

技术与方法 Techniques and Method

盐生植物盐地碱蓬酪氨酸酶的酶学特性

陈天舒, 修妍伟, 王琼, 王宝山*

山东师范大学生命科学学院逆境植物重点实验室, 济南250014

摘要: 酪氨酸酶是植物甜菜素生物合成的限速酶, 但是, 其酶学特性尚不了解。以黑暗培养3 d的盐地碱蓬幼苗为材料, 采用NaF抽提、饱和硫酸铵沉淀法提取盐地碱蓬中的酪氨酸酶, 以研究其酶学特性。结果表明, 酪氨酸酶氧化活性的最适温度为35 ℃, 最适pH值为6.6, 最适条件下 $K_m=1.09 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max}=71.43 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$; 酪氨酸酶羟化活性的最适温度为40 ℃, 最适pH值为6.6, 最适条件下 $K_m=3.16 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max}=0.645 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$ 。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 是盐地碱蓬酪氨酸酶的强效抑制剂, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 几乎完全抑制酪氨酸酶氧化及羟化活性。而 $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 可以显著激活酪氨酸酶的氧化及羟化活性, 分别为对照的126%和128.2%。这些结果表明盐地碱蓬中酪氨酸酶的羟化活性是影响甜菜红素合成速率的关键, 也为深入研究盐地碱蓬酪氨酸酶在甜菜素合成中的作用及其与环境之间的关系奠定了基础。

关键词: 盐地碱蓬; 酪氨酸酶; 氧化活性; 羟化活性; 影响因子

Enzymatic Characteristics of Tyrosinase in Euhalophyte *Suaeda salsa*

CHEN Tian-Shu, XIU Yan-Wei, WANG Qiong, WANG Bao-Shan*

Key Lab of Plant Stress, College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

Abstract: Tyrosinase is the first key enzyme in betalains biosynthesis of plants while its enzymatic characteristics remain unclear. In order to investigate the properties of tyrosinase, 3-day-old *Suaeda salsa* seedlings (cultured in dark) were used and the tyrosinase was partially purified by ammonium sulphate $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ precipitation after being extracted by sodium fluoride (NaF). The results indicated that, in terms of *O*-diphenol oxidation activity, the optimum temperature and pH values were 35 ℃ and 6.6, the $K_m=1.09 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $V_{\max}=71.43 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$; and as for the activity of monophenol hydroxylation, the optimum temperature and pH value were 40 ℃ and 6.6, the $K_m=3.16 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $V_{\max}=0.645 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ was the potent inhibitor of tyrosinase, and $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ almost completely inhibited the activity of *O*-diphenol oxidation and monophenol hydroxylation. Moreover, the activity of *O*-diphenol oxidation and monophenol hydroxylation was significantly activated by $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, 126%、128.2% of control respectively. These results suggested that tyrosinase hydroxylation activity of *S. salsa* played a key role in betalains biosynthesis and laid the foundation of deep investigating the role of tyrosinase in betalains biosynthesis in plants and its interaction with environment factors.

Key words: *Suaeda salsa* L.; tyrosinase; oxidation activity; hydroxylation activity; impact factor

盐地碱蓬(*Suaeda salsa* L.)为积盐型真盐生植物, 能生长在滩涂及重盐碱地, 对保持和重建盐地生态系统有重要作用(赵可夫和李法曾1998)。在山东省东营黄河三角洲分布的盐地碱蓬有两种表现型: 在滨海的潮间带或者部分涝洼积水地带生长的野生盐地碱蓬在整个生长期其植株地上部分皆为紫红色, 而在地势较高或者距离海边较远的地方植株则呈现绿色。王长泉等(2006b)已鉴定该颜色表型差异源自盐地碱蓬植株体内甜菜红素含量的不同。盐地碱蓬作为一种真盐生植物, 其耐盐机理已有较为广泛的研究(Li等2011; Song等2009)。但是盐地碱蓬甜菜红素积累的调控机制目

前只有初步的探究(Zhao等2010)。而深入研究盐地碱蓬甜菜红素积累的机制, 对于揭示盐生植物的光合作用、生态进化、耐盐适应、生长发育及环境因子对其表型影响具有重要意义。

甜菜素是一种水溶性含氮色素, 溶于水, 因最早发现于甜菜根中而得名, 是吡啶衍生物, 包括甜菜红素(betacyanin)和甜菜黄素(betaxanthin)两种形式(王长泉等2006a)。甜菜素在花瓣、雄蕊、种子

收稿 2011-08-04 修定 2011-09-19

资助 国家自然科学基金(30870138和31070158)和国家支撑计划项目(2009BADA7B05)。

* 通讯作者(E-mail: bswang@sdu.edu.cn; Tel: 0531-86180197)。

和果实等繁殖器官的特定发育阶段合成;另外,它也存在营养器官中,但其受环境因子的高度调控(Sasaki等2005)。甜菜素对植物具有重要作用,例如,甜菜素作为植物保护性反应而合成的一种次生代谢物质,可以提高植物的抗病菌的能力;还可以作为紫外线的过滤器,保护植物免受或者降低紫外线损伤。此外,甜菜素还具有清除氧自由基的潜力,能够降低逆境下植物体内过氧化胁迫(Du等2006;王长泉等2006a;Butera等2002)。

甜菜素生物合成过程中有3个关键酶:酪氨酸酶、4,5-多巴双加氧酶和5-*O*-葡萄糖基转移酶。其中酪氨酸酶被认为是甜菜素合成的第一个关键酶:酪氨酸在酪氨酸羟化酶的作用下形成*L*-多巴(*L*-3,4-二羟基丙氨酸);随后多巴在酪氨酸酶氧化酶的作用下形成多巴醌(Schliemann等1999)。

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1)根据底物的不同被命名为酚酶、儿茶酚氧化酶、漆酶、多酚氧化酶、单酚氧化酶、联二酚氧化酶等。酪氨酸酶本身具有羟化和氧化双重活性,其活性中心包含2个铜离子结合位点。在催化过程中,这2个铜离子位点以3种形式存在,分别是氧化态(Eoxy)、还原态(Emet)和脱氧态(Edeoxy)(陈清西和宋康康2006)。

通常高等植物中,多酚氧化酶没有羟化酶活性或羟化活性很低,而酪氨酸酶的羟化作用却是甜菜素合成过程中的第一个酶促反应。那么,在盐地碱蓬中,作为甜菜红素合成的第一个关键酶的酪氨酸酶,其是否有高水平羟化活性;其羟化活性和氧化活性的最适条件和相互作用的环境因子又如何?迄今,已有很多关于真菌的酪氨酸酶和高等植物多酚氧化酶的提取及其酶学特性研究报道(Yamamoto等2001)。但是,对高等植物酪氨酸酶的提取及其酶学特性未见报道。本文在前人研究的基础上,第一次对盐生植物盐地碱蓬酪氨酸酶的羟化和氧化双重活性的酶学特性做了系统研究,为进一步研究盐地碱蓬生长发育及环境因子对酪氨酸酶表达和活性的影响,及酪氨酸酶在甜菜素合成过程中的作用奠定基础。

材料与方法

1 植物实验材料

盐地碱蓬(*Suaeda salsa* L.)种子采自山东省东

营黄河三角洲盐碱地,2~4 °C保存备用。取籽粒饱满大小一致的种子,用去离子水冲洗3次后播种于盛有细沙的塑料盆中,置于培养箱(HPG-280BX,北京东联哈尔仪器制造有限公司)中黑暗培养,每天浇1/2 Hoagland培养液,温室温度为28~34 °C,相对湿度为60%。

2 盐地碱蓬酪氨酸酶的提取

盐地碱蓬酪氨酸酶的提取方法参考Kouakou等(2009)的方法并加以改进。

(1)取黑暗培养3 d的盐地碱蓬幼苗2 g,加入0.1 mol·L⁻¹的预冷的NaF 4 mL,冰浴研磨。(2)11 000 r·min⁻¹,4 °C离心15 min。(3)取上清,记录体积,加入等体积的饱和硫酸铵(4.1 mol·L⁻¹,25 °C),产生白色沉淀,4 °C沉淀2 min。(4)5 000 r·min⁻¹,4 °C离心5 min。(5)弃上清,加入200 μL,pH值4.8的0.1 mol·L⁻¹的柠檬酸盐缓冲液,重悬。(6)2 000 r·min⁻¹,4 °C离心5 min。(7)取上清,加入50 μL甘油。此溶液即为所需酶液。液氮-70 °C冷冻保存,备用。

3 酪氨酸酶氧化活性测定

酪氨酸酶氧化活性分析参考Peñalver等(2005)的方法并修改。

将0.1 mol·L⁻¹的柠檬酸缓冲溶液配制的含8 mmol·L⁻¹的*L*-多巴(Sigma-Aldrich)的反应体系中加入酶液后,在475 nm (log ϵ =0.36)处,1 min时测定吸光度(T6 spectrophotometer,北京普析通用仪器有限公司)。以缓冲液和酶的混合物(无底物)作参比溶液。

计算公式: $E = (AV_T V_0) / (V \epsilon t m)$ 。其中, E : 每克材料中酶的活性, A : 最大吸收处吸光度, t : 反应时间, ϵ : 摩尔吸收系数, V : 加入反应体系的酶体积, V_T : 反应体系的体积, V_0 : 原料所得的酶溶液的总容积, m : 原材料总质量(g)。

3.1 不同pH值下酪氨酸酶氧化活性的测定

分别用pH值为3.8、4.8、5.8、6.6、7.3的柠檬酸缓冲溶液配制反应体系,25 °C温浴10 min,按上述方法测定酪氨酸酶氧化活性。

3.2 不同温度下酪氨酸酶氧化活性的测定

将pH值4.8的柠檬酸缓冲溶液配制的反应体系,分别于25、35、40、45 °C的水浴锅中温浴10 min,按上述方法测定酪氨酸酶氧化活性。

3.3 酪氨酸酶氧化活性在pH值6.6和35 °C时 K_m 和 V_{max} 的测定

用pH值6.6的柠檬酸缓冲溶液配制分别含0.5、1、2、4和8 mmol·L⁻¹的L-多巴的反应体系, 35 °C下温浴10 min, 按上述方法测定酪氨酸酶氧化活性。

3.4 不同浓度Na₂S₂O₃下酪氨酸酶氧化活性的测定

在pH值6.6的柠檬酸缓冲溶液配制的反应体系中分别加入终浓度为0、0.05和0.1 mol·L⁻¹的Na₂S₂O₃, 按上述方法测定酪氨酸酶氧化活性。

3.5 不同浓度Cu²⁺下酪氨酸酶氧化活性的测定

在pH值6.6的柠檬酸缓冲溶液配制的反应体系中分别加入终浓度0、0.0025、0.01、0.1和0.5 mmol·L⁻¹的Cu²⁺, 按上述方法测定酪氨酸酶氧化活性。

4 酪氨酸酶羟化活性测定

酪氨酸酶羟化活性分析参考Espín等(2000)的方法并修改。

将0.1 mmol·L⁻¹的柠檬酸缓冲溶液配制的含4 mmol·L⁻¹的L-酪氨酸(北京鼎国生物技术有限公司, 日本分装)和2 mmol·L⁻¹的MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazonehydrochloride monohydrate, Sigma-Aldrich)的反应体系中加入酶液后, 在484 nm (log_e=2.23)处, 8 min时测定吸光度; 参比溶液为相同体系中加入煮沸的酶液。计算公式同氧化活性。

4.1 不同pH值下酪氨酸酶羟化活性的测定

分别用pH值3.8、4.8、5.8、6.6、7.3的柠檬酸缓冲溶液配制反应体系, 25 °C温浴10 min, 按上述方法测定酪氨酸酶羟化活性。

4.2 不同温度下酪氨酸酶羟化活性的测定

将pH值6.6的柠檬酸缓冲溶液配制的反应体系, 分别于25、35、40、45 °C的水浴锅中温浴10 min, 按上述方法测定酪氨酸酶羟化活性。

4.3 酪氨酸酶羟化活性在pH值6.6和40 °C时 K_m 和 V_{max} 的测定

用pH值6.6的柠檬酸缓冲溶液配制分别含0.25、0.5、1、2和4 mmol·L⁻¹的L-酪氨酸, 加入终浓度为2 mmol·L⁻¹的MBTH, 摇匀并在40 °C温浴10 min, 按上述方法测定酪氨酸酶羟化活性。

4.4 不同浓度Na₂S₂O₃下酪氨酸酶羟化活性的测定

在pH值6.6的柠檬酸缓冲溶液配制的反应体系分别加入终浓度0、0.05、0.1 mol·L⁻¹的Na₂S₂O₃, 按上述方法测定酪氨酸酶羟化活性。

4.5 不同浓度Cu²⁺下酪氨酸酶羟化活性的测定

在pH值6.6的柠檬酸缓冲溶液配制的反应体系中分别加入终浓度0、0.0025、0.01、0.1和0.5 mmol·L⁻¹的Cu²⁺, 按上述方法测定酪氨酸酶羟化活性。

5 数据分析

实验数据为平均值±SD。平均值间的多重方差检验均为SPSS 11.0的Duncan检验, 差异水平为P<0.05。

实验结果

1 盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性

酪氨酸酶的氧化活性与高等植物的多酚氧化酶功能相同, 在甜菜红素合成过程中, 酪氨酸酶氧化活性是催化L-多巴氧化生成多巴醌。所以, 研究酪氨酸酶的氧化活性及其影响因素对于了解酪氨酸酶对甜菜红素合成过程的作用具有重要意义。

1.1 pH值对盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的影响

如图1所示, 盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的最适pH值为6.6。在pH值大于5时随着pH值的增加活性升高, 在pH值为6.6时活性最大, 达到最大后又随着pH值的增加而降低, 在pH值小于5时活性很低。

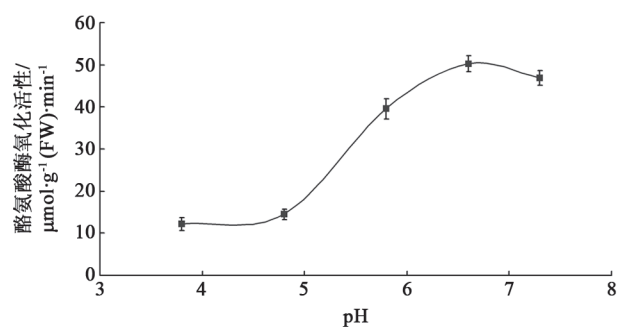


图1 pH值对盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的影响
Fig.1 Effect of pH on tyrosinase oxidation activity of *Suaeda salsa*

图中数据为3个重复的平均值±SD。下同。

1.2 温度对盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的影响

由图2看出, 酪氨酸酶的氧化活性在25 °C时较

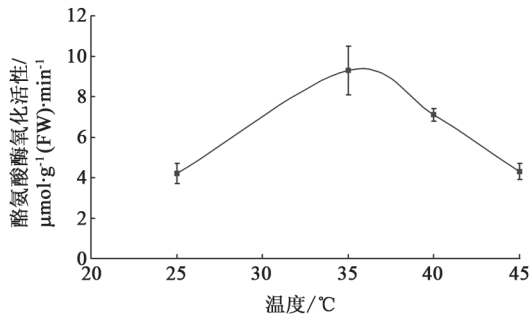


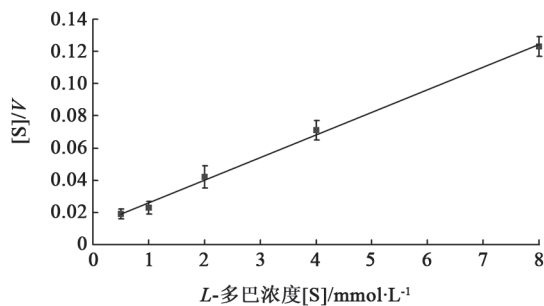
图2 温度对盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的影响

Fig.2 Effect of temperature on tyrosinase oxidation activity of *Suaeda salsa*

低, 随着温度的上升活性直线上升, 到35 °C时达到最大值, 而后随着温度的升高, 酶的活性又逐渐降低, 表明其最适温度为35 °C。

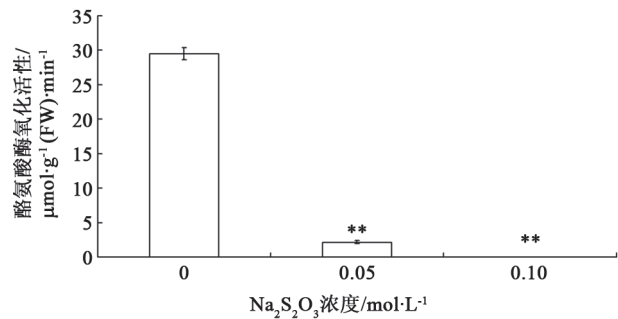
1.3 盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性在pH值6.6和35 °C时的 K_m 和 V_{max}

由图1和图2可见, 盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的最适pH值和最适温度分别为6.6和35 °C, 在最适pH值和最适温度条件下, 以L-多巴的浓度[S]为横坐标, L-多巴的浓度与反应速率的比值[S]/V为纵坐标作图得到 K_m 和 V_{max} 。如图3所示, 直线的斜率= $1/V_{max}$, 直线与X轴的交点即为 $-K_m$, 即酪氨酸酶氧化活性的 $K_m=1.09 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{max}=71.43 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{min}^{-1}$ 。

图3 盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的 K_m 和 V_{max} 的测定Fig.3 K_m and V_{max} of tyrosinase oxidation activity of *Suaeda salsa*

1.4 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 对盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的影响

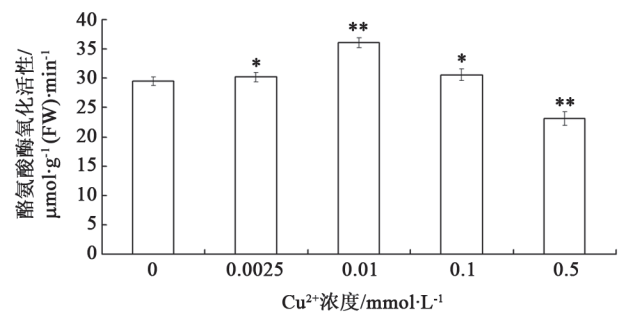
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为酪氨酸酶的抑制剂, 在果蔬保鲜及新型的生物杀虫剂的应用中起重要作用。由图4可知, 在加入 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 后酪氨酸酶氧化活性几乎完全丧失, 所以, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 也是盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的强效抑制剂。

图4 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 对盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的影响Fig.4 Effect of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ on tyrosinase oxidation activity of *Suaeda salsa*

图中数据为3个重复的平均值 \pm SD。**表示与对照(未加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)相比0.01水平差异极显著。

1.5 Cu^{2+} 浓度对盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的影响

酪氨酸酶活性中心含有2个二价铜离子, Cu^{2+} 的浓度可能对酪氨酸酶的活性有一定的影响。如图5所示, 低浓度的 Cu^{2+} 可以激活酪氨酸酶的氧化活性, 而太高浓度的 Cu^{2+} 反而会抑制酪氨酸酶的氧化活性。最适 Cu^{2+} 浓度在 $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右, 是没有加入 Cu^{2+} 时活性的126%。

图5 Cu^{2+} 浓度对盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性的影响Fig.5 Effect of Cu^{2+} on tyrosinase oxidation activity of *Suaeda salsa*

图中数据为3个重复的平均值 \pm SD。*表示与对照(未加入 Cu^{2+})相比0.05水平差异显著; **表示0.01水平差异极显著。

2 盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性

盐地碱蓬甜菜红素合成过程中的酪氨酸酶具有很高的羟化酶活性, 它催化酪氨酸羟化反应形成L-3,4-二羟基丙氨酸(L-多巴), 是甜菜红素合成过程中的第一步。

2.1 pH值对盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性的影响

由图6可看出, 酪氨酸酶的羟化活性最大时的

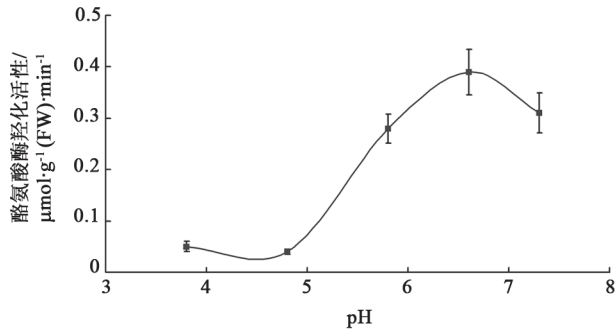


图6 pH值对盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性的影响
Fig.6 Effect of pH on tyrosinase hydroxylation activity of *Suaeda salsa*

pH值为6.6。在pH值大于5.0时随着pH值的增加活性升高, 达到最大后又随着pH值的增加而降低。与氧化活性一样在pH值小于5.0时活性很低。

2.2 温度对盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性的影响

如图7所示, 酪氨酸酶羟化活性的最适温度为40℃。随着温度的升高或降低, 酶的活性均降低, 并且随着温度的升高活性迅速降低。

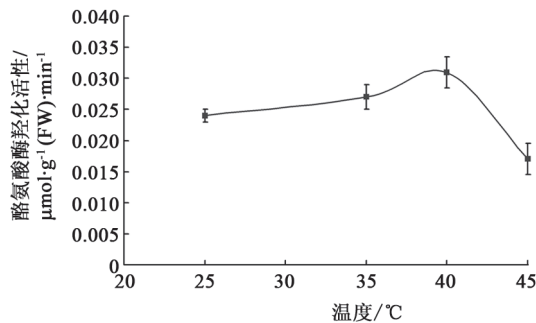


图7 温度对盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性的影响
Fig.7 Effect of temperature on tyrosinase hydroxylation activity of *Suaeda salsa*

2.3 盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性在pH值6.6和40℃时的K_m和V_{max}

由图6和图7可知, 盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性的最适pH值和最适温度分别为6.6和40℃, 在最适pH值和最适温度条件下, 以L-酪氨酸的浓度[S]为横坐标, L-酪氨酸的浓度与反应速率的比值[S]/V为纵坐标作图得到K_m和V_{max}。如图8所示, 酪氨酸酶羟化活性的K_m=3.16 mmol·L⁻¹, V_{max}=0.645 μmol·g⁻¹(FW)·min⁻¹。

2.4 Na₂S₂O₃对盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性的影响

由图9可知, Na₂S₂O₃对酪氨酸酶羟化活性的影

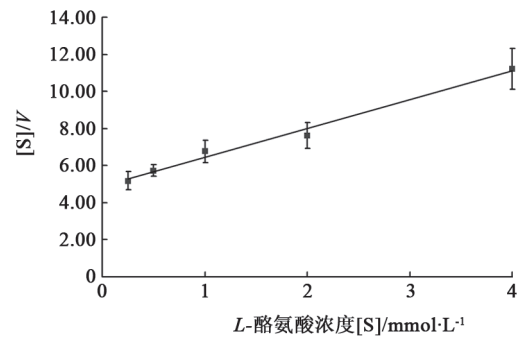


图8 盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性的K_m和V_{max}的测定
Fig.8 Determination of K_m and V_{max} of tyrosinase hydroxylation activity of *Suaeda salsa*

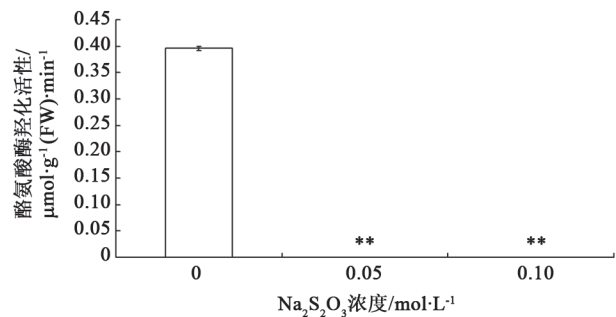


图9 Na₂S₂O₃对盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性的影响
Fig.9 Effect of Na₂S₂O₃ on tyrosinase hydroxylation activity of *Suaeda salsa*

图中数据为3个重复的平均值±SD。**表示与对照(未加入Na₂S₂O₃)相比0.01水平差异极显著。

响与氧化活性一样具有强效抑制作用。加入0.05 mol·L⁻¹ Na₂S₂O₃后酪氨酸酶羟化活性完全丧失。

2.5 Cu²⁺浓度对盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性的影响

如图10所示, Cu²⁺浓度对盐地碱蓬酪氨酸酶羟

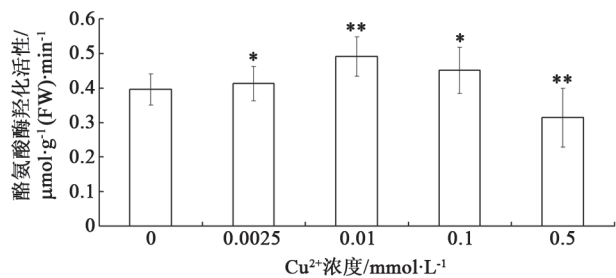


图10 Cu²⁺浓度对盐地碱蓬酪氨酸酶羟化活性的影响
Fig.10 Effect of Cu²⁺ on tyrosinase hydroxylation activity of *Suaeda salsa*

图中数据为3个重复的平均值±SD。*表示与对照(未加入Cu²⁺)相比0.05水平的差异显著; **表示0.01水平的差异极显著。

化活性的影响与酪氨酸酶氧化活性表现一致的趋势。较低浓度的 Cu^{2+} 可以激活酪氨酸酶的羟化活性, 而过高浓度的 Cu^{2+} 同样会抑制酪氨酸酶的羟化活性。其最佳 Cu^{2+} 浓度也在 $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右, 是没有加入 Cu^{2+} 时活性的128.2%。

讨 论

酪氨酸酶既具有氧化活性也具有羟化活性, 对pH、温度等比较敏感, 参与植物的多种代谢过程。它广泛存在于植物中, 但高等植物中的多数多酚氧化酶没有或只有很低的羟化酶活性, 而在大花马齿苋(Steiner等1999)、甜菜(Steiner等1996)和美洲商陆(Joy等1995)等合成甜菜红素的植物中酪氨酸酶表现很高的羟化活性, 因为酪氨酸酶的羟化作用是甜菜红素合成过程中的第一个酶促反应。本实验室王长泉等研究了盐地碱蓬酪氨酸酶与甜菜红素积累的关系, 表明酪氨酸酶在甜菜素合成中起关键作用(Wang等2007)。

本实验中, 盐地碱蓬酪氨酸酶的氧化活性与其他学者对高等植物组织中多酚氧化酶的酶学特性类似, 其活性随温度升高而加强, 在 $30\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时酶活最强, 温度高于 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后活性迅速下降, 如梨(林伯年等1997)、莲藕(Wang等2007)、枇杷(吴锦程等2005)、烟草(雷东锋等2003)等。对pH的变化十分敏感, 当pH值在6.6时, 表现最高活力, 随着pH值的继续增加或降低, 酶的活性都减弱, 呈抛物线型变化(汪敏和郑师章1994; 尹建雄和卢红2005)。肖厚荣等(2004)研究发现pH可以使色氨酸和酪氨酸残基的微环境发生一定的变化, 进而对多酚氧化酶的二级结构产生影响。而对盐地碱蓬中酪氨酸酶的羟化活性的研究结果表明, 它的最适温度为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 最适pH值为6.6。

不同种类生物酪氨酸酶氧化活性及羟化活性的 K_m 及 V_{max} 相差较大。通过对盐地碱蓬酪氨酸酶氧化活性及羟化活性的 K_m 及 V_{max} 的比较发现, 酪氨酸酶表现氧化活性时与底物的亲和力明显大于羟化活性, 最大反应速率也要比羟化活性大很多, 分别为羟化活性的2.9倍和110.74倍。这说明, 盐地碱蓬中酪氨酸酶的羟化活性是影响甜菜红素合成速率的关键, 影响酪氨酸酶羟化活性的因子可能对甜菜红素的合成作用更为明显。

抑制剂和激活剂对酪氨酸酶的影响明显。如铜离子的螯合剂(EDTA), 蛋白变构剂(如硫脲和巯基乙醇等等)可以使蛋白质的三级结构改变; 还原剂(如亚硫酸氢钠、抗坏血酸等)可以将二价铜还原成一价铜, 这些抑制剂均会影响其活性发挥。本实验中 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 是盐地碱蓬酪氨酸酶的强效抑制剂, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 即可以极显著抑制其活性。 Cu^{2+} 作为酪氨酸酶的辅基其浓度不同对酪氨酸酶活性的影响也不同。低浓度的 Cu^{2+} 可以激活酪氨酸酶的氧化及羟化活性, 高浓度的 Cu^{2+} 则抑制其活性, 其最佳 Cu^{2+} 浓度在 $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。这与Yamamoto等(2001)研究 Cu^{2+} 对大花马齿苋愈伤组织中酪氨酸酶活性影响的结果相同。

综上所述, 盐地碱蓬酪氨酸酶的羟化活性对底物的亲和力和最大反应速率远低于氧化活性、而最适温度却高于前者。由于酪氨酸酶的羟化活性在甜菜红素合成过程中起更重要作用, 所以在盐地碱蓬生长发育过程中, 环境因子与酪氨酸酶的羟化活性和氧化活性的相互作用, 尤其是对酪氨酸酶羟化活性的作用, 可能是控制甜菜素合成并最终导致形成不同表型(潮间带红色碱蓬表型和内陆绿色碱蓬表型)的重要因子之一, 但相关的分子作用机制还有待进一步的研究。

参考文献

- 陈清西, 宋康康(2006). 酪氨酸酶的研究进展. 厦门大学学报(自然科学版), 45 (5): 731~738
- 雷东锋, 蒋大宗, 王一理(2003). 烟草中多酚氧化酶的生理生化特征及其活性控制的研究. 西安交通大学学报, 37 (12): 39~44
- 林伯年, 吴晓梅, 胡军(1997). 梨和莲藕组织中多酚氧化酶特性及褐变控制. 浙江农业大学学报, 23: 63~67
- 汪敏, 郑师章(1994). 凤眼莲体内多酚氧化酶的生理生化特性. 复旦学报(自然科学版), 33 (2): 157~164
- 王长泉, 刘涛, 王宝山(2006a). 植物甜菜素研究进展. 植物学通报, 23 (3): 302~311
- 王长泉, 赵吉强, 陈敏, 王宝山(2006b). 盐地碱蓬甜菜红素苷的鉴定及环境因素对其积累的影响. 植物生理与分子生物学学报, 32 (2): 195~201
- 吴锦程, 夏海玲, 唐朝晖, 赖育兰, 陈群(2005). 白肉枇杷多酚氧化酶酶学特性研究. 中国农学通报, 21 (11): 96~115
- 肖厚荣, 徐小龙, 解永树, 盛良全, 张艳鸽, 刘清亮(2004). pH诱导烟草多酚氧化酶二级结构变化的光谱学研究. 化学物理学报, 17 (2): 196~200
- 尹建雄, 卢红(2005). 烟草中多酚化合物及多酚氧化酶研究进展. 广西农业科学, 36 (3): 284~286
- 赵可夫, 李法曾(1998). 中国盐生植物. 北京: 科学出版社
- Butera D, Tesoriere L, di Gaudio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi

- AM, Kohen R, Livrea MA (2002). Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J Agric Food Chem*, 50: 6895~6901
- Du J, Zhu Z, Li WC (2006). Over-express of exitic superoxidase gene *MnSOD* and increse in stress resistance in maize. *J Plant Physiol Mol Biol*, 32 (1): 57~63
- Espín JC, Varón R, Fenoll LG, Gilabert MA, García-Ruiz PA, Tudela J, García-Cánovas F (2000). Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur J Biochem*, 267: 1270~1279
- Joy RW, Sugiyama M, Fukuda H, Komamine A (1995). Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol*, 107: 1083~1089
- Kouakou TH, Kouadio YJ, Kouamé P, Waffo-Tégou P, Décendit A, Mérillon JM (2009). Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidases from embryogenic and nonembryogenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cells. *Appl Biochem Biotechnol*, 158 (2): 285~301
- Li X, Zhang XD, Song J, Fan H, Feng G, Wang BS (2011). Accumulation of ions during seed development under controlled saline conditions of two *Suaeda salsa* populations is related to their adaptation to saline environment. *Plant Soil*, 314: 99~107
- Peñalver MJ, Fenoll LG, Rodríguez-López JN, García-Ruiz PA, García-Molina F, Varón R, García-Cánovas F, Tudela J (2005). Reaction mechanism to explain the high kinetic autoactivation of tyrosinase. *J Mol Catal B: Enzym*, 33: 35~42
- Sasaki N, Abe Y, Wada K, Koda T, Goda Y, Adachi T, Ozeki Y (2005). Amaranthin in feather cockscombs is synthesized via glucuronylation at the *cyclo*-DOPA glucoside step in the betacyanin biosynthetic pathway. *J Plant Res*, 118: 439~442
- Schliemann W, Kobayashi N, Strack D (1999). The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiol*, 119: 1217~1232
- Song J, Chen M, Feng G, Jia YH, Wang BS, Zhang FS (2009). Effect of salinity on growth, ion accumulation and the roles of ions in osmotic adjustment of populations of *Suaeda salsa*. *Plant Soil*, 314: 133~141
- Steiner U, Schliemann W, Böhm H, Strack D (1999). Tyrosine involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, 208: 114~124
- Steiner U, Schliemann W, Strack D (1996). Assay for tyrosine hydroxylation activity of tyrosinase from betalain-forming plants and cell cultures. *Anal Biochem*, 238: 72~75
- Wang CQ, Song H, Gong XZ, Hu QG, Liu F, Wang BS (2007). Correlation of tyrosinase activity and betacyanin biosynthesis induced by dark in C_3 halophyte *Suaeda salsa* seedlings. *Plant Sci*, 173: 487~494
- Yamamoto K, Kobayashi N, Yoshitama K, Teramoto S, Komamine A (2001). Isolation and purification of tyrosine hydroxylase from callus cultures of *Portulaca grandiflora*. *Plant Cell Physiol*, 42: 969~975
- Zhao SZ, Sun HZ, Chen M, Wang BS (2010). Light-regulated betacyanin accumulation in euhalophyte *Suaeda salsa* calli. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 102: 99~107