

# 水稻的苯丙胺酸及酪胺酸去胺酶：

## I. 酶的一般性質

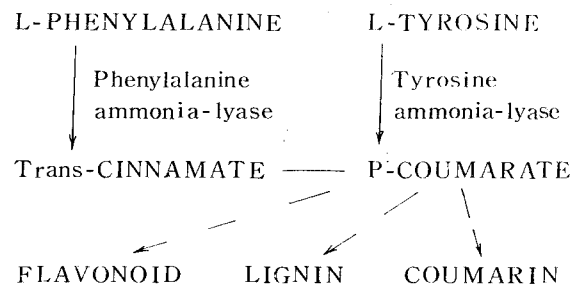
童武夫\* 魯平美\*\* 黃雪嬌\*\*\*

### 摘要

水稻白化幼苗的上胚軸抽取液，可以測得苯丙胺酸及酪胺酸兩種去胺酶活性。於40~60%硫酸銨分割部份含有約百分之六十的酶總活性。苯丙胺酸去胺酶在5至60mM苯丙胺酸濃度範圍內，測得之 $K_m$ 值為 $6.45 \times 10^{-3} M$ 。其最適當酸鹼值也如同其他植物組織的苯丙胺酸去胺酶一樣，為pH9.0。酪胺酸去胺酶之 $K_m$ 值則為 $0.67 \times 10^{-3} M$ 。其最適當酸鹼值為pH6.0，但在pH9.0下其活性仍有百分之七十。在試管中以氧化或還原劑處理酶抽取液，並不影響苯丙胺酸去胺酶的電泳性質，但卻促進酶分子聚集現象的加強。特別是以2mM oxidized glutathione 處理後，會使大部份酶活性消失。

### 緒言

類苯丙酸代謝 (phenylpropanoid metabolism) 廣泛地存在植物界，為高等植物的重要次代謝 (secondary metabolism) 之一。此代謝途徑之許多產物，已分別被證實具有重要的生理意義；例如木質素 (lignin) 為植物細胞壁之重要成份，關係到植物體的支持功能，木材材質，也能增強植物質對外物感染之抵抗力。宜斯匹定 (hispidin) 具有殺菌作用，其合成的意義為植物防禦功能之表現 (11)。植物的類質色素 (chymochromic pigments) 如花青素為花卉色素之主要成份，亦為類苯丙酸代謝途徑之產物 (7)。苯丙胺酸去胺酶是目前最常被利用於研究類苯丙酸代謝之觀察指標，因為它是此代謝途徑的關鍵酶。最早在1961年由Koukol 及 Conn 發表了此酶之催化性質 (9)。到1969年後Yoshida (15) 及 Zucker (19) 特別強調其在植物生理上的重要意義。除了苯丙胺酸外，酪胺酸亦可被利用為類苯丙酸代謝之起始受質。Neish (12) 研究酪胺酸去胺酶將酪胺酸轉化為香豆酸 (coumarate) 之催化性質 (圖一)。因此，理論上言，類苯丙酸代謝可以起始於苯丙胺酸或酪胺酸。根據



圖一 類苯丙酸代謝簡式

Young 等人 (16) 的調查報告顯示，從蕨類以上的高等植物才有明顯的類苯丙酸代謝。而且大多數受調查之植物組織常同時具有苯丙胺酸及酪胺酸兩種去胺酶活性。至於二酶如何在同一組織細胞中協調其生理功能，仍然不詳。玉米的研究報告曾指出，二酶活性是由同一酶分子所表現 (6)。水稻為亞洲最普遍的栽培作物，但有關水稻類苯丙酸代謝則毫無資料可查。本文即以水稻為材料，觀察苯丙胺酸、酪胺酸去胺酶之一般性質，以作為進一步研究之依據。

### 材料及方法

#### 1. 材料處理

\*國立師範大學生物學系

\*\*國立師範大學生物學系六八級學生

表一 硫酸銨濃度分割部份酶活性之分佈  
各分割部份沈澱收集透析後測得之蛋白含量及苯丙胺酸，酪胺酸去胺酶活性

conc. of (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	total protein (mg)	total PAL activity (U)	total PAL activity (%)	total TAL activity (ug coumarate produced/hr)	total TAL activity (%)
0-20%	762	0.72	3.1	0.54	12.4
20-40%	1836	7.67	32.8	----	----
40-60%	1911	15.01	64.1	3.03	70.4
60-80%	450	0	0	0.74	17.2

水稻品種，台中秈 3 號 (Taichung San 3) 為 1978 年秋收穀種，由台中農業改良場提供。稻種之發芽處理方法同前文 (3) 所述；於次氯酸鈉消毒、清洗後，置入已經高壓消毒之錐形瓶內，在溫度 30°C 生長櫃內之厚紙箱中發芽生長。

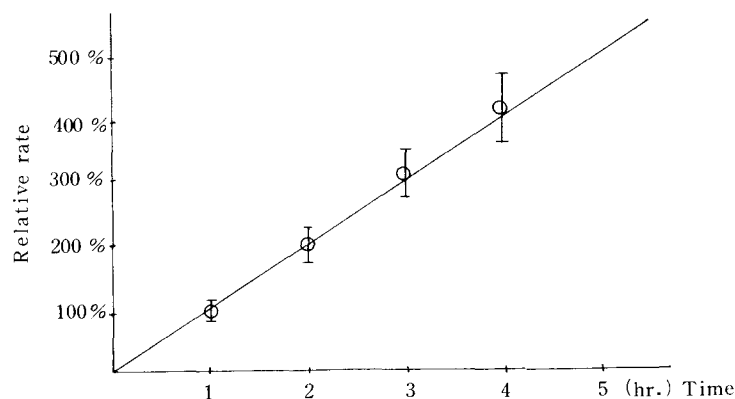
## 2. 酶的抽取

收集大量在黑暗發芽生長五天之幼苗上胚軸，剪碎後加入三倍體積之 0.1M 硼酸鈉緩衝液 (Borate buffer) pH 8.8，於攪汁機中攪碎抽取。將攪汁通過四層紗布後，濾液以 9,200 xg 於 4°C 下離心 20 分鐘，收集上清液。接著以不同濃度之硫酸銨處理上清液，分別收集離心後的沈澱部份，以 0.05M 硼酸鈉緩衝液，pH 8.8 溶之。最後於 4°C 下，以一公升之相同緩衝液過夜透析。各硫酸銨濃度分割部份，蛋白質含量及酶活性強度如表一所示。苯丙胺酸及酪胺酸去胺酶活性主要表現於 40

至 60% 硫酸銨分割部份，其強度約佔總酶活性百分之六十。酶的專一活性 (specific activity) 為粗抽取液之兩倍。文中之實驗結果，除非特別註明外，皆以此 40 至 60% 硫酸銨分割部份之濃縮酶抽取液為觀察對象。

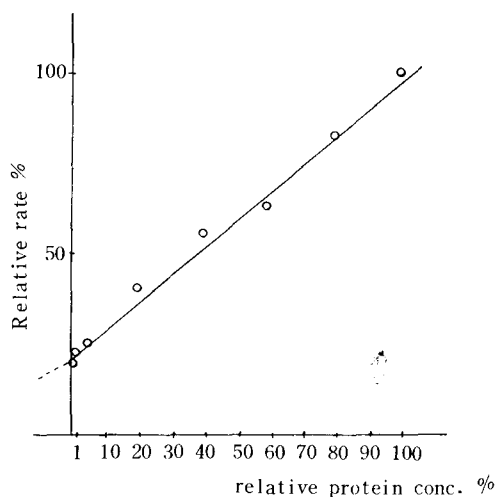
## 3. 酶活性之測定

苯丙胺酸去胺酶活性之測定是以 Zucker 之方法 (18) 為參考；作用溶液中含 2.5 ml, 0.1M 硼酸鈉緩衝液，pH 8.8, 0.5 ml, 60 mM 苯丙胺酸。於加入 0.2 ml 酶抽取液，均勻混合後，置 25°C 下作用 30 分鐘。作用後立刻以光譜儀 (Gilford spectrophotometer) 在 290 nm 波長之紫外光下測其吸光度。對照組是以緩衝液替代苯丙胺酸。實驗組與對照組吸光度之差值即為此時間單位內生成之苯丙烯酸 (trans-cinnamate) 所造成。於是每小時增加 1.0 吸光度為一活性單位 (U)。



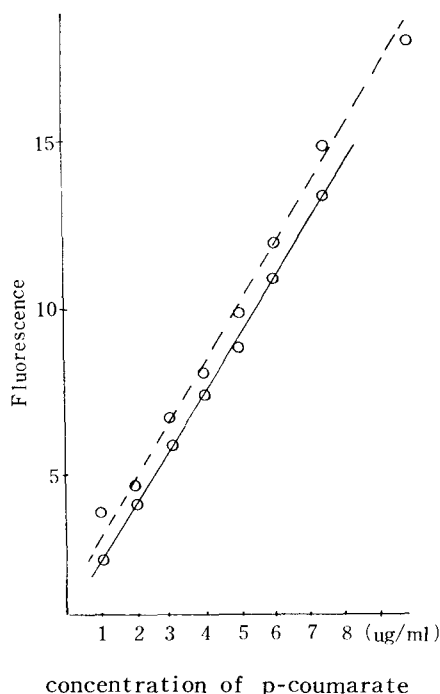
圖二 苯丙胺酸去胺酶活性與作用時間之相關性。  
以含 6 mg 蛋白之 40~60% 硫酸銨分割部份濃縮抽取液在 25°C 作用一小時吸光度之改變量當 100%。

酶活性之表現反映於波長 290 nm 吸光度之增高，則酶作用之初期速度 (initial velocity) 應可表現於吸光度與作用時間之關係。事實上，酶活性之測定至少在最初 4 小時內，其吸光度的增加與作用時間相互成直線關係 (圖二)。而且在同一作用時間內，吸光度之增加也與酶抽取液中之蛋白質濃度成直線式的正相關 (圖三)。顯示實驗所應用之 40~60% 硫酸銨部份之濃縮液，雖非為純化酶，但



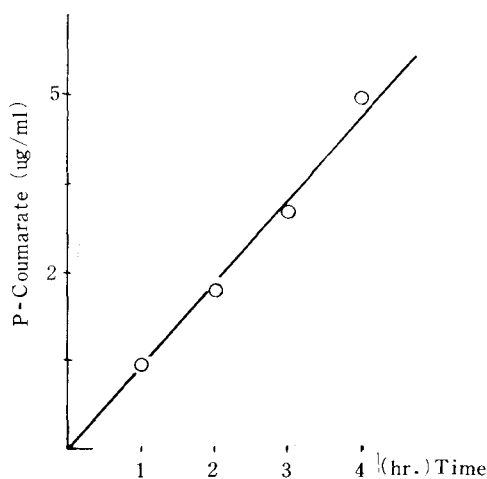
圖三 苯丙胺酸去胺酶活性與抽取液中蛋白質含量之關係。以含 10mg 蛋白之 40~60% 硫酸銨分割部份濃縮液當 100，而稀釋成各種不同濃度，並分別測定其作用 30 分鐘之吸光度改變量。

其所含之非酶分子並不干擾酶活性之測定。酪胺酸去胺酶活性之測定是根據 Neish 之方法 (12)，利用香豆酸 (coumarate) 之螢光性質來測定；作用溶液中含 3.0 ml, 0.1 M 硼酸鈉緩衝液，pH 8.8, 3.0 ml, 5.0 mM 酪胺酸。測定時加入 0.2 ml 酶抽取液，在 25°C 下，作用 2 小時。以螢光測定儀 (Turner fluorometer)，用波長 365 nm 初級濾鏡及波長 435 nm 之次級濾鏡測定螢光強度。圖四為香豆酸濃度與螢光強度之關係。在 8  $\mu\text{g/ml}$  之濃度以下，螢光強度與香豆酸濃度呈直線關係。即使溶液中除香豆酸外，還含有 1.0 mM 酪胺酸亦對螢光強度之測定沒有太大的干擾作用。其螢光強度也與香豆酸濃度呈正相關，而且與不含酪胺酸者之直線相互平行。酶的作用時間也與



圖四 香豆酸之螢光標準線。實線為純香豆酸之螢光強度。虛線為含有 1.0 mM 酪胺酸時，香豆酸之螢光強度。

螢光強度成正比 (圖五)。至少在最初 4 小時內，香豆酸的生成量與酶的作用時間呈直線關係。



圖五 酪胺酸去胺酶活性與作用時間之關係。香豆酸之生成量是由螢光強度換算而得。

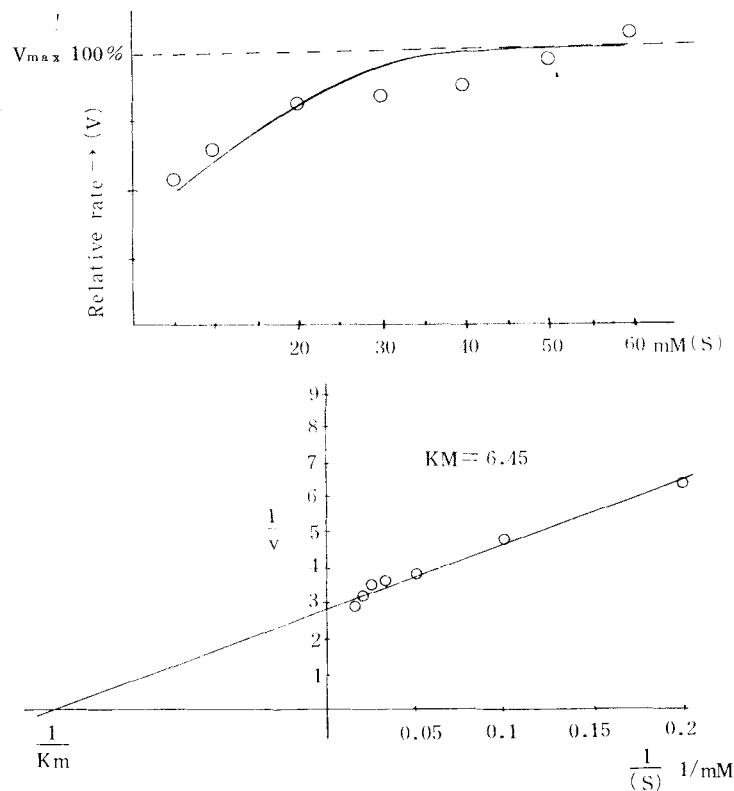
#### 4. 非連續性電泳 (Disc electrophoresis)

非連續性電泳是參考 Davis 方法 (4)，配製 7.5% 聚丙烯醯胺膠體 (polyacrylamide gel)。電泳時之電流強度為每膠管千分之四安培。使用溴酚藍 (bromophenol blue) 為指示劑。當指示劑移動到膠體尾端時停止，費時約 3 小時。電泳後之膠體先以蒸餾水沖洗，然後一組以 0.125% 可馬西藍 (coomassie blue) 染色 1 小時，再以含 10% 甲醇，7% 醋酸之水溶液退色之。最後以光譜儀在 400 nm 波長下掃描蛋白帶，掃描速度為每分鐘兩公分，記錄器之速度亦為每分鐘兩公分。另一組膠體則進行切片，每薄片厚度為 0.2 公分，然後分別浸入測定酶活性之作用溶液，在 25°C 下作用 15 小時。作用後分別測定其波長 290 nm 之吸光強度。

### 結果與討論

水稻幼苗上胚軸的抽取液中，不但有苯丙胺酸

去胺酶活性也含有酪胺酸去胺酶。利用 40~60% 硫酸銨的分割，再經透析後可獲得約百分之六十的酶總活性 (表一)。此酶濃縮液的純化程度雖然祇有兩倍，但由於小分子的去，酶濃縮液中所含的非酶之大分子並不會對酶活性的測定有所干擾 (圖二、三、五)。苯丙胺酸及酪胺酸去胺酶對受質濃度之反應有明顯的差異；在 30 mM 苯丙胺酸濃度下，苯丙胺酸去胺酶之活性就接近其最大作用速度 ( $V_{max}$ )。於 5 至 30 mM 受質濃度範圍內，其作用速度之加強幅度並不甚急劇。由 5 至 60 mM 之測定範圍內，其米查理斯常數 ( $K_m$ ) 為  $6.45 \times 10^{-3}$  M (圖六)。玉米、馬鈴薯及荷蘭芹 (parsley) 的純化酶，其活性在高濃度受質條件下表現有負性協調 (negative cooperativity) 現象 (5, 6, 17)。如果和其他植物組織相比較，水稻的苯丙胺酸去胺酶之  $K_m$  值顯然是偏高。因此有可能是酶抽取液中所含大量的非酶分子對酶及受質的相互作用有所影響，

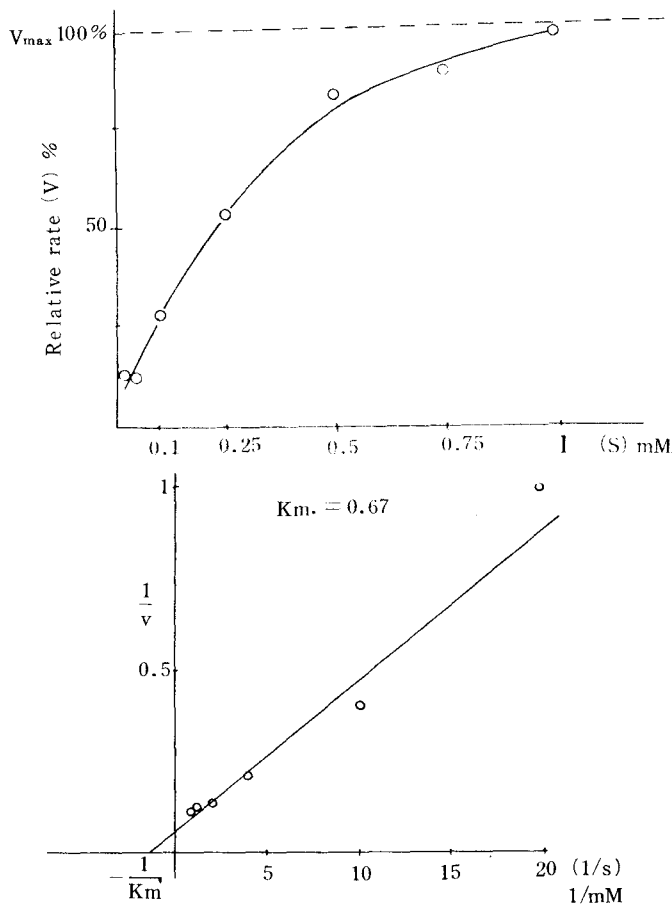


圖六 苯丙胺酸去胺酶活性與受質濃度之關係。  
含 6 mg 蛋白之酶濃縮液，在不同受質濃度下作用 30 分鐘所測得之活性速率。上圖表最大活性速率 ( $V_{max}$ )，下圖表米查理斯常數 ( $K_m$ )。

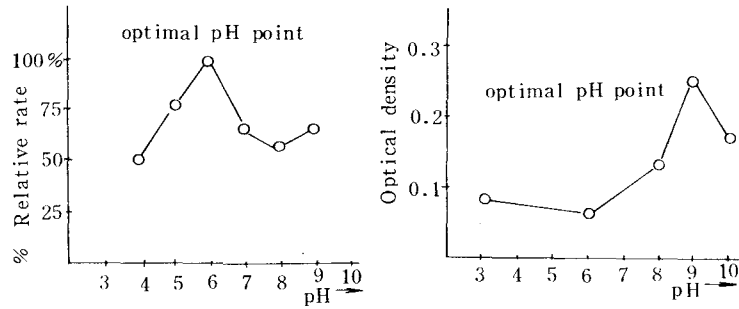
而造成偏高的 $K_m$ 值。也可能在 $5\text{mM}$ 以下的低受質濃度範圍內會有較低的 $K_m$ 值出現。相對地，酪胺酸去胺酶活性在 $1.0\text{mM}$ 受質濃度下就接近了最大作用速率。其 $K_m$ 值為 $0.67 \times 10^{-3}\text{M}$  (圖七)。顯示了酶與受質之親和力相當強。苯丙胺酸及酪胺酸去胺酶之 $K_m$ 值相差約為10倍。與水稻同屬於單子葉植物的玉米也同時含有苯丙胺酸及酪胺酸去胺酶。二酶的 $K_m$ 值也是相差10倍；在矮種玉米分別為 $0.27 \times 10^{-3}\text{M}$ 及 $0.029 \times 10^{-3}\text{M}$  (6)。在台南11號玉米則分別為 $1.25 \times 10^{-3}\text{M}$ 及 $0.12 \times 10^{-3}\text{M}$  (14)。從這些已有的資料顯示，這種一致性的 $K_m$ 值差異似乎不是偶然。其原因可能是在酶對受質，即苯丙胺酸，酪胺酸物理性質差異的適應表現。酪胺酸的水溶性低。而細胞內的化學反應皆得在水溶

液狀態下進行。因此細胞內不可能含有高濃度可溶性的酪胺酸。於是酪胺酸去胺酶必須具有較強的受質親和力，才能發揮其應有的生理功能。

不同植物組織的苯丙胺酸去胺酶活性表現之最適酸鹼度皆在 $\text{PH } 8.5 \sim 9.0$ 範圍內 (2, 17)。水稻的苯丙胺酸去胺酶也不例外，在 $\text{PH } 9.0$ 時活性最高 (圖八)。然而酪胺酸去胺酶的活性高峯則表現於中性偏酸的範圍內，但在 $\text{PH } 9.0$ 下也有約百分之七十的活性。矮種玉米的酪胺酸去胺酶活性高峯則是在 $\text{PH } 7.7$ ，於 $\text{pH } 9.0$ 時也有約百分之八十的活性 (17)。顯示苯丙胺酸及酪胺酸去胺酶的活性中心 (active site) 對酸鹼度的反應並不完全一致。二酶活性對酸鹼度反應之差異性，可能具有其特定的生理意義。酶的活性表現可以由酶分子環境酸鹼



圖七 酪胺酸去胺酶活性與受質濃度之關係。  
含 $6\text{mg}$ 蛋白之酶濃縮液，在不同受質濃度下作用 $3$ 小時所測得之活性速率。上圖表最大活性速率 ( $V_{max}$ )，  
下圖表米查里斯常數 ( $K_m$ )。

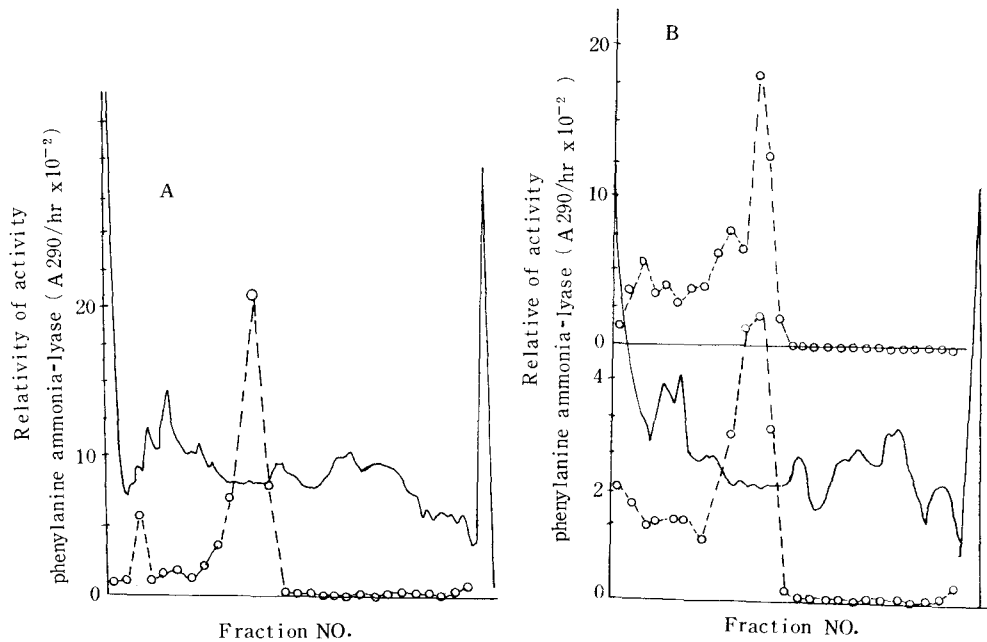


圖八 酸鹼度對酶活性之影響。

酶活性的測定於 pH 3~8 範圍內是使用 0.16M Barbitol Sodium-Sodium acetate-HCl 緩衝液，在 pH 9~10 則是用 0.1 M Borate 緩衝液。左圖為酪胺酸，右圖為苯丙胺酸去胺酶。

性的改變而加以調節。Young 等人 (16) 的調查報告指出，在高等植物組織中同時有苯丙胺酸及酪胺酸去胺酶存在的情形也相當普遍。在生理上，二酶共同負責類苯丙酸代謝途徑。此代謝途徑的進行可以由酶分子或酶的活性中心物理性質之差異，以獲得適當的調節。而不致因細胞內微細環境之改變，而

突然中止此代謝途徑之功能。此外，Kindl 對大麥酪胺酸去胺酶的調查結果指出，苯丙胺酸及酪胺酸去胺酶可以由其對不同的酚類化合物 (phenolic compounds) 之敏感性而鑑別之 (8)。因此類苯丙酸代謝途徑之中間產物，也可能成為調節二酶活性表現之重要因素。



圖九 苯丙胺酸去胺酶之電泳分析，A. 使用未經處理之酶濃縮液，B. 上圖為酶濃縮液以 2mM Dithiothreitol 於 4°C 作用 18 小時，下圖則是以 2mM oxidized glutathione 於 4°C 作用 18 小時之電泳結果。實線為蛋白帶之分佈，虛線為測得之酶活性。

除了極少數的報告，認為苯丙胺酸去胺酶有異構酶存在外 (1,10)，大多數的研究結果都祇發現酶分子為單一形態，而且其分子量也都一致地在 300,000 左右 (2,17)。酶分子在低離子強度條件下，很容易出現聚集的現象 (13)。對水稻的苯丙胺酸去胺酶的電泳分析，也祇是見到單一酶帶 (圖 9A)。如果將酶抽取液經過氧化或還原處理，則明顯地出現了在電場中移動緩慢之高分子 (圖 9B)。經過氧化處理的結果，除聚集現象的加強外，大部份酶活性也因而消失。馬鈴薯、玉米的苯丙胺酸去胺酶活性會因氧化硼鈉 (sodium borohydride) 的還原作用而受到強烈的抑制 (6,17)。然而水稻的酶抽取液經過 2.0 mM Dithiothreitol 之處理，卻祇促成聚集現象的加強，酶活性並未因此而受到明顯的抑制。也許是在電泳期間發生氧化作用，而降低了還原性的抑制作用。因為在配製電泳膠時加入 Dithiothreitol 會使膠體無法凝固，而不能使用。相對地，氧化劑的加入則無此現象。氧化、還原的處理都能造成酶分子的聚集，但並不影響酶分子的電泳位置。顯示氧化、還原的處理並不會改變酶分子的表面總電荷。從電泳後的蛋白分佈來說，氧化處理的結果似乎也有增加高分子的傾向。

### 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 (1973). Phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochem.* 12, 961-973.
- Chen, K. L., and W. F. Tong (1978). Effect of light and anaerobic condition on the morphogenesis and the catalase activity of rice seedlings. *Biol. Bull. NTNU* 13, 39-46.
- Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis: I. Method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Havir, E. A., and K. R. Hanson (1968). L-phenylalanine ammonia-lyase. II. Mechanism and kinetic properties of the enzyme from potato tubers. *Biochem.* 7, 1904-1914.
- 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.
- Hess, D. (1975). *Plant physiology*, pp. 117-136.
- 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.
- Minamikawa, T., and I. Uritani (1965). Phenylalanine ammonia-lyase in sliced sweet potato roots. *J. Biochem.* 57, 678-688.
- 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.
- Schopfer, P. (1971). Die Phenylalaninammoniumlyase des Senfkeimlings ein elektrophoretisch einheitliches Enzym. *Planta* 99, 339-346.

14. Tong, W. F. (1980). L-phenylalanine and L-tyrosine ammonia-lyase. I. Purification and some properties of the enzymes from maize seedlings in preparation.
15. Yoshida, S. (1969). Biosynthesis and conversion of aromatic amino acids in plant. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20, 41-62.
16. 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.
17. Zimmermann, A., and K. Hahlbrock (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.
18. Zucker, M. (1965). Induction of PAL by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissues. *Plant Physiol.* 40, 779-784.
19. Zucker, M. (1972). Light and enzyme. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23, 133-156.

## L-Phenylalanine and L-Tyrosins Ammonia-lyase in Rice:

### I. Some Properties of the Enzymes

Tong, W. F., P. M. Luu, and S. J. Huang

#### ABSTRACT

Ammonia-lyase activities for both L-phenylalanine and L-tyrosine can be detected in the extract of epicotyls of etiolated rice seedlings. About 60% of the activities of both enzymes could be recovered in the fraction of 40 to 60% ammonium sulfate precipitation.

$K_m$  value of phenylalanine ammonia-lyase which was determined in the range of substrate concentration from 5 to 60 mM, was  $6.45 \times 10^{-3}$  M. The pH optimum of enzyme was 9.0 as the same as that in other plant tissues. Whereas, the  $K_m$  value of tyrosine ammonia-lyase was  $0.67 \times 10^{-3}$  M. Its pH optimum was observed at 6.0 and about 70% activity was measured at pH 9.0. After in Vitro treatment of enzyme extract by oxidative or reductive reagents the electrophoretic pattern of phenylalanine ammonia-lyase was unaffected, but the aggregation of enzyme molecules exhibited more conspicuous. Most of the enzyme activity was lost by incubation of 2 mM oxidized glutathione.