧失, SDS、AsA 对该酶活性有明显的抑制作用,其中 SDS 是一种变性剂,能够破坏蛋白质分子中的疏水键和氢键,进而改变酶的空间构象,导致酶活性降低, AsA 会破坏含铁血红素亚基,从而破坏该酶构成的完整性,引发酶失活, KSCN 对该酶活性没有明显的影响,而甘薯叶<sup>[9]</sup>实验中 KSCN 对其活性有明显的作用;金属离子  $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  对该酶有明显的抑

制作用,  $Ca^{2+}$  对该酶作用不明显,而在甘薯叶<sup>[9]</sup>实验中  $Ca^{2+}$  活性对其活性有明显抑制作用。

## 参考文献:

- [1] DUNFORD H B, STILLMAN J S. On the function and mechanism of peroxidase[J]. Coord Chem Rev, 1976, 19: 187-251.
- [2] ROS B A. Lignification in plant cell walls[J]. Int Rev Cytol, 1997, 176: 87-132.
- [3] PASSARDI F, PENEL C, DUNAND C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall[J]. Tren Plant Sci, 2004, 9: 534-540.
- [4] 田国中, 李怀方, 裘维番. 植物过氧化物酶研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(4): 332-344.
- [5] 杨暖, 张妙直, 宋洪英, 等. 木素过氧化物酶应用研究进展[J]. 现代农业科学, 2009, 16(4): 19-20.
- [6] La ROTTA C E, BON E P. 4-Chlorophenol degradation by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*: formation of insoluble products[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002, 98(3): 191-204.
- [7] GUILBAUT G G. Handbook of enzymatic methods of analysis[M]. New York and Basel: Marceldekker Inc, 1976.
- [8] 钟薇, 秦培勇, 刘长霞, 等. 辣根过氧化物酶修饰电极的电化学研究[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2009, 36(2): 18-22.
- [9] 付伟丽, 唐靓婷, 王松, 等. 甘薯叶过氧化物酶的分离纯化及其部分性质研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 223-227.
- [10] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 100-106; 116-124; 144-152.
- [11] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [12] 陈贻竹, 王以柔. 荔枝果实过氧化物酶(POD)的研究[J]. 中国科学院华南植物研究所集刊, 1989 (5): 47-52.
- [13] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 378-380.
- [14] 王臻, 廖祥儒, 张建国, 等. 女贞果实过氧化物酶的纯化及热稳定性研究[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(5): 23-27.
- [15] 徐淑霞, 张跃灵, 张世敏, 等. 黄孢原毛平革菌过氧化物酶的分离、纯化和酶学特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(1): 295-300.
- [16] 阙瑞琦, 张丽丽, 郭小路, 等. 莲藕过氧化物酶的分离纯化及性质研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(12): 63-67.
- [17] 庞学群, 段学武, 张昭其, 等. 荔枝果皮过氧化物酶的纯化及部分酶学性质的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(5): 449-454.
- [18] 刘稳, 方靖, 高培基. 豆壳过氧化物酶的分离纯化及其性质研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(5): 577-582.
- [19] 卢蓉蓉, 许时婴, 王璋. 乳过氧化物酶的分离纯化和酶学性质研究[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 100-104.
- [20] 林建城, 吴智雄, 彭在勤. 枇杷果肉过氧化物酶的分离纯化及其性质研究[J]. 四川农业大学学报, 2007, 25(4): 419-424.
- [21] HALPIN B, PRESSEY R, JEN J, et al. Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*)[J]. J Food Sci, 1989, 54: 644-649.