

荔枝果肉苯丙氨酸解氨酶特性的研究

薛楚然¹,刘树文^{1,*},卜 潇¹,严 俊¹,徐向文²

(1.西北农林科技大学葡萄酒学院,陕西杨凌 712100;

2.广东为多生物科技有限公司,广东茂名 525000)

摘要:研究了荔枝果肉中苯丙氨酸解氨酶(L-phenylalanine ammonia-lyase, PAL)的酶学特性。荔枝PAL动力学曲线并不遵循米氏方程,其最适底物浓度为2 mmol/L。在硼砂-硼酸缓冲液中,荔枝PAL的最适反应pH为8.7。PAL不耐酸碱,尤其不耐酸。荔枝PAL的最适反应温度为45 ℃,高于75 ℃则易于钝化,具有较强的耐热性。L-酪氨酸和L-半胱氨酸对荔枝PAL均有明显的抑制作用;金属离子中,Fe²⁺和Fe³⁺对荔枝PAL活性具有明显的促进作用,而Ca²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Ag⁺离子则对其活性有明显的抑制作用。

关键词:荔枝,苯丙氨酸解氨酶(PAL),酶学特性

Study on enzymology properties of L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in litchi fruit

XUE Chu-ran¹, LIU Shu-wen^{1,*}, BU Xiao¹, YAN Jun¹, XU Xiang-wen²

(1.College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2.Guangdong Weiduo Biotechnology Co., Ltd., Maoming 525000, China)

Abstract: The enzymology properties of L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) was investigated in this study. Litchi PAL dynamic curve did not follow the Michaelis-Menten equation. The optimum substrate concentration was 2 mmol/L. In the borax-boric acid buffer, the optimum reaction pH value was 8.7. Litchi PAL did not resistant to acid and alkali, especially to acid. The optimum reaction temperature was 45 ℃, and if the temperature was higher than 75 ℃, Litchi PAL was easily passivated. Litchi PAL had strong heat resistance. L-tyrosine and L-cysteine had significant inhibitory effect on Litchi PAL. Among the metal ions, Fe²⁺ and Fe³⁺ had significant promoting effect on PAL, while Ca²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ and Ag⁺ had significant inhibitory effect on Litchi PAL.

Key words: Litchi; L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL); enzymology characteristics

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)20-0206-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.20.035

荔枝(Litchi chinensis Sonn.)为我国亚热带地区的特有水果,因其具有丰富的营养价值和独特而优雅的风味,独享“果中之王”的称号。然而,荔枝在储藏和加工过程中极易出现褐变现象,使得产品的品质和营养成分受到损失。导致荔枝及其产品褐变的主要原因是参与氧化反应的各类酶,如多酚氧化酶、过氧化物酶、苯丙氨酸解氨酶等^[1-3]。目前已有许多探究荔枝果肉多酚氧化酶、过氧化物酶的酶学性质的研究^[3-4],然而荔枝果肉中苯丙氨酸解氨酶的性质研究仍是空白。

苯丙氨酸解氨酶(L-phenylalanine ammonia-lyase, PAL; EC 4.3.1.5)催化直接脱掉L-苯丙氨酸上的氨而生成反式肉桂酸,是植物体内苯丙烷类代谢的关键酶,也是苯丙烷类代谢途径中研究最多的酶。

PAL与一些重要的次生物质如木质素、黄酮类物质的合成有关,为多种酚类及类黄酮终产物提供前体^[5-6]。由于苯丙氨酸解氨酶与酚类物质的合成紧密相关,因而也是影响荔枝及其加工产品酶促褐变的重要因素。本文通过对荔枝果肉苯丙氨酸解氨酶(PAL)进行提取并研究其相关酶学性质,为荔枝酶促褐变机理研究提供一定的理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

荔枝 2014年6月采摘于广东省茂名市,品种黑叶;L-苯丙氨酸 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司, HPLC 98%; EDTA-Na₂ 上海正极生物科技有限公司,分析纯;β-巯基乙醇 行知生物科技有限公司;硼砂、硼酸 上海江莱生物科技有限公司,分析

收稿日期:2015-03-01

作者简介:薛楚然(1989-),女,硕士研究生,研究方向:荔枝与荔枝酒褐变机理及其控制,E-mail:xuechuran@hotmail.com。

* 通讯作者:刘树文(1965-),男,博士,教授,研究方向:葡萄酒酿造工艺、葡萄酒微生物,E-mail:liushuwen@nwsuaf.edu.cn。

基金项目:广东省教育部产学研结合项目资助资金(2011A01003);茂名市重大科技专项资助资金(2009B090300133)。

纯; L-酪氨酸、L-半胱氨酸 北京达科为生物技术有限公司HPLC 98%。

UV-2450 SPECTROPHOTOMETER型紫外分光光度计 日本SHIMADZU公司; Sorvall RC5C Plus型冷冻高速离心机 美国Thermo Scientific公司; AU220型电子分析天平 日本SHIMADZU公司;

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理 取成熟度适中, 果实饱满且无病害的荔枝果实为原料。将果实去皮、去核, 于-20℃下冷冻保存。

1.2.2 荔枝PAL酶液的提取 参照Koukol等^[7]的方法加以修改。取50 g冷冻保存的荔枝果肉, 分两次加入共50 mL预冷的硼砂-硼酸缓冲液(0.2 mol/L硼酸根, pH8.7, 含1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L β-巯基乙醇), 加入石英砂, 冰浴研磨。将研磨而成的匀浆经4层纱布过滤, 滤液4℃, 12000 r/min离心20 min, 上清液即为酶粗提液, 4℃下保存备用。

1.2.3 荔枝PAL活性的测定 参照Koukol^[7]和Solecka等^[8]的方法, 略加修改。在10 mL反应体系中, 包含pH8.7硼砂-硼酸缓冲液、底物L-苯丙氨酸和PAL粗酶液(各成分的具体体积因不同实验因素而异, 见下文), 并平均分为两份。一份在加入PAL酶液后立即以200 μL HCl溶液(6 mol/L)终止反应, 另一份于45℃保温60 min后, 以200 μL HCl溶液(6 mol/L)终止反应, 分别测定两份反应溶液在290 nm处光吸收值, 即A_{290nm}。以不加L-苯丙氨酸的反应体系(以蒸馏水替代)为参比, 并以加入酶液煮沸后来验证反应是由酶液引起的。以每小时生成的肉桂酸的量来表示酶活性。以反应体系每小时A_{290nm}增加0.01为一个酶活性单位(U), PAL活性按以下公式计算后, 单位为U·g⁻¹·h⁻¹:

$$\text{PAL活性} = \frac{A_{290} \times V_t \times v}{0.01 \times V_s \times W \times t}$$

式中, V_t: 酶液总体积(mL); W: 样品鲜重(g); V_s: 测定时取酶液的量(mL); v: 反应液总体积(mL); t: 反应时间(h)。

1.2.4 底物浓度对荔枝PAL活性的影响 10 mL反应体系中, 分别加入硼砂-硼酸缓冲液(pH8.7) 8.95、8.9、8.8、8.6、8.2、7.4、5.8 mL, 各加PAL酶液1 mL, 再分别加L-苯丙氨酸溶液(0.1 mol/L) 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mL, 使底物终浓度分别为0.5、1、2、4、8、16、32 mmol/L。将反应体系置于45℃保温60 min, 测定290 nm处光吸收值。

1.2.5 酶液体积分数对荔枝PAL活性的影响 10 mL反应体系中, 分别加入硼砂-硼酸缓冲液(pH8.7) 8.8、8.4、8.0、7.6、7.2、6.8、6.4、6.0、5.6 mL, 各加L-苯丙氨酸溶液(0.1 mol/L) 1 mL, 再依次加入PAL酶液0.2、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、3.0、3.4 mL, 使体系中酶液体积分数分别为2%、6%、10%、14%、18%、22%、26%、30%、34%。将反应体系置于45℃保温60 min, 测定290 nm处光吸收值。

1.2.6 pH对荔枝PAL活性的影响 取pH为7.4、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、8.7、9.0的硼砂-硼酸缓冲液8.9 mL, 各加入L-苯丙氨酸溶液(0.1 mol/L) 0.1 mL和PAL酶

液1 mL, 45℃保温60 min, 测定290 nm处光吸收值。另外将酶液置于pH4.0(磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液)、pH6.0(磷酸缓冲液)、pH10.0(硼砂-氢氧化钠缓冲液)缓冲体系中保温5、10、20、30、60 min后, 按照1.2.3所述方法测定PAL活性。

1.2.7 温度对荔枝PAL活性的影响 将反应体系(pH8.7硼砂-硼酸缓冲液8.9 mL, L-苯丙氨酸溶液0.1 mL, PAL酶液1 mL)分别置于25、35、45、55、65、75、85、100℃温度下保温60 min, 测定290 nm处光吸收值。将酶液分别置于25、35、45、55、65、75、85、100℃温度下分别保温5、10、20、30 min后取出, 按照1.2.3所述方法测定PAL活性。

1.2.8 氨基酸和金属离子对荔枝PAL活性的影响 将反应体系(pH8.7硼砂-硼酸缓冲液8.9 mL, L-苯丙氨酸溶液0.1 mL, PAL酶液1 mL)中分别加入不同浓度的L-酪氨酸、L-半胱氨酸, 或分别加入2 mmol/L的金属离子(Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Ag⁺, Zn²⁺等), 45℃保温60 min, 测定290 nm处光吸收值。

1.2.9 数据处理 本文中所有实验均进行三次重复, 实验结果利用SPSS 19.0软件进行分析; 利用Origin 8.5作图软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 底物浓度对荔枝PAL活性的影响

如图1所示, 随着底物浓度的升高, 荔枝PAL活性呈先上升后下降的趋势, 并在底物浓度为2 mmol/L时达到最大值。有研究表明, 大多数生物的PAL动力学曲线并不遵循米氏方程, 但也有个别生物如粘红酵母的L-PAL在底物为NH₄⁺时的酶促反应符合经典的米氏方程^[9-10]。本研究表明, 荔枝PAL动力学曲线同样不遵循米氏方程, 当底物浓度高于2 mmol/L时将抑制酶活性, 这与江力等^[11]对山药PAL性质的研究结果相似。目前已纯化分离的多数植物中PAL的K_m值在0.3×10⁻⁴~1.5×10⁻² mol/L^[12], 有一些植物则具有两个K_m值, 如小麦和油菜等^[13-14]。

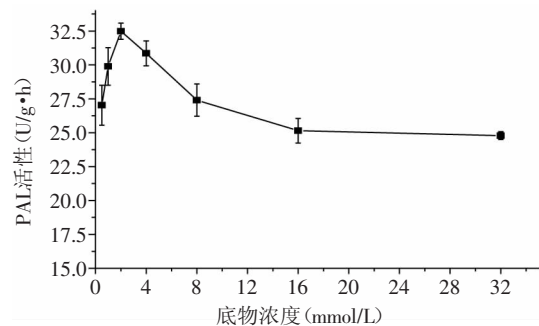


图1 底物浓度对荔枝PAL活性的影响

Fig.1 The effect of substrate concentration on the activity of Litchi PAL

2.2 酶液体积分数荔枝PAL活性的影响

本研究中, 以10 mL反应体系中所含荔枝PAL酶提取液的体积分数表示酶浓度。如图2所示, 随着反应体系中PAL酶液体积分数的增加, PAL活性也随之上升。当体积分数小于26%时, 其活性增加的速度较

快,而当大于26%后,则活性增加的趋势渐缓。这主要是由于底物含量一定的情况下,酶量增大到一定值后活性便不再升高。

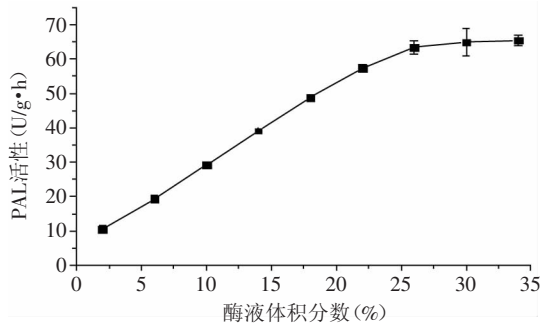


图2 酶液体积分数对荔枝PAL活性的影响

Fig.2 The effect of enzyme volume fraction on the activity of Litchi PAL

2.3 荔枝PAL最适pH及pH适应性

由图3可以看出,从pH7.4~8.2,荔枝PAL的活性处于上升趋势,并于pH8.2时达到第一个最大值。pH8.4时,PAL活性降低,并在pH8.7时达到第二个最大值。这种趋势可能是由于在荔枝果肉中存在苯丙氨酸解氨酶的同工酶。不同来源的PAL最适pH在8.0~9.5之间,如红酵母和鹰嘴豆的最适pH分别为8.5^[13]和9.4^[15],而小麦和水稻的最适pH分别为8.8和9.2^[12]。

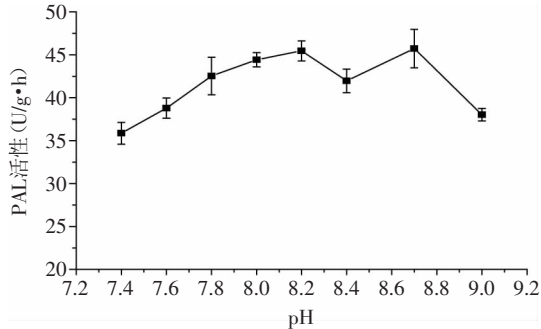


图3 荔枝PAL的最适反应pH

Fig.3 The optimum pH value for Litchi PAL

如图4所示,荔枝果肉PAL不耐酸碱。在pH4.0时,水浴5 min后PAL活性则降低至45%,而水浴60 min后几乎丧失全部活性; pH6.0时,水浴5 min后PAL活性仍保持67%左右,30 min后活性降低至27%,而60 min后活性低于20%;在碱性条件下(pH10.0),荔枝PAL活性始终高于酸性条件,在水浴10min后仍具有66%的活性,但60 min后活性降低至15%左右,与pH6.0下水浴60 min后得到的活性相近。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,影响它与酶的结合,从而影响酶催化的效率。从图4可知,荔枝PAL在pH4.0、6.0、10.0的条件下水浴保温5 min后,即使将反应pH恢复至最适值,酶活性均有所降低。说明酸碱环境可使荔枝PAL的空间构象改变,导致酶失活。因此,在荔枝产品的保藏保鲜过程中,可以通过

添加食用酸等食品添加剂来改变环境pH,抑制PAL活性,从而减少褐变的产生。

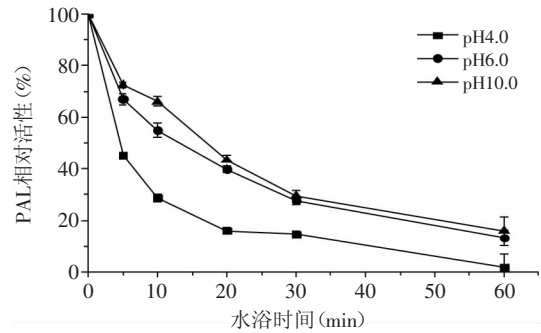


图4 荔枝PAL对pH的稳定性

Fig.4 The stability of Litchi PAL on different pH values

2.4 荔枝PAL最适反应温度及温度适应性

如图5所示,在25~100 °C的温度范围内,荔枝PAL的最适反应温度为45 °C,高于或低于该温度均可使酶活降低。图6显示了荔枝PAL对不同温度的适应性。可以看出,在25~55 °C的温度范围内,PAL活性基本没有受到抑制,在55 °C下水浴30 min后,其活性仍保持在80%左右。而从65 °C开始,荔枝PAL活性受到明显抑制,在65~100 °C水浴30 min后,酶活性分别剩余53%、30%、13%和6%。荔枝PAL在高温下仍保留了一定的活性,说明其具有较强的耐热性,但温度高于75 °C时荔枝PAL容易钝化。有研究表明,百合鳞茎PAL在80 °C水浴5 min后仍有大于80%的活性^[16],甘蓝型油菜PAL在70 °C保温5 min后仍有70%左右的活性^[14]。而本研究中,在85 °C和100 °C水浴5 min后,

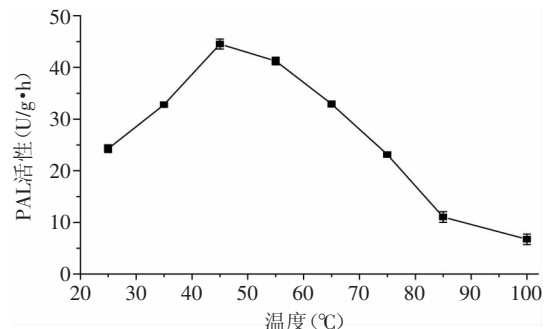


图5 荔枝PAL的最适反应温度

Fig.5 The optimum temperature for Litchi PAL

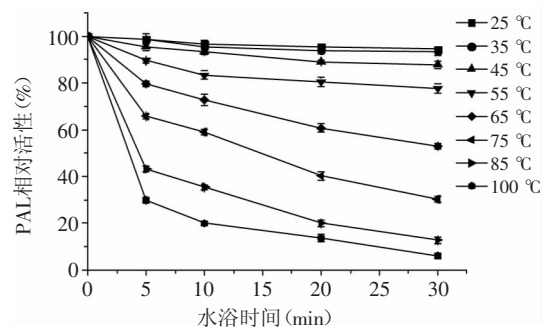


图6 荔枝PAL对温度的稳定性

Fig.6 The stability of Litchi PAL on different temperature

荔枝PAL残余活性分别为43%和30%，耐热性较高。

2.5 氨基酸和金属离子对荔枝PAL活性的影响

L-酪氨酸和L-半胱氨酸均对荔枝PAL的活性有明显的抑制作用，且抑制作用随氨基酸浓度增大而增强(图7和图8)。在供试范围内，L-酪氨酸和L-半胱氨酸分别在浓度为1.0 mmol/L和12 mmol/L时，对荔枝PAL活性具有最强的抑制效果。有报道指出，L-酪氨酸和L-半胱氨酸分别是苯丙氨酸解氨酶的竞争性抑制剂和巯基类抑制剂。前者的抑制作用机理是与底物竞争苯丙氨酸解氨酶的结合能力^[7]，而后的作用机理可能是对脱氢丙氨酰残基的修饰，这种抑制作用与酶活性部位脱氢丙氨酰基的丧失和减少相伴随。

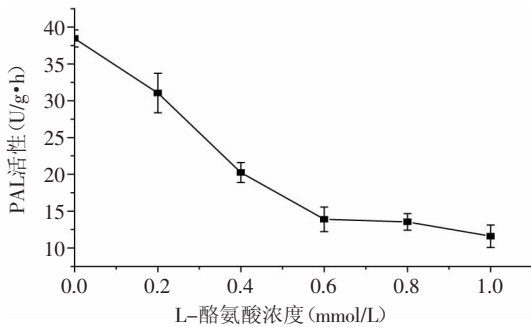


图7 L-酪氨酸对荔枝PAL活性的影响

Fig.7 The effect of L-Tyrosine on the activity of Litchi PAL

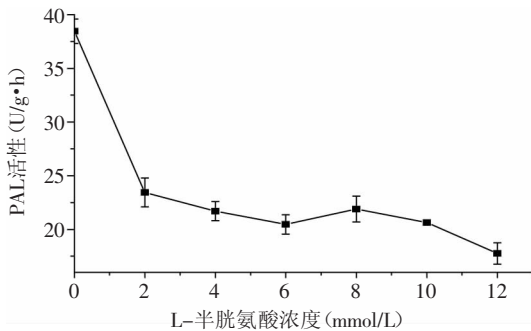


图8 L-半胱氨酸对荔枝PAL活性的影响

Fig.8 The effect of L-Cysteine on the activity of Litchi PAL

固定浓度下(2 mmol/L)，金属离子对荔枝PAL活性的影响差异明显(图9)。Na⁺、Fe²⁺和Fe³⁺促进了酶的活性，其中Fe³⁺离子的促进效果最明显(159.43%)。其

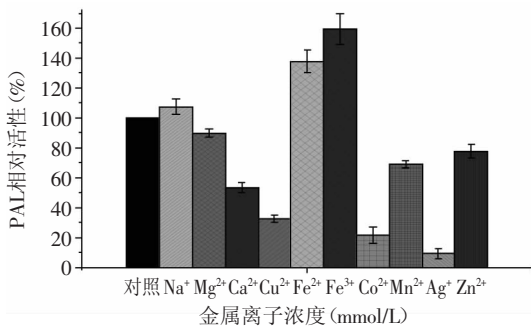


图9 金属离子对荔枝PAL活性的影响

Fig.9 The effect of different ion on the activity of Litchi PAL

余金属离子均对荔枝PAL有抑制作用，其中Ag⁺离子的抑制效果最强(PAL相对活性9.32%)。Mg²⁺离子对于荔枝PAL的活性有微弱的抑制作用，但对于红酵母却有一定的促进作用^[13]。

3 结论

荔枝果肉苯丙氨酸解氨酶(PAL)最适底物浓度为2 mmol/L，荔枝PAL活性随着反应体系中酶液体积分数的增加而呈线性增大。荔枝PAL的最适反应pH为8.7，且pH为8.2时其活性也处于高峰。荔枝PAL不耐酸碱，尤其不耐酸。荔枝PAL的最适反应温度为45℃，在25~55℃温度范围内活性稳定，超过75℃则容易钝化。L-酪氨酸和L-半胱氨酸对于荔枝PAL活性均有明显的抑制作用，在本研究中，二者分别在浓度为1 mmol/L和12 mmol/L时抑制作用最强。金属离子中，Fe²⁺和Fe³⁺对荔枝PAL活性具有明显的促进作用，而Ca²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Ag⁺离子则对其活性有明显的抑制作用。

参考文献

- [1] 陈瑞琴,刘宝华,王果,等.不同荔枝品种采后果皮褐变与多酚氧化酶关系的研究[J].热带作物学报,2012,33(7):1261-1266.
- [2] 冯卫华,林丽棉,秦艳,等.荔枝与荔枝酒褐变控制[J].食品科学,2011,32(4):246-250.
- [3] 刘春丽.荔枝果肉过氧化物酶学性质研究[J].西南农业学报,2012,25(2):424-428.
- [4] 刘春丽,杨跃寰,陈欲云,等.荔枝果肉多酚氧化酶学性质研究[J].安徽农业科学,2011,39(2):646-648.
- [5] 阳光察,薛应龙.植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控[J].植物生理学通讯,1988,24(3):9-16.
- [6] Ritter H,Schulz GE. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase[J]. The Plant Cell,2004,16(12):3426-3436.
- [7] Koukol 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.
- [8] Solecka D,Kacperska A. Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold[J]. Physiologia Plantarum,2003,119:253-262.
- [9] 张宽朝,金青,蔡永萍,等.苯丙氨酸解氨酶与其在重要次生代谢产物调控中的作用研究进展[J].中国农学通报,2008,24(12):59-62.
- [10] Bolwell G P, Bell J N, Cramer C L, et al. L-phenylalanine Ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*[J]. European Journal of Biochemistry,1985,149:11.
- [11] 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.
- [12] 江柯,卢涛,赵德立,等.红酵母苯丙氨酸解氨酶的分离纯化及性质研究[J].四川大学学报:自然科学版,2004,41(4):865-868.
- [13] 欧阳光察,应初衍,沃绍根,等.植物苯丙氨酸解氨酶的研究(下转第219页)

