

大蕉果皮脱镁螯合酶的纯化和某些特性初探

杨晓棠¹, 张昭其¹, 徐兰英¹, 黄雪梅¹, 庞学群^{2,*}

华南农业大学¹园艺学院, ²生命科学学院, 广州 510642

摘要: 用盐析法从大蕉果皮中初步纯化了脱镁螯合酶(Mg-dechelataase, MDCase), 纯化程度约为 3.01 倍。以叶绿酸(chlorophyllin)为底物, MDCase K_m 值为 13.47 nmol·L⁻¹; 活性最适反应温度为 50 °C; 在 30~70 °C 内, 活性较稳定, 但在 100 °C 下 40 min 仍保持 50% 活性; 在 pH 6.5~9.5 范围内, 随着 pH 的升高, 酶活性逐渐增大。MDCase 活性受还原剂 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇、抗坏血酸、Na₂SO₃ (SO₂) 和还原型谷胱甘肽的抑制, 而受过氧化氢激活; 金属离子 Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Ca²⁺ 和 K⁺ 都在不同程度上抑制 MDCase 活性; 不同的螯合剂效应不同, EDTA 对酶活性有抑制作用, 而柠檬酸却影响不大。

关键词: 大蕉果皮; 脱镁螯合酶; 纯化

Purification of Mg-Dechelataase from Plantain Peel and Its Enzymatic Properties

YANG Xiao-Tang¹, ZHANG Zhao-Qi¹, XU Lan-Ying¹, HUANG Xue-Mei¹, PANG Xue-Qun^{2,*}

¹College of Horticulture, ²College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: In this report, we reported the Mg-dechelataase was partially purified from plantain peel tissues by ammonium sulfate fractionation and some properties of the enzyme. The enzyme was purified about 3.01 times. The K_m of the enzyme for the substrate chlorophyllin was 13.47 nmol·L⁻¹. The enzyme had higher thermostability at 30–70 °C and about 50% of the activity was retained at 100 °C for 40 min. The optimum reaction temperature and pH were 50 °C and a range of 6.5–9.5, respectively. The enzyme activity was inhibited by some reduced reagents, such as β -mercaptoethanol, dithiothreitol, ascorbic acid, Na₂SO₃ (SO₂) and reduced glutathione, and activated by H₂O₂. Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, K⁺, inhibited the enzyme activity. EDTA and citric acid had inverse effect on the activity.

Key words: plantain peel; Mg-dechelataase; purification

叶绿素降解是叶片衰老过程中的生理过程, 其降解途径已基本得到阐明(Hörtensteiner和Matile 2003; Matile等1999)。在叶绿素酶(chlorophyllase, Chlase)的作用下, 叶绿素分子首先脱去植醇长链, 生成绿色叶绿素降解产物脱植基叶绿素(chlorophyllide, Chlide); 脱植基叶绿素在脱镁螯合酶(Mg-dechelataase, MDCase)的作用下失去中心镁离子, 产生脱镁叶绿酸 a (pheophorbide a, Pheide a); 最后在脱镁叶绿酸 a 氧化酶(pheophorbide a oxygenase, PaO)和红色叶绿素降解产物还原酶(red-chlorophyll catabolite reductase, RCCR)的共同作用下, 脱镁叶绿酸 a 生成具有蓝色荧光无色的叶绿素降解产物, 叶绿素分子卟啉大环在这一步中失去环状结构, 从绿色转变为无色。这条始于叶绿素酶, 经过 MDCase 到达 PaO 的代谢途径称为“PaO 途径”(Matile等1999)。

脱镁离子反应是叶绿素降解途径中的关键步骤之一, 由于此反应不可逆, 因此成为叶绿素降

解途径中限速步骤之一(Tanaka等2003)。在许多植物中均发现有脱镁叶绿素类物质的存在(Jananve 1997; Shioi等1996; Tang等2000)。体外试验证明, 叶绿素降解途径中的关键酶 PaO 仅作用于脱镁叶绿酸 a (Hörtensteiner等1995); 此外, 叶绿素必须脱镁离子后才能顺利降解为对植物组织无毒性的物质(Kunieda等2005; Langmeier等1993; Shimokawa等1990; Shioi等1991; Suzuki等2005; Suzuki和Shioi 2002; Takahashi等2001; Tanaka等2003; Vicentini等1995)。随着草莓果实的成熟, MDCase 活性逐渐升高, 完熟时达到最高, 而叶绿素迅速降解(Costa等2002)。我们

收稿 2008-01-30 修定 2008-04-28

资助 国家自然科学基金(30300243)、广东省联合基金重点项目(U0631004)和广东省自然科学基金团队项目(06200670)。

* 通讯作者(E-mail: xqpang@scau.edu.cn; Tel: 020-85280195)。

的研究表明,随着大蕉果实的后熟转黄,MDCase活性逐渐升高,表明MDCase与大蕉果实后熟过程中叶绿素的降解紧密相关(杨晓棠2006)。MDCase是负责植物脱镁离子反应的主要酶类(Matile等1999),有关植物MDCase酶学性质的研究报道甚少,仅在草莓(Costa等2002)、藜科植物(Suzuki和Shioi2002)以及油菜(Costa等2002;Suzuki和Shioi2001;Vicentini等1995)中有报道,有关MDCase酶学性质的结果也很不一致。有人曾在草莓和油菜子叶MDCase粗提液过滤液中发现有热稳定性小分子量的物质,并有脱镁离子的能力(Costa等2002;Suzuki等2005)。Suzuki等(2005)从柱层析分步纯化的藜科植物MDCase粗提液中也得到多种具脱镁活性的物质。这表明在植物中存在多种不同的具有脱镁活性的物质。

在果实中,随着果实的不断成熟或后熟,果皮中叶绿素不断降解,绿色逐渐消失,呈现出类胡萝卜素或花色苷的颜色(杨晓棠等2006)。我们以前的工作表明,大蕉果实在后熟过程中叶绿素降解途径与一般的衰老叶片一样,也是通过PaO途径,较高温度下果皮MDCase活性更高,较高温度还会促进果皮褪绿转黄(杨晓棠2006),说明MDCase是在大蕉果实叶绿素降解过程中起作用的。为了了解大蕉果皮MDCase的性质,我们对其进行了初步纯化,并对其酶学特性作了初步探讨。

材料与方法

大蕉(*Musa paradisiaca* L.)购自广州番禺香蕉园,挑选成熟度为70%~80%的果实进行催熟处理,选取不同后熟成度的果实,清洗后剥取果皮,以液氮速冻后置于-80℃低温中备用。

MDCase的提取和纯化参照Costa等(2002)文中的方法。取果皮按照2 mL·g⁻¹的比例加入4℃预冷的提取液[0.1 mol·L⁻¹ pH 6磷酸缓冲液含0.2% (V/V) Triton X-100、30 g·L⁻¹ 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、1 mmol·L⁻¹ 苯甲基磺酰氟(PMSF)和5 mmol·L⁻¹ 半胱氨酸],冰浴中匀浆后放在低温(4℃)摇床上振荡2 h后,4层纱布过滤,滤液在4℃下以9 000×g离心20 min,上清液为粗酶提取液。向粗酶液中边搅拌边加硫酸铵至45%饱和度,混

合物在4℃下振荡5 h后,以9 000×g离心60 min,沉淀弃去。继续向上清液中加入硫酸铵至90%饱和度,在4℃下振荡过夜。以9 000×g离心60 min,上清液弃去。沉淀悬浮于少量0.1 mol·L⁻¹ pH 7.0磷酸缓冲液中,并在4℃下以相同的缓冲液透析过夜,即是酶液。初步纯化的酶液进行超滤、苯基琼脂糖凝胶(phenyl-sepharose) CL-4B或DEAE柱层析,均未能成功获得具有活性的组分,本文所用的制剂为硫酸铵初步纯化的酶液。

参照Vicentini等(1995)文中的方法制备底物叶绿酸(chlorophyllin, Chlin)。用80%冷丙酮从菠菜叶中提取出叶绿素,过滤去残渣。按照1:1 (V/V)的比例加入石油醚萃取叶绿素,除去丙酮层后在醚层加入2次蒸馏水洗涤。在叶绿素石油醚提取液中按照1 mL·mg⁻¹叶绿素的比例加入30% (W/W) KOH-甲醇溶液,出现叶绿酸(Chlin)沉淀后,再用5 500×g离心15 min,收集沉淀溶于10 mL蒸馏水中。用2 mol·L⁻¹三胺(tricine)缓冲液调节pH至9.0,分装后置于-20℃下备用。

MDCase活性测定参照Jananve (1997)和Vicentini等(1995)文中的方法。反应混合物包含50 mmol·L⁻¹ Tris-Tricine缓冲液(pH 8.8)、10 μL叶绿酸和200 μL酶液,总体积为3 mL。37℃放置水浴中30 min后,用紫外可见分光光度计测定波长692 nm处吸光值,酶活性以每分钟OD变化0.001为一个单位(U),活性用U·g⁻¹ (FW)表示。

结果与讨论

1 MDCase活性测定体系的建立

比较了磷酸缓冲液、Tris-HCl缓冲液和Tris-三胺缓冲液中底物叶绿酸稳定性,结果表明Chlin在Tris-三胺缓冲液中最稳定,基本上不发生自发的脱镁离子反应(数据未列出),因此以后MDCase活性测定均采用Tris-三胺缓冲液。波长扫描表明,底物叶绿酸的特征峰为644 nm,加入MDCase液后,644 nm的峰值下降,并在692 nm处出现一个新的产物峰,且随着时间的延长,644 nm的峰值逐渐减小,而692 nm的峰值则不断增加(图1-a)。随着时间的推移(0~35 min),A₆₉₂逐渐呈线性增加(图1-b),说明这一反应体系可用于测定MDCase活性。

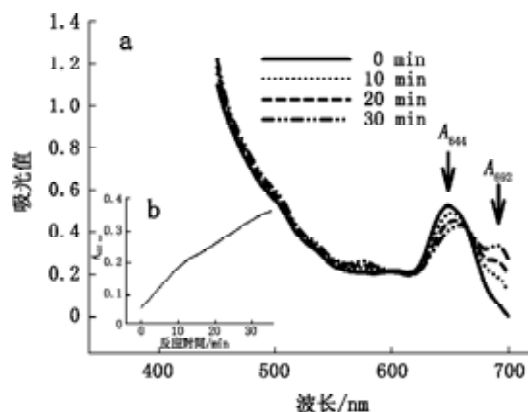


图1 大蕉果皮的MDCase活性变化

Fig.1 The MDCase activity in peel of plantain

a: 大蕉MDC酶液和底物叶绿酸反应的波长扫描; b: 随着时间进程692 nm吸光值的变化。

2 MDCase的纯化

大蕉果皮提取液经硫酸铵45%~90%饱和度盐析后, 酶纯化程度增加约3.01倍(表1)。有研究表明, 超滤可以在滤液中获得具有脱镁螯合作用的组分(Costa等2002)。但本文的结果表明, 以离心超滤管(10 kDa)进行超滤后, 滤液中并没有测出脱镁螯合活性。苯基琼脂糖凝胶CL-4B曾成功用于叶绿素酶的纯化(Trebitsh等1993), 用同为疏水层析材料的丁基琼脂糖凝胶(Butyl-Sepharose)纯化MDCase也有成功的尝试(Suzuki和Shioi 2001)。一般认为叶绿素酶和MDCase是位于叶绿体膜上的, 因此我们也曾尝试用苯基琼脂糖凝胶CL-6B对MDCase进行纯化, 但获得的组分均未能测出MDCase活性。

表1 大蕉果皮MDCase的分离纯化

Table 1 Purification of Mg-dechelataze of plantain peel

纯化步骤	总体积/mL	总活性/U	总蛋白量/mg	比活性/U·mg ⁻¹	回收率/%	纯化倍数
粗酶液	158	790	260.70	3.03	100	1
45% (NH ₄) ₂ SO ₄	174	405.42	104.71	3.87	51.32	1.28
90% (NH ₄) ₂ SO ₄	15	250	27.41	9.12	31.65	3.01

3 MDCase的K_m值

作为植物MDCase活性测定的人工底物叶绿酸在酶促反应中可转化为脱镁代谢物质(Vicentini等1995)。不同植物来源的MDCase对叶绿酸的亲和力差异较大, 如草莓MDCase对叶绿酸的K_m为81 nmol·L⁻¹和116 nmol·L⁻¹、藜属植物为95 nmol·L⁻¹、油菜为17 nmol·L⁻¹(Costa等2002; Suzuki和Shioi

2001; Vicentini等1995)。用Lineweaver-Burk作图(图2)表明, 在37℃和pH 8.8的条件下, 大蕉果皮MDCase对叶绿酸的K_m为13.47 nmol·L⁻¹, 比其他来源的MDCase的K_m值更低, 表明大蕉果皮MDCase对叶绿酸具有较高的亲和力。

4 MDCase的热稳定性

取等量酶液分别在30~100℃下保温40 min并于冰浴中冷却后, 立即检测MDCase活性的结果(图3)表明, MDCase在30~70℃温度范围内活性比较稳定; 但60℃下酶活性似乎有一定程度的激活。Shioi等(1996)发现, 95℃水浴处理5 min即能使藜属植物MDCase粗酶液完全失活。但我们的结果表明, 随着温度再提高, 虽然酶活性急剧下降, 但在100℃下能保持约50%的活性。酶提取液中似乎有某种具有脱镁离子作用的热稳定性物质。由于100℃40 min足以使蛋白质变性, 因此推测此物质可能与蛋白无关。此外, 虽然有人在草莓果实MDCase提取液中也发现有某种具有脱镁离子作用的热稳定性物质, 称为脱镁螯合物质(Mg-dechelating substance, MDS), 但其结构与性

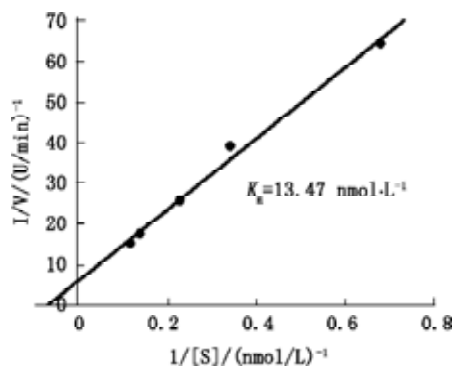


图2 大蕉果皮的MDCase对叶绿酸的动力学参数

Fig.2 Lineweaver-Burk plot of the MDCase on Chlin conversion

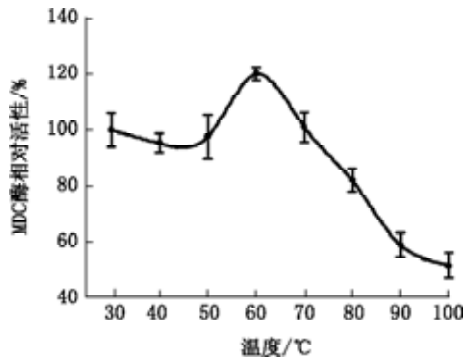


图3 大蕉果皮的MDCase的热稳定性

Fig.3 Thermo-stability of MDCase in plantain peel

质仍不清楚(Kunieda 等 2005 ; Suzuki 等 2005)。Matile 等(1996)推测, MDS可能仅仅是MDCase的一类辅因子, 容易与MDCase分离, 且其自身也具有脱镁离子的作用。

5 MDCase 催化反应的最适温度和最适反 pH 值

(1)在 30~50 温度范围内, 酶活性随着温度的升高而升高, 温度超过 50 时, MDCase 活性骤然下降(图 4-a), 可知大蕉 MDCase 最适反应温度为 50 。不同来源 MDCase 的最适反应温度比较接近。Costa 等(2002)报道, 在 30~50 范围内, 温度越高, 草莓 MDCase 活性越大, 50 时活性最高, 我们的结果与其类似。

(2)在 Tris- 三胺缓冲液 pH 6.5~9.5 范围内, 随着 pH 值的提高, MDCase 活性逐渐增大。pH 降低到 6.5 时, MDCase 完全丧失活性(图 4-b)。可见, 大蕉 MDCase 在碱性环境中活性较高, 这与

前人的结果(Costa 等 2002 ; Suzuki 和 Shioi 2001 ; Vicentini 等 1995)类似。

6 金属离子和某些化合物对大蕉果皮中 MDCase 活性的影响

如表 2 所示, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 和 K^{+} 对大蕉果皮中 MDCase 活性有不同程度的抑制作用, 特别是浓度高时抑制作用更明显。但 Na^{+} 和 Mg^{2+} 对 MDCase 活性的影响不明显。 β - 巯基乙

表 2 多种金属离子和一些化学物质对大蕉 MDCase 活性的影响

Table 2 Effects of some metal ions and chemical compounds on MDCase activity

化学物质	MDCase 相对活性 / %	
	0.1 mmol·L ⁻¹	1 mmol·L ⁻¹
对照	100	100
CuSO_4	9.5±1.11	未测
ZnSO_4	33.3±9.94	40.5±6.59
FeSO_4	83.3±2.33	59.5±4.44
CaCl_2	88.1±0.56	50.0±8.7
KCl	81.0±4.75	81.0±4.66
NaCl	95.2±0.05	102.4±2.4
MgCl_2	109.5±0.98	100.0±8.21
Na_2SO_3	83.3±1.02	52.3±1.83
β - 巯基乙醇	16.7±13.42	未测
二硫苏糖醇	145.2±6.66	2.4±1.99
还原型谷胱甘肽	78.6±2.41	40.5±1.69
抗坏血酸	11.9±4.91	未测
H_2O_2	119.0±1.11	138.1±0.47
EDTA	2.4±5.77	11.9±5.45
柠檬酸	90.5±9.44	111.9±0.7

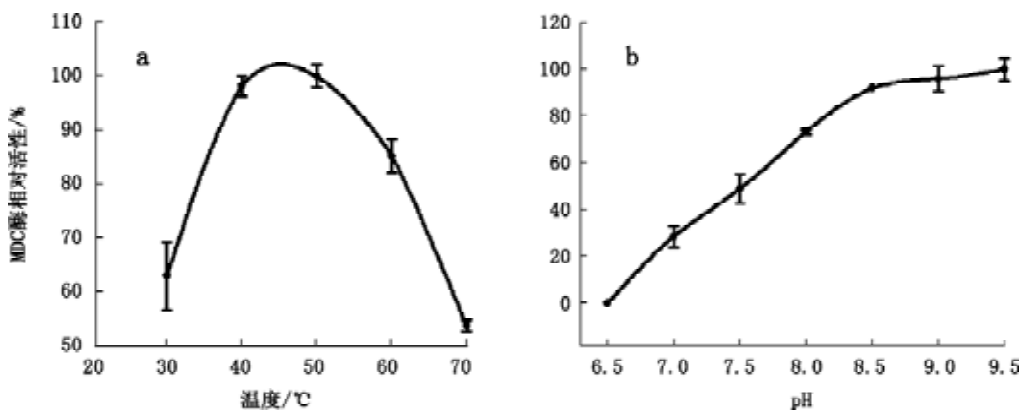


图 4 大蕉果皮 MDCase 催化反应的最适温度和最适 pH

Fig.4 The optimum temperature and the optimum pH of MDCase in plantain peel

醇、二硫苏糖醇、抗坏血酸、 Na_2SO_3 (SO_2)、还原型谷胱甘肽和EDTA对MDCase活性都有抑制作用,柠檬酸对酶活性影响不大,而 H_2O_2 对MDCase活性有促进作用。

参考文献

- 杨晓棠(2006). 温度对香蕉和大蕉叶绿素降解的影响[硕士学位论文]. 广州: 华南农业大学
- 杨晓棠, 张昭其, 庞学群(2005). 果蔬采后叶绿素降解与品质变化的关系. 果树学报, 22: 691~696
- Costa ML, Civello PM, Chaves AR, Martinez GA (2002). Characterization of Mg-dechelate activity obtained from *Fragaria ananassa* fruit. Plant Physiol Biochem, 40: 111~118
- Hörtensteiner S, Matile P (2003). How leaves turn yellow: catabolism of chlorophyll. In: Nooden LD (ed). Plant Cell Death Processes. California: Elsevier Academic Press, 189~202
- Hörtensteiner S, Vicentini F, Matile P (1995). Chlorophyll breakdown in senescence leaves: enzymic cleavage of pheophorbide *a in vitro*. New Phytol, 129: 237~246
- Jananve M (1997). Enzymatic degradation of chlorophyll in cavendish bananas: *in vitro* evidence for two independent degradative pathways. Plant Physiol Biochem, 35: 837~846
- Kunieda T, Amano T, Shioi Y (2005). Search for chlorophyll degradation enzyme, Mg-dechelate, from extracts of *Chenopodium album* with native and artificial substrates. Plant Sci, 169: 177~183
- Langmeier M, Ginsburg S, Matile P (1993). Chlorophyll breakdown in senescent leaves: demonstration of Mg-dechelate activity. Physiol Plant, 89: 347~353
- Matile P, Hörtensteiner S, Thomas H (1999). Chlorophyll degradation. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 50: 67~95
- Matile P, Hörtensteiner S, Thomas H, Kräutler B (1996). Chlorophyll breakdown in senescent leaves. Plant Physiol, 112: 1403~1409
- Shimokawa K, Hashizume A, Shioi Y (1990). Pyropheophorbide *a*, a catabolite of ethylene-induced chlorophyll *a* degradation. Phytochemistry, 29: 2105~2106
- Shioi Y, Tatsumi Y, Shimokawa K (1991). Enzymatic degradation of chlorophyll in *Chenopodium album*. Plant Cell Physiol, 32: 87~93
- Shioi Y, Tomita N, Tsuchiya T, Takamiya K (1996). Conversion of chlorophyllide to pheophorbide by Mg-dechelating substance in extracts of *Chenopodium album*. Plant Physiol Biochem, 34: 41~47
- Suzuki T, Kunieda T, Murai F, Morioka S, Shioi Y (2005). Mg-dechelation activity in radish cotyledons with artificial and native substrates, Mg-chlorophyllin *a* and chlorophyllide *a*. Plant Physiol Biochem, 43: 459~464
- Suzuki T, Shioi Y (2001). Degradation of Chlorophylls: Purification and Properties of a Mg-releasing Protein from *Chenopodium album*. Proceedings of the 12th International Congress on Photosynthesis. Queensland: Brisbane Convention & Exhibition Centre, S2-022
- Suzuki T, Shioi Y (2002). Re-examination of Mg-dechelation reaction in the degradation of chlorophylls using chlorophyllin *a* as a substrate. Photosynth Res, 74: 217~223
- Takahashi Y, Adachi M, Furuta M, Yamamoto H, Kurata H, Azuma R, Miyoshi H, Shimokawa K (2001). Chlorophyll catabolism in broccoli (*Brassica oleracea* L.) flower buds: An involvement of Mg-dechelate. J Jpn Soc Hortic Sci, 70: 121~125
- Tanaka R, Hirashima M, Satoh S, Tanaka A (2003). The *Arabidopsis-accelerated cell death* gene *ACD1* is involved in oxygenation of pheophorbide *a*: Inhibition of the pheophorbide *a* oxygenase activity does not lead to the "Stay-Green" phenotype in *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol, 44: 1266~1274
- Tang L, Okazawa A, Fukusaki E, Kobayashi A (2000). Removal of magnesium by Mg-dechelate is a major step in the chlorophyll-degrading pathway in ginkgo biloba in the process of autumnal tints. Z Naturforsch C, 55: 923~926
- Trebitsh T, Goldschmidt EE, Riov J (1993). Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in citrus fruit peel. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 9441~9445
- Vicentini F, Iten F, Matile P (1995). Development of an assay for Mg-dechelate of oilseed rape cotyledons, using chlorophyllin as the substrate. Physiol Plant, 94: 57~63