

# 玉米幼苗的苯丙胺酸和酪胺酸去胺酶 酶的純化和性質探討

童 武 夫\*

## 摘 要

生長五天的玉米白化幼苗，其苯丙胺酸和酪胺酸去胺酶經過丙酮沉澱，DEAE Sephadex 離子交換和 Sephadex G-150 分子篩過濾等步驟的分離，所得到的純化倍數分別為 27 和 11。自丙酮沉澱處理以後，二酶活性比率保持穩定。但二酶活性在純化過程中始終不能分離。酸鹼條件對二酶活性的影響相當類似，其最適 pH 值都是 9.0。50°C 的溫度處理，至少在 30 分鐘內酶活性完全不受影響。但在 60°C 時二酶活性同樣地以一級反應速率降低。二酶的  $K_m$  值分別為  $1.25 \times 10^{-3}$  M 和  $0.12 \times 10^{-3}$  M。此結果顯示苯丙胺酸和酪胺酸兩種去胺作用為同一酶分子所催化。

## 緒 言

類苯丙酸代謝(phenylpropanoid metabolism)廣泛地存在於高等植物，是植物重要的次代謝之一。高等植物含有的化合物，如木質素(lignin)、香豆素(coumarin)及花青素(anthocyanin)等，都是此代謝徑路的衍生物。自從 1961 年 Koukol 和 Conu 共同發表了苯丙胺酸去胺酶(PAL)的催化性質之後，PAL 就開始被許多植物生理及植物化學學者所重視(Camm and Towers, 1973; Yoshida, 1969; Zucker, 1972)。由於 PAL 對環境因素，如光照、植物調節素、病原感染及受傷等刺激的反應極為敏感，顯示由 PAL 所引發的類苯丙酸代謝，可能在植物形態發育過程具有重要的意義(Cheng and Marsh, 1968; Dittes *et al.*, 1971; Tong and Schopfer, 1976; Minamikawa and Uritani, 1965)。

類苯丙酸代謝可源自苯丙胺酸或酪胺酸(Nambudiri *et al.*, 1973; Uchiyama *et al.*, 1968)。酪胺酸去胺酶(TAL)也和 PAL 一樣是催區類苯丙酸代謝起始反應的酵素，但 TAL 的生理意義則未受到普遍地重視。根據調查報告指出，類苯丙酸代謝主要分佈於蕨類以上的陸生植物(Young *et al.*, 1966)。有些植物只具 PAL 活性，然而大多數植物同時具有 PAL 和 TAL 活性，而且 PAL 活性

通常較 TAL 活性來得高。

從矮種玉米葉鞘組織中抽取純化的酵素，發現同一蛋白同時具有 PAL 和 TAL 雙重活性。此結果的獲得使得 PAL 和 TAL 存在同一植物體而不同細胞的可能性大為降低(Havir *et al.*, 1971)。另一方面，在真菌 Polyporus 的研究實驗中發現，光照對 PAL 和 TAL 活性的影響恰好相反；光照能促進 PAL 活性增高，同時抑制 TAL 了活性，而認為 PAL 和 TAL 可能分別關聯不同的代謝徑路(Nambudiri *et al.*, 1973)。

到底 TAL 在高等植物的代謝應具有何種生理功能，目前仍缺乏可循資料。為了明瞭環境因素對高等植物生長發育過程中 TAL 活性的影響，在初步調查多種植物幼苗 PAL 和 TAL 活性的結果中，選擇了同時具有較高 PAL 和 TAL 活性的玉米為材料。如果玉米幼苗的 PAL 同時具有 TAL 活性，則將對 TAL 生理功能的研究更有助益。然而，由於玉米品系和組織生長發育階段有別於 Havir 等人所用的矮種玉米葉鞘，因此初步純化和酵素性質的探討工作並不能省略。本文即為玉米白化幼苗 PAL 和 TAL 部分純化和性質探討的結果。

## 材料與方法

試藥和材料：*L*-苯丙胺酸、*L*-酪胺酸，小牛

\* 國立臺灣師範大學生物系

血清蛋白購自美國 Sigma 公司。L-(1-<sup>14</sup>C)-酪胺酸購自美國新英格蘭核子化學公司 (New England Nuclear)。Sephadex G-150 和 DEAE Sephadex A-25 則為瑞典 pharmacia 產品。Acetone *n*-butanol 從西德 Merck 化學公司購得。

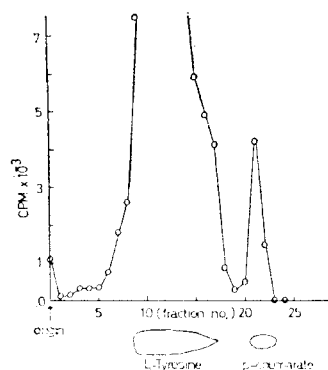
雜交玉米臺南 11 號 (*Zea mays* c.v. Tainan No. 11) 購自臺灣省農林廳種苗繁殖場。

材料處理：玉米種子先以 5% 次氯酸鈉消毒 5 分鐘後，以流水沖洗一小時，最後再用蒸餾水沖洗 1 次。洗淨的種子播種於裝有蛭石的塑膠盒 (39×34×7 cm<sup>3</sup>) 內，用鋁箔蓋住，置入溫度為 25°C±1°C 生長箱的紙盒中發芽生長。

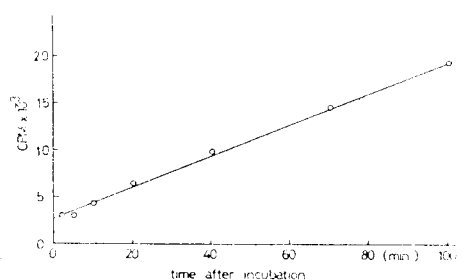
酶的活性測定：PAL 活性測定方法如同以前報告所述 (Tong *et al.*, 1980)；3 ml 的反應溶液中含有 10 mM L-苯丙胺酸及 0.1 M 硼酸鈉緩衝液 (pH 8.8)。於加入 0.1 ml 酶抽取液後，即在光譜儀 (Gilford Model 250) 內用波長為 290 nm 紫外光追蹤吸光密度的變化。根據 *t*-cinnamic acid 的透光係數為  $1 \times 10^7$  cm/mole，即每 nmole 之 *t*-cinnamic acid 的產生可在 290 nm 波長下改變的吸光密度為 0.01。酶活性就可從吸光密度改變的斜率計算而得。TAL 活性則得自 <sup>14</sup>C-*P*-Coumaric acid 產生量的測定 (Neish, 1961; Young *et al.*, 1966)；0.2 ml 反應溶液中含有 5 mM L-酪胺酸、0.05 M 硼酸鈉緩衝液 (pH 8.8) 和 0.4 μCi <sup>14</sup>C-L-酪胺酸。加入 50 μl 酶抽取液後，置於 30°C 作用兩小時，最後加入 3 M 鹽酸 20 μl 並轉置於 0°C 冰水中以中止酶的作用。

反應後溶液點滴於濾紙 (Whatman No. 1) 上，以正丁醇、醋酸、水 (4:1:1.8) 為展開劑進行行層分離。使用此展開劑可順利地將酪胺酸與 *P*-Coumaric acid 清楚地分開 (圖一)。行層分離後的濾紙，先在空氣中晾乾，再於紫外燈光下切取含 *P*-Coumaric acid 的片段，置入裝有 toluene-based scintillation fluid 的小瓶中，以 Beckman liquid Scintillation counter (Model LS 100) 測定其放射性強度。酶的作用時間和 <sup>14</sup>C-*P*-Coumaric acid 的產生量，至少在 100 分鐘內成直線關係 (圖二)。蛋白質含量的測定是採用 Lowry 方法 (Lowry *et al.*, 1951)，以結晶的小牛血清蛋白為測定標準。

酶的純化：收集生長 5 天的白化幼苗 1 公斤，



圖一 L-酪胺酸和 *P*-Coumaric acid 的濾紙行層分離。每 1.5 公分長切為一片，分別測定放射性強度。*P*-Coumaric acid 的行層位置由 UV 吸光確定，L-酪胺酸則用 ninhydrin 呈色檢定。



圖二 放射性 *P*-Coumaric acid 生成量和酶作用時間的關係。

加入 0.1 M 硼酸鈉緩衝液 (pH 8.8) 200 ml，於果汁機中高速攪拌，歷時半分鐘。如此重複攪碎三次使完全呈乳糜狀，再倒入有四層紗布的漏斗中過濾。濾液以 7,900×g 在 4°C 條件下離心 30 分鐘。收集離心後的上清液中緩慢加入 1.5 倍體積，預先冷凍的丙酮，同時均勻攪拌。最後將混合液置冷凍箱 (-10°C) 中靜置 1 小時以沉澱蛋白質。

用 7,900×g 離心 10 分鐘以收集丙酮溶液中沉澱的蛋白質。倒去上清液後，加入 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 30 ml 溶解沉澱的蛋白質。溶解後的溶液再以 7,900×g 離心 10 分鐘，以除去少量不溶性的雜質。所得上清液以含有 0.1% 2-mckaptoethanol 之 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 2 l 在 4°C 冰箱內過夜透析。透析後的溶液則導入已經同樣緩衝液平衡過的 DEAE-Sephadex A-25 管柱 (2.5, 55 cm)。然後用同樣

緩衝液但含有從 0 到 2 M 氯化鉀的直線上升坡度，以沖洗分離酶蛋白。令每一試管收集洗液之量為 3 ml (Buchler 4002 Fraction Collector)。最後測定各試管內洗液的酶活性和蛋白質含量。

將含有 PAL 和 TAL 活性部分的洗液集中，於 4°C 條件下緩慢加入結晶的硫酸胺，同時不停地攪拌，直到達 70%飽和濃度為止，並繼續攪拌 10 分鐘。用 7,900×g 離心 15 分鐘以收集沉澱蛋白。收集的沉澱中加入 0.1 M 硼酸鈉緩衝液 (pH 8.8) 以溶解之，並以含 0.1% 2-mercaptoethanol 之同樣緩衝液 1 l 過夜透析。透析後的酶溶液先離心 10 分鐘，取其上清液導入已經 0.05 M 硼酸鈉緩衝液 (pH 8.8) 平衡之 Sephadex G-150 管柱 (3.7, 50 cm)，並用同樣緩衝液沖洗。每試管收集洗液 3 ml，並測定各部分洗液的酶活性和蛋白含量。

將含有酶活性的洗液部分集中，用 70% 飽和濃度的硫酸胺沉澱蛋白。離心後，以 0.1 M 硼酸鈉緩衝液 (pH 8.8) 溶解沉澱蛋白，並如前述過夜透析。透析後的酶溶液先經離心，再於取得的上清液加入 1.5 倍體積冷凍過的 ethyleneglycol，均勻混合後貯存於 -10°C 冷凍箱備用。酶溶液在此貯存條件下相當穩定。上述的酶純化過程除特別說明外，都是在 10°C 的冷藏箱中進行。

## 結果與討論

### 一、酶的純化：

第五天的白化幼苗之選用是基於其具有較高的

酶活性。在黑暗萌芽生長過程中以第五天的幼苗 PAL 和 TAL 活性最高。而且在此生長發育階段，幼苗尚無老化現象，極適用於將來進行光照及植物調節素處理的生理研究。

表一所示為各純化步驟中 PAL 和 TAL 活性及蛋白質總含量的測定結果。經 Sephadex G-150 分子篩過濾分離後的純化倍數，PAL 和 TAL 分別為 27 和 11。若和從其他植物組織所獲得的資料相比較，則此純化倍數較為偏低。(Havir *et al.*, 1971; Reid *et al.*, 1972; Zimmermann and Hahlbrock, 1975)。其原因可能是白化幼苗缺乏分化能力，細胞的代謝率偏低，蛋白質合成能力較差，以致造成組織內可溶性蛋白質的總含量較少之故。

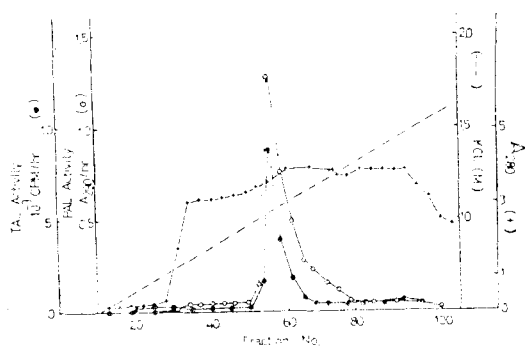
從丙酮沉澱蛋白質以後的純化步驟中，PAL 和 TAL 的活性比率都在 1.3 左右，而粗抽取液中所測得的二酶活性比率則只有 0.43。以丙酮沉澱處理可純化 PAL 13.7 倍，但對 TAL 的純化則只有 4.2 倍。顯然在粗抽取液中含有一些小分子物質，可能是類苯丙酸代謝的中間產物，對 PAL 活性有較強的抑制效果。事實上，也有研究報告指出，PAL 和 TAL 對類苯丙酸代謝的一些中間產物分別有不同的敏感性 (Minamikawa and Uritani, 1965b; Kindl, 1970)。因此，任何有關測定植物組織中 PAL 活性，最好得先除去抽取液中的小分子物質，以避免獲得不正確的資料。

圖三和圖四分別為酶活性在 DEAE Sephadex A-25 和 Sephadex G-150 管柱行層分離的情形。

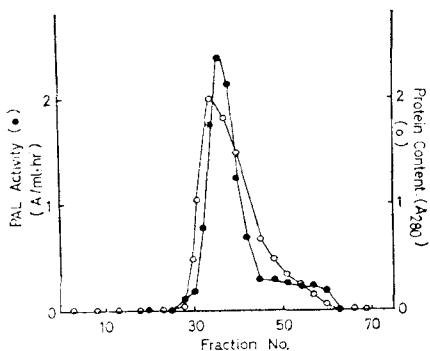
表一 玉米幼苗苯丙胺酸和酪胺酸去胺酶的純化

使用生長五天的白化幼，1 公斤，以抽取純化苯丙胺酸和酪胺酸去胺酶

treatment	volume (ml)	phenylalanine ammonia-lyase				tyrosine ammonia-lyase			
		total protein (mg)	total activity (A/min)	specific activity $A \times 10^3$ min $\times$ mg protein	fold of purification	total activity $10^{-6}$ cpm hr	specific activity $10^{-3}$ cpm hr $\times$ mg protein	fold of purification	ratio of PAL TAL
Crude extract	1240	14,979	13.7	0.91	—	32.2	2.15	—	0.43
Acetone precipitated	165	792	9.95	12.5	13.7	7.22	9.12	4.2	1.38
DEAE sephadex	58	217	3.83	17.6	19.3	2.41	11.11	5.2	1.58
Sephadex G-150	42	61	1.50	24.6	27.0	1.43	23.44	10.9	1.05



圖三 使用 DEAE Sephadex A-25 管柱行層分離苯丙胺酸和酪胺酸去胺酶。



圖四 使用 Sephadex G-150 分子篩過濾分離苯丙胺酸去胺酶。

雖然從綠豆及甘藷的研究，曾發現 PAL 有異構酶存在 (Ahmed and Swain, 1970; Minamikawa and Uritani, 1965a)。但玉米白化幼苗抽取液經過多次重複的分離實驗，都沒發現有任何 PAL 或 TAL 的異構酶，而且 PAL 和 TAL 活性，不論是以離子交換層法分離或是以分子篩的過濾分離都無法分開。顯然地，假如不是 PAL 和 TAL 的酶分子之大小，立體結構極為相似，就是如同在真菌 *Rhodotorula* 及矮種玉米所發現的結果一樣，PAL 和 TAL 活性很可能是由單一酶分子所表現 (Ogata *et al.*, 1967; Uchiyama *et al.*, 1968; Havir *et al.*, 1971; Reid *et al.*, 1972)。

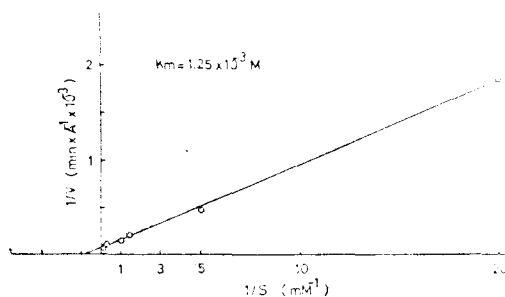
二、酶的物理化學性質：

有關受質濃度和 PAL 催化速率的關係，從 0.05 到 10 mM *L*-苯丙胺酸所測得的酶活性，經由 Lineweaver-Burk 圖示結果得到的  $k_m$  值為  $1.25 \times 10^{-3}$  M (圖五)。使用已經過純化處理的酶溶液來測定  $k_m$  值時，應可排除任何小分子物質的促進或

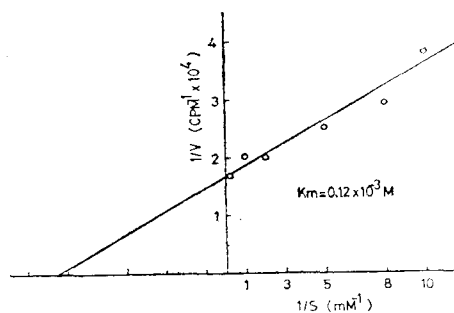
抑制影響。即使酶的純化程度未臻完全，這些微量的大分子混雜物，似乎不致於對酶分子和受質間的作用發生顯著的干擾。根據不同植物來源的資料顯示，單子葉植物 PAL 的  $k_m$  值都普遍地偏高 (Camm and Towers, 1973; Zimmermann and Hahlbrock, 1975)。

TAL 的  $k_m$  值為  $0.12 \times 10^{-3}$  M (圖六)，約為 PAL  $k_m$  值的十分之一。TAL 酶分子的高受質吸附性之表現，並不只見於玉米的白化幼苗。矮種玉米葉鞘組織的 PAL 和 TAL，其  $k_m$  值分別為  $0.27 \times 10^{-3}$  M 和  $0.025 \times 10^{-3}$  M (Havir *et al.*, 1971)。水稻幼苗 PAL, TAL 的  $k_m$  值則分別為  $6.45 \times 10^{-3}$  M 和  $0.67 \times 10^{-3}$  M (Tong *et al.*, 1980)。導致這一致性特徵的原因，可能是因為酪胺酸的水溶性很低，在細胞內可直接利用於代謝的酪胺酸濃度勢必較苯丙胺酸濃度為低。因此普遍地具有較高的受質吸附性，方能滿足其在生體中應有的生理功能。

類苯丙胺酸代謝普遍存在於高等植物。在無數有



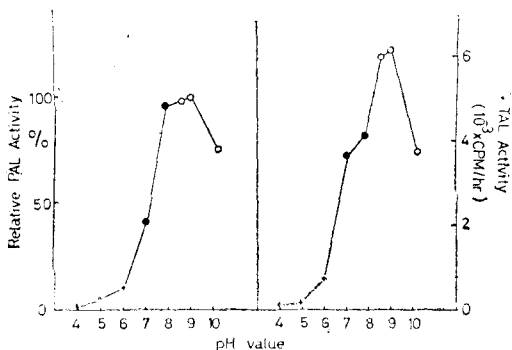
圖五 苯丙胺酸去胺酶於 pH 8.8, 25°C, 的催化活性。以反應速度例數對受質濃度例數所作的圖示。



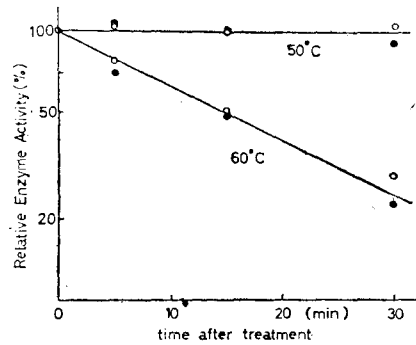
圖六 酪胺酸去胺酶在 pH 8.8, 30°C, 的催化活性。以反應速度例數對受質濃度例數所作的圖示。

關 PAL 的報導中，酶的最適 pH 值都是在 8.5~9.0 之鹼性範圍內。玉米白化幼苗也不例外，的最適值為 9.0 (圖七)，PAL 的最適 pH 值也表現於同一範圍。PAL 和 TAL 對 pH 影響有同樣反應，也曾在大麥的研究報導中出現 (Neish, 1961)。也有 PAL 和 TAL 分別適應不同的 pH 環境，例如矮種玉米的 TAL 最適 pH 值為 7.5 (Havir *et al.*, 1971)，水稻幼苗的 TAL 則為 6.0 (Tong *et al.*, 1980)。玉米白化幼苗 PAL 和 TAL 在各種 pH 值所表現的活性狀況相當接近，表示其酶分子與受質結合時的離子化狀態極為相似。綜觀現有資料可以發現 PAL 對環境中 pH 的反應，不論植物的品種、組織都很一致，然而 TAL 的反應則有明顯歧異。這種歧異暗示了 PAL 和 TAL 很可能在代謝功能上，或是在細胞內的作用環境有所分歧。對於酶活性表現的穩定性，PAL 和 TAL 在 50°C 的溫度處現下，至少在 30 分鐘內都相當穩定。但若將溫度上升到 60°C，則二酶活性表現也一致地以相同的一級反應速度下降 (圖八)。酶活性受溫度的影響是因為酶蛋白的三級構造因高溫而變性所致。PAL 和 TAL 表現同樣的溫度敏感性，也是支持同一酶蛋白催化苯丙氨酸和酪氨酸兩種去胺作用之重要依據。

目前有關苯丙氨酸和酪氨酸去胺作用的資料，可分成兩類不同的看法：真菌，*Sporobolomyces* 的 PAL 和 TAL 活性隨着培養基的不同以及生長時期的差別而有所差異 (Camm and Towers, 1969)。光照處理可以促進真菌 *Polyporus* 之 PAL 活性增高，同時抑制 TAL 活性。相反地，在黑暗條件下生長時 TAL 的活性較高 (Nambudiri *et al.*,



圖七 不同酸鹼度條件下酶活性強度的變無。  
(○) 為 0.1 M 硼酸鈉緩衝液，(●) 0.1 M 醋酸鈉緩衝液，(+) 0.1 M 醋酸鈉緩衝液。



圖八 溫度對酶活性的影響情形。  
(○) 苯丙氨酸去胺酶，(●) 酪氨酸去胺酶。

1973)。這些結果却是顯示 PAL 和 TAL 活性應是分別由兩種不同酶分子所表現。另一方面，從真菌，*Rhodotorula* 和矮種玉米的研究報告指出，於純化過程中 PAL 和 TAL 活性並不能分離，而且二酶的活性比率也保持一定。尤其是矮種玉米的純化酶，對苯丙氨酸和酪氨酸之催化作用同時會受到硼乙烷 (borohydride) 的抑制，而證實同一酶蛋白具有 PAL 和 TAL 雙重催化作用 (Uchiyama *et al.*, 1968; Havir *et al.*, 1971)。

臺南 11 號玉米白化幼苗 PAL 和 TAL 純化和性質探討的結果，明顯地支持了同一酶分子兼具雙重催化作用的說法。同時也引申了 PAL 和 TAL 為一同酶分子的性質，可能普遍存在於玉米的各種品系以及玉米的不同生長發育時期。然而和矮種玉米相比較，酶的性質也有差異之處：(1) TAL 最適 pH 值之差異，可能是因品系之不同而在酶分子結構上有所差別。此差別可能存在於組成酶分子的初級胺基酸排列。或是因細胞環境的不同，於酶分子形成時發生不同的修飾作用所致。(2) 反應溶液中加入 15 mM 苯丙氨酸對 TAL 活性並無明顯的抑制效果 (表二)，表示 PAL 和 TAL 活性雖由同一酶分子所表現，但可能分別在不同的催化位置。因此，苯丙氨酸和酪氨酸兩種受質，彼此間沒有明顯的競爭作用。當然，這些推論仍需要更直接的證據才足以肯定。

雙子葉植物類苯丙氨酸代謝對環境刺激的反應相當敏銳，而且都是對 PAL 活性的促進以引導代謝功能的加強。理論上，PAL 或 TAL 活性的單獨存在就能滿足類苯丙氨酸代謝的進行，為何單子葉植物多兼具 PAL 和 TAL 活性？單子葉植物的類苯

表二 使用混合受質測定酪胺酸去胺酶的活性  
反應前除加入含有表上所示不同的最後濃度之 *L*-苯丙胺酸的緩衝液 50  $\mu$ l, 皆如同  
材料和方法中所示的酪胺酸去胺酶活性測定法

condition	no phenylalanine		phenylalanine added (mM)		
		1.0	2.0	5.0	15.0
Activity of TAL (cpm)	11,331	12,353	13,067	15,036	10,361

丙酸代謝對各種環境刺激，是否也有高度的敏感性？目前以光照和植物調節素處理對玉米 PAL 和 TAL 活性影響的觀察則正在進行。

### 致 謝

本研究的完成承蒙行政院國家科學委員會的經費支持，謝瑞香小姐在實驗操作方面的協助，以及中央研究院植物研究所允許借用 liquid scintillation counter，在此謹致衷心的感謝。

### 參 考 文 獻

- AHMED, S. I. and T. SWAIN. 1970. The effect of light on the activity of enzyme of the aromatic pathway in peas and mung beans. *Phytochem.* **9**: 2287-2290.
- CAMM, E. L. and G. H. N. TOWERS. 1969. Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activity in *Sporobolomyces roseus*. *Phytochem.* **8**: 1407-1413.
- CAMM, E. L. and G. H. N. TOWERS. 1973. Phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochem.* **12**: 961-973.
- CHENG, C. K.-C. and H. V. MARSH, JR. 1968. Gibberellic acid-promoted lignification and phenylalanine ammonia-lyase activity in a dwarf pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol.* **43**: 1755-1759.
- DITTES, L., I. RISSLAND and H. MOHR. 1971. On the regulation of enzyme levels (PAL) in different organs of a plant (*Sinapis alba* L.). *Z. Naturforsch.* **26B**: 1175-1180.
- HAHLBROCK, K. and H. RAGG. 1975. Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures: Effects of inhibitors of RNA and protein synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **166**: 41-46.
- HAHLBROCK, K. and J. SCHROEDER. 1975. Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures: Increased rate of synthesis of phenylalanine ammonia-lyase. *Arch. Biochem. Biophys.* **166**: 47-53.
- HAVIR, E. A., P. D. REID and H. V. MARSH, JR. 1971. *L*-phenylalanine ammonia-lyase (maize): Evidence for a common catalytic site for *L*-phenylalanine and *L*-tyrosine. *Plant Physiol.* **48**: 130-136.
- KINDL, H. 1970. The regulation of the *L*-tyrosine ammonia-lyase activity by phenolic compounds. *Hoppe-seyler's Z. Physiol. Chem.* **351**: 792-798.
- KOUKOL, J. and E. E. CONN. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants: IV. Purification and properties of phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biochem.* **236**: 2692-2698.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. L. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MINAMIKAWA, T. and I. URITANI. 1965. Phenylalanine ammonia-lyase in sliced sweet potato roots. *J. Biochem.* **57**: 678-688.
- MINAMIKAWA, T. and I. URITANI. 1965. Phenylalanine ammonia-lyase in sweet potato roots: Inhibition by phenylpropanoids. *J. Biochem.* **58**: 53-59.
- NAMBUDIRI, M. D., C. P. VANCE and G. H. N. TOWERS. 1973. Effect of light on enzymes of phenylpropanoid metabolism and hispidin biosynthesis in *Polyporus hispidus*. *Biochem. J.* **134**: 891-897.
- NEISH, A. C. 1961. Formation of *m*- and *p*-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. *Phytochem.* **1**: 1-24.
- OGATA, K., K. UCHIYAMA and K. YAMADA. 1967. Metabolism of aromatic amino acid in microorganisms: II. Properties of phenylalanine ammonia-lyase of *Rhodotorula*. *Agr. Biol. Chem.* **31**: 600-606.
- REID, P. D., E. A. HAVIR and H. V. MARSH, JR. 1972. *L*-phenylalanine ammonia-lyase (maize): Partial purification and response to gibberellic acid and cycloheximide of *L*-phenylalanine and *L*-tyrosine ammonia-lyase activities. *Plant Physiol.* **50**: 480-484.
- TANAKA, Y. and I. URITANI. 1977. Synthesis

- and turnover of phenylalanine ammonia-lyase in root tissue of sweet potato injured by cutting. *Eur. J. Biochem.* **73**: 255-260.
19. TONG, W.F. and P. SCHOPFER. 1976. Phytochrome-mediated de novo synthesis of phenylalanine ammonia-lyase: An approach using pre-induced mustard seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **43**: 4017-4021.
20. TONG, W.F., P.M. LAU and S.J. HUANG. 1980. *L*-phenylalanine and *L*-tyrosine ammonia-lyase in rice: I. Some properties of the enzymes. *Biol. Bull. NTNU.* **15**: 67-74.
21. UCHIYAMA, K., H. YAMADA, T. TOCHIKURA and K. OGATA. 1968. Enzymatic determination of *L*-phenylalanine and *L*-tyrosine. *Agr. Biol. Chem.* **32**: 764-772.
22. YOSHIDA, S. 1969. Biosynthesis and conversion of aromatic amino acids in plant. *Ann. Rev. Plant Physiol* **20**: 41-62.
23. YOUNG, M.R., G.H.N. TOWERS and A.C. NEISH. 1966. Taxonomic distribution of ammonia-lyase for *L*-phenylalanine and *L*-tyrosine in relation to lignification. *Can. J. Bot.* **44**: 341-349.
24. ZIMMERMANN, A. and K. HAHNBROCK. 1975. Light-induced change of enzyme activities in parsley cell suspension cultures: Purification and some properties of phenylalanine ammonia-lyase. *Arch. Biochem. Biophys.* **166**: 54-62.
25. ZUCKER, M. 1972. Light and enzyme. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**: 133-156.

## *L*-phenylalanine and *L*-tyrosine Ammonia-lyase in Maize Seedling: Purification and Some Properties of Enzymes

WU-FU TONG

*Department of Biology, National Taiwan Normal University*

### ABSTRACT

*L*-phenylalanine and *L*-tyrosine ammonia-lyase were purified 27- and 11-fold from five-day-old etiolated maize seedlings through procedures of acetone precipitation, DEAE-sephadex ion exchange chromatography and sephadex G-150 gel filtration.

After acetone precipitation, the activity ratio of both enzymes maintained a relative constant level. Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase could not be separated throughout the purification. Partially purified enzymes shared the same pH optimum at 9.0 and were stable at 50°C for at least 30 min. At 60°C the activities of both enzymes decreased with the same rate of first order reaction.  $K_m$  values of phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase were  $1.25 \times 10^{-3}$  M and  $0.12 \times 10^{-3}$  M respectively.

The results suggest that the deamination for *L*-phenylalanine and *L*-tyrosine are catalysed by the same enzyme molecule.