

鲜切山药中苯丙氨酸解氨酶的分离纯化及酶学性质研究

唐正弦, 曹敏捷 (广州市凯虹香料有限公司, 广东广州 510550)

摘要 [目的]研究铁棍山药中苯丙氨酸解氨酶(PAL)的动力学特性。[方法]以铁棍山药为研究对象,探讨铁棍山药切片后苯丙氨酸解氨酶的动力学特性,并考察底物浓度、pH、温度与酶浓度对酶活性的影响,筛选最优条件。[结果]PAL最适底物浓度为1 mmol/L,底物浓度过高或过低都对酶活力不利。PAL在硼酸-氢氧化钠缓冲液中适宜的pH范围为7.6~9.2;最适pH有2个,分别为pH 8.0和pH 8.8。PAL适宜的温度范围为35~55℃,最适反应温度为45℃,超过70℃则容易钝化。经硫酸铵分级沉淀、透析和Sephadex G-100凝胶过滤柱层析,纯化出苯丙氨酸解氨酶(PAL),蛋白回收率为0.36%,酶回收率为3.1%,纯化倍数为3.76。[结论]该研究为解决市场新鲜山药易褐变的问题及提高山药的贮藏性提供了有效依据。

关键词 铁棍山药;苯丙氨酸解氨酶;特性;抑制剂

中图分类号 S632.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)27-10928-03

Study on Isolation, Purification and Enzymatic Properties of Phenylalanine Ammonialyase in Fresh-cutting Yam

TANG Zheng-xian et al (Guangzhou Kaihong Flavor and Fragrance Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong 510550)

Abstract [Objective] To study the kinetic characteristics of phenylalanine ammonialyase(PAL) in yam. [Method] With yam as the study object, the kinetic characteristics of PAL in fresh-cutting yam were discussed, effects of substrate concentration, pH, temperature and enzyme concentration on enzyme activity were investigated for screening the optimal conditions. [Result] The result suggested that the optimum substrate concentration of PAL was 1 mmol/L. The optimal pH range of PAL in boric acid-sodium hydroxide buffer was from 7.6 to 9.2 and the optimum pH were 8.0, 8.8. The optimal temperature range of PAL was 35℃ to 55℃ and the optimum temperature was 45℃, its activity was easy blunt above 70℃. It indicated that PAL had some tolerance to high temperature. By ammonium sulfate fractionation, dialysis and Sephadex G-100 gel filtration chromatography, PAL was isolated and purified from rape PAL enzyme, the protein recovery of 0.36%, the enzyme recovery of 3.1%, purification factor of 3.76. [Conclusion] The study can provide effective basis for slowing brown strain of market fresh yam and improving preservation characteristic of yam.

Key words Yam; Phenylalanine ammonialyase; Characteristics; Inhibitor

苯丙氨酸解氨酶(L-phenylalanine ammonia-lyase, PAL)能催化L-苯丙氨酸解氨生成反式肉桂酸,是植物体内苯丙烷类代谢的关键酶,为多种酚类及类黄酮终产物提供前体^[1],与酚的生成有关,因而与褐变关系密切。该酶存在于所有绿色植物中,在真菌,细菌,藻类中也有发现,主要有霉菌与酵母菌^[2]。自Koukol和Conn首次从植物中发现PAL至今,该酶已在多种植物中分离纯化并得到深入研究^[3]。

铁棍山药为薯蓣科(Dioscoreaceae)薯蓣属(Dioscorea)植物,富含淀粉、粘液质、糖蛋白、胆碱、维生素C和甘露聚糖等,还含有谷氨酸、酪氨酸、丙氨酸等18种氨基酸,以及铁、钙、锌、磷、锰、钴、铜等10余种微量元素^[4],倍受当代消费群体的青睐。笔者研究苯丙氨酸解氨酶的酶学性质与山药褐变的关系,以期为解决市场新鲜山药易褐变问题及提高山药的贮藏性提供试验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 取新鲜、无病虫害、个体完整无损伤、表皮无霉和肉质洁白的铁棍山药为研究对象。将山药洗净、削皮、切成方块,在室温下放置1h(机械损伤可以诱导山药PAL基因的表达,增加PAL活性)。

1.2 方 法

1.2.1 酶活性测定^[5]。吸取1.0 ml浓度0.03 mol/L的L-苯丙氨酸和5.0 ml浓度0.05 mol/L Tris-HCl提取缓冲液(pH8.5)(对照中不加底物,加6.0 ml浓度0.05 mol/L的

Tris-HCl提取缓冲液)混匀,置40℃水浴中保温3 min后,立即加入0.1 ml酶液,摇匀,于紫外分光光度计上测定290 nm处的吸光值(OD_{290});继续在恒温下反应1 h,在冰浴中终止反应,再次测定吸光值(OD_{290})。以每毫克蛋白每分钟吸光值增加0.01为一个酶活性单位(U)。

1.2.2 蛋白质含量的测定^[6]。采用Bradford法进行测定,以标准牛血清蛋白为标准蛋白作绘制标准曲线,计算线性回归方程。

1.2.3 PAL最适pH及pH耐受性的研究。将酶液于不同pH的缓冲液体系中40℃保温反应,分别测定酶活性及蛋白含量;将酶液分别在pH4和pH10的缓冲液中保温(40℃),然后测定酶的残存活性。

1.2.4 PAL最适温度及温度耐受性的研究。将酶液在相同缓冲体系中分别于不同温度保温反应,分别测定酶活性及蛋白含量;将酶液在不同温度下分别保温5、10、20、30和60 min,然后测定酶的残存活性。

1.2.5 底物浓度对酶活力的影响。将酶液在相同缓冲体系中,分别添加不同体积浓度0.03 mol/L的L-苯丙氨酸,于40℃水浴反应,分别测定酶活性及蛋白含量。

1.2.6 酶浓度对酶活力的影响。将酶液在相同缓冲体系中,分别添加不同体积的酶液,于40℃水浴保温反应,分别测定酶活性及蛋白含量。

1.2.7 PAL的分离纯化。粗酶液的提取→硫酸铵分级沉淀^[7]→脱盐及浓缩^[8]→SephadexG-100凝胶过滤层析。

1.2.8 数据处理。试验结果取3次测定的平均值,计算标准差,以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。

作者简介 唐正弦(1967-),女,吉林吉林人,工程师,从事酶活性研究, E-mail: k89752021@126.com。

收稿日期 2013-08-15

2 结果与分析

2.1 动力学曲线的制备 PAL 催化 L-苯丙氨酸生成反式肉桂酸的反应,在 3 h 内,反应产物与反应时间成良好的线性关系(图 1),因此选择 3 h 内为基准,以 1 h 的反应产物量来表示酶的活力。酶在反应 3 h 后,曲线逐渐变平,这是因为 L-苯丙氨酸的逐渐减少,而产物反式肉桂酸生成量积累,对酶的反馈抑制作用加强,反应速度逐渐下降^[9]。

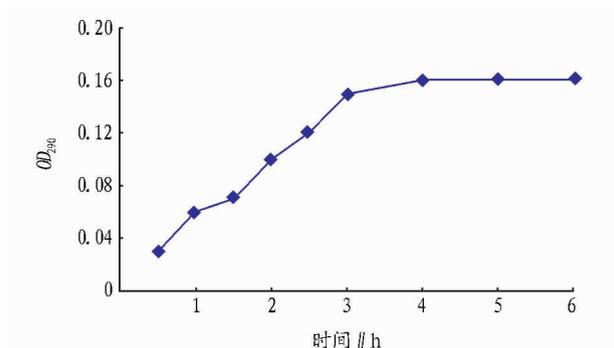


图 1 苯丙氨酸解氨酶反应进程曲线

2.2 最适 pH 及 pH 耐受性测定 图 2 表明,在不同 pH 的硼酸-氢氧化钠缓冲液中,酶活力有 2 个峰,即有 2 个最适 pH 值,分别为 8.0 和 8.8,这可能与山药体内含有苯丙氨酸解氨酶的同功酶有关。山药苯丙氨酸解氨酶在 pH7.6 和 9.2 时活性都在最大活力的 50% 以上,因此该酶在 pH7.6~9.2 比较稳定。PAL 维持活性的最适 pH 为 8.0~9.5,这与其他植物的研究结果是类似的^[10]。图 3 表明,在 pH4 和 pH10 时,水浴保温 5 min,酶活性残存都小于 50%。在 pH 为 10 时,酶活性下降的更多更快;说明 PAL 不耐酸碱,尤其不耐碱。而且,pH 对 PAL 有两方面的影响:一方面过酸或过碱改变酶的空间构象,使酶失活;另一方面 pH 改变底物的解离状态,影响其与酶的结合,从而影响酶催化的效率。图 3 表明,酶在 pH4 和 pH10 的水浴保温后,酶活性不能恢复为 100%,说明酶的空间构象已改变,酶失活。因而在山药加工及贮运过程中,可以根据这一性质考虑采取一些相关措施,使用食用酸(柠檬酸等)来降低 pH 值,抑制酶的活性,从而尽量避免褐变的发生。

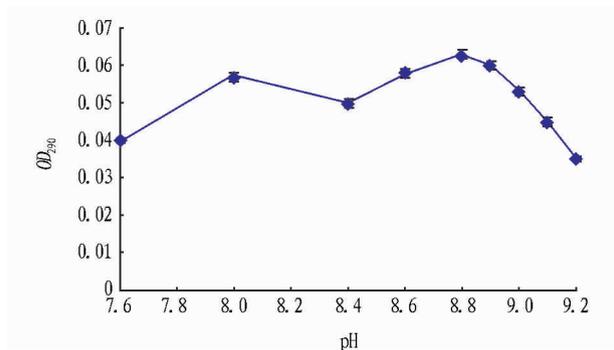


图 2 酶的最适 pH

2.3 最适温度及温度耐受性 图 4 表明,在 25~45 °C 时, PAL 活性呈上升趋势;当温度处于 35~55 °C 时,酶活力较高,为最适温度范围,45 °C 时山药 PAL 活力最高,60 °C 以后

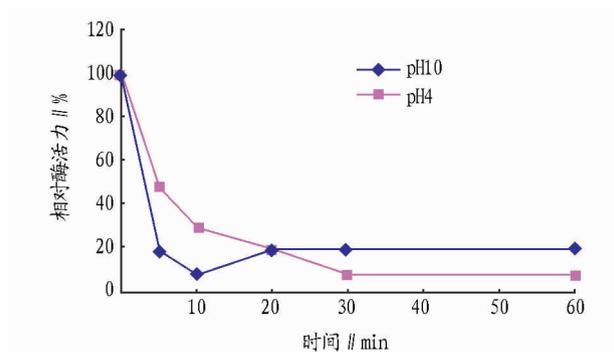


图 3 pH 值的耐受性

酶活性受到抑制,在高于 70 °C 条件下, PAL 活性明显降低。当温度接近 80 °C 时 PAL 活力已基本丧失。

图 5 表明,30 °C 保温 35 min 时, PAL 活力无明显降低;在 40 °C 保温 30 min 时, PAL 活力仅降低了 15% 左右,60 °C 的半衰期(活性丧失 50% 所需时间)约为 15 min,70 °C 以上的半衰期不超过 5 min,这表明山药 PAL 的活性在 50 °C 以下是比较稳定的,超过 70 °C 则容易钝化;表明山药 PAL 适应温度范围比较广,对高温有一定的耐受性,这可能与山药的粘液多糖有关,其在高温下能形成胶状物质从而削弱热的作用。

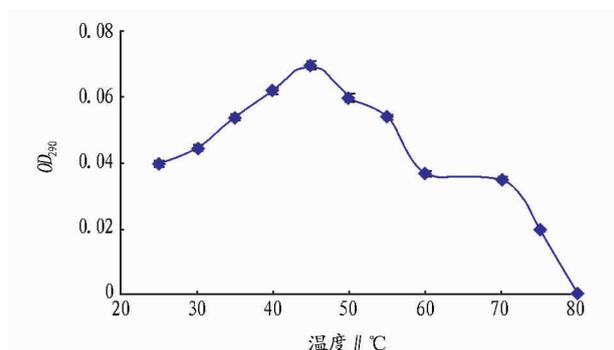


图 4 酶的最适温度

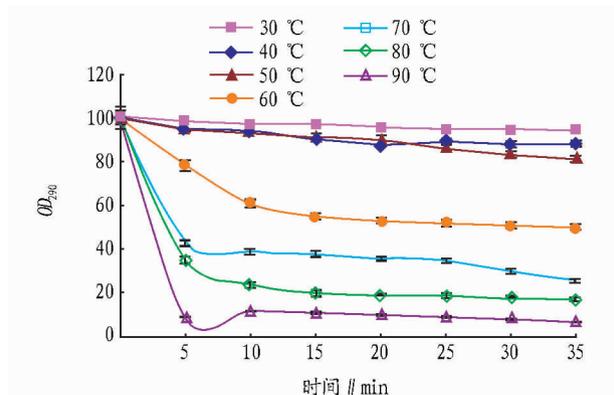


图 5 温度对 PAL 活性的影响

2.4 底物浓度对酶活力的影响 图 6 表明,随着底物浓度的增大,酶活力增大。当底物浓度为 1 mmol/L 时,酶活力达到最大值;然后随着底物浓度的增大,酶活力减小;当底物浓度增大 16 mmol/L 时,酶活力逐渐保持稳定。苯丙氨酸的浓度过高或过低都对 PAL 活力不利。与其他果蔬出现类似情况(如银杏^[11]、山药^[12]、芦笋^[13])。程水源等报道, PAL 的动

力学曲线不符合米氏方程,具有别构酶的特征。大多数 PAL 的米氏常数(K_m)在 $0.3 \times 10^{-4} \sim 1.5 \times 10^{-2}$ mmol/L 范围内,水稻 PAL 的 K_m 为 5.94×10^{-4} mmol/L,而小麦的 K_m 有 2 个,分别为 0.625×10^{-4} 和 3.1×10^{-4} mmol/L^[14]。银杏叶中苯丙氨酸浓度高于 2.5 mmol/L 时抑制酶活性,低于 2.5 mmol/L 时促进酶活性,最适底物浓度是 1.25 mmol/L。苯丙氨酸的浓度对 PAL 活性的影响可能与其他酶如苯丙氨酸合

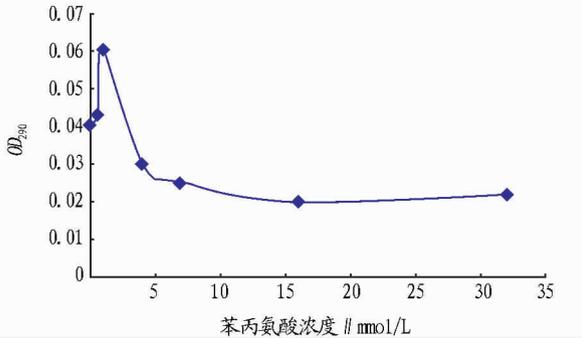


图6 底物浓度对 PAL 活性的影响

成酶、蛋白质合成酶的参与及蛋白质合成有关^[15]。

2.5 PAL 的分离纯化 铁棍山药 PAL 粗酶液经过硫酸铵分级沉淀、透析脱盐、Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析,洗脱曲线如图 7,共有 2 个蛋白峰,第 1 个峰的 PAL 活性较大,而第 2 个峰的 PAL 活性较小,说明是杂质。由表 1 可知,山药苯丙氨酸解氨酶粗酶液经过一系列分离纯化,蛋白质得率为 0.36%,酶得率为 3.1%,纯化倍数为 3.76。

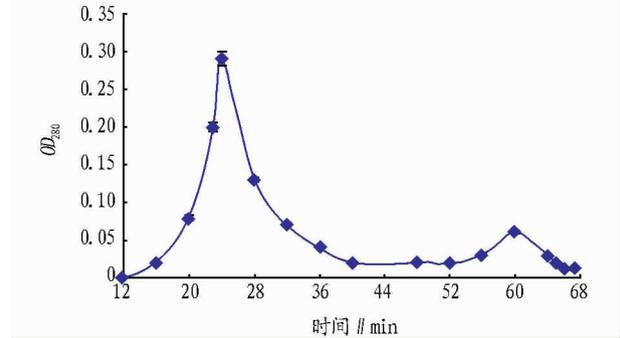


图7 PAL 在 Sephadex G-100 层析柱上的洗脱结果

表1 山药 PAL 纯化结果

样品	总蛋白含量//mg	总酶活//U	酶比活力//U/mg	蛋白质回收率//%	酶活回收率//%	纯化倍数
粗酶液	13.80	5 722.86	467.68	100.00	100.00	1.00
盐溶上清液	8.15	4 540.22	543.99	59.06	79.33	1.16
盐析沉淀	0.38	353.11	973.06	2.75	5.31	2.08
柱层析洗脱液	0.05	177.41	1 758.48	0.36	3.10	3.76

3 结论与讨论

铁棍山药 PAL 的最适底物浓度为 1 mmol/L,酶促反应速率可在 3 h 内保持不变,底物浓度过高或过低都对酶活力不利。在底物过量时酶活力随着酶浓度的增大而线性增大,但当酶浓度较高时产物对酶产生抑制作用,尽管增大酶量,而酶活力将趋于稳定。山药 PAL 适宜的 pH 范围为 7.6 ~ 9.2,有 2 个最适 pH 值,分别为 8.0 和 8.8。PAL 不耐酸碱,尤其不耐碱。山药 PAL 适应温度范围比较广,对高温有一定的耐受性,适宜的温度范围为 35 ~ 55 °C;最适温度是 45 °C。PAL 的活性在 50 °C 以下是比较稳定的,超过 70 °C 则容易钝化。

参考文献

[1] 冯容宝. 氨基酸的工业生产[J]. 发酵科技通讯,2000,29(1):11-14.
 [2] OUYANG G C, YING C Y, WOSG, et al. Study on plant phenylalanine seedlings of rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Journal of Plant Physiology, 1985, 11(2): 204-214.
 [3] KOUKOI J, CONN E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the -phenylalanine deaminase of *Herdeum vulgare* [J]. Journal of Biology and Chemistry, 1961, 236: 2692-2698.

[4] 张兵, 谢九皋. 山药营养成分的研究[J]. 湖北农业科学, 1996(6): 56-58.
 [5] 章金明. MeSA、叶蝉为害和机械刺伤对茶芽挥发物及 PAL、PPO 酶活性影响[D]. 北京: 中国农业科技学院, 2006.
 [6] JONES D H. Review article number 3: phenylalanine ammonia-lyase: Regulation of its induction and its role in plant development [J]. Phytochemistry, 1984, 23(7): 1349-1359.
 [7] 姜红林, 梁颖. 苯丙氨酸解氨酶的分离纯化与性质研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(7): 282-286.
 [8] 张宽朝. 霍山石斛 PAL 的分离纯化及基本性质的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 45(11): 133-135.
 [9] 江力, 袁怀波, 张世杰, 等. 山药苯丙氨酸解氨酶特性的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 36-40.
 [10] 欧阳光察, 薛应龙. 植物苯丙烷代谢的生理意义及调控[J]. 植物生理学通讯, 1988, 24(3): 9-16.
 [11] 王燕, 刘卫红, 杜何为, 等. 银杏叶中苯丙氨酸解氨酶基本特性的研究[J]. 湖北农业科学, 2004(4): 72-74.
 [12] 江力, 袁怀波, 张世杰, 等. 山药苯丙氨酸解氨酶特性的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 36-40.
 [13] 李艳华, 王庆国. 芦笋过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶特性及抑制条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(11): 55-59.
 [14] 程水源, 陈昆松, 刘卫红, 等. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望[J]. 果树学报, 2003, 20(5): 351-357.
 [15] 程水源, 顾曼如, 束怀瑞. 银杏叶黄酮研究进展[J]. 林业科学, 2000, 36(6): 110-115.