

枇杷 4- 香豆酸 CoA 连接酶的某些特性

吴锦程* 唐朝晖

莆田学院环境与生命科学系, 福建莆田 351100

提要 以枇杷品种‘解放钟’果实为试材, 用硫酸铵分级盐析方法提取 4- 香豆酸 CoA 连接酶, 其最适温度为 10 和 40℃, 40 和 10℃ 下的热稳定性较好; 最适 pH 为 8.0 且较稳定; 最适底物为咖啡酸。

关键词 枇杷; 4- 香豆酸 CoA 连接酶; 特性

Some Characteristics of 4-Coumarate Coenzyme A Ligase in Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl. cv. Jiefangzhong)

WU Jin-Cheng*, TANG Chao-Hui

Department of Environment and Life Science, Putian College, Putian, Fujian 351100, China

Abstract The characteristics of 4-coumarate CoA ligase (4-CL) were investigated by extracting and purifying with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction from the fruits of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl. cv. Jiefangzhong). The results showed that the optimal temperatures for the enzyme were 10℃ and 40℃ at which heat stability was better. The optimal pH was 8.0 when the stability of 4-CL was relatively better, and the optimal substrate was caffeic acid.

Key words loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl. cv. Jiefangzhong); 4-coumarate coenzyme A ligase (4-CL); characteristics

木质素的生物合成通过植物苯丙烷类次生物合成途径, 4- 香豆酸 CoA 连接酶 (4-coumarate CoA ligase, 4-CL, EC 6. 2. 1. 12) 是这一途径中的关键酶, 4-CL 常由多个成员组成的基因家族所编码, 不同基因的表达受发育阶段和环境信号所调节 (余叔文和汤章城 1998)。4-CL 因其处在由苯丙烷类代谢向形成不同类型产物的转折点 (如木质素的合成) 而备受关注, Grand 等 (1983) 用层析技术从杨树茎中分离和初步纯化得到 4-CL 的 3 个同工酶, 并发现这 3 个酶在木质化程度较高的木质部中的活性均较高, 而在薄壁组织中活性则很低, 说明 4-CL 在木质素生物合成中是重要的 (欧阳光察和薛应龙 1988)。枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) 为非跃变型果实, 采后放在常温下衰老变质较快, 低温气调贮藏虽可有效控制果实腐烂的发生, 但不能阻止果实品质的木质化劣变, 因而果实的感官品质和商品性变差 (郑永华等 2000; 林革等 2004)。本文试图通过枇杷的 4-CL 某些特性分析, 探讨冷藏枇杷果实木质化败坏的原因。

材料与amp;方法

枇杷品种‘解放钟’ (*Eriobotrya japonica* Lindl.

cv. Jiefangzhong) 果实购自福建莆田常太, 于正常食用成熟度时采收, 采后当天运回实验室, 选择成熟度、大小基本一致、无病虫害和机械损伤的果实保存于 4℃ 冰箱中。咖啡酸 (caffeic acid)、没食子酸 (gallic acid)、阿魏酸 (ferulic acid) 和香豆酸 (*p*-coumaric acid) 为 Flucka 公司产品; 肉桂酸 (cinnamic acid) 购自 Alfa Aesar 公司; ATP 和 CoA (coenzyme A) 为 Sigma 公司分装产品; 其他试剂均为国产分析纯。

酶液提取参照毕咏梅和欧阳光察 (1990) 的方法。取 10.0 g 枇杷果肉加入 0.2 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液 (含 25.0% 甘油和 0.1 mol·L⁻¹ 的 DTT, pH 8.0), 捣碎后用 4 层纱布过滤, 以 10 000×g 离心 20 min, 上清液即为粗酶。粗酶液加入硫酸铵至 45% 饱和度, 离心除去沉淀, 上清液再加硫酸铵达 75% 饱和度, 离心收集沉淀, 以 0.001 mol·L⁻¹ pH 8.0 磷酸缓冲液于 4℃ 下透析过夜, 得到的酶

收稿 2005-10-31 修定 2006-02-27

资助 福建省科技厅资助重点课题 (2002I023)。

*E-mail: wjc2384@163.com, Tel: 0594-2692891

液保存于4℃冰箱中待测。

酶活性测定参照Knobloch和Hahlbrock (1977)的方法。3.0 mL反应液中含15 mmol·L⁻¹的Mg²⁺ 0.45 mL、5 mmol·L⁻¹的4-香豆酸0.15 mL、1.0 mmol·L⁻¹的CoA 0.15 mL、50 mmol·L⁻¹的ATP 0.15 mL、0.5 mL酶液、0.2 mol·L⁻¹的Tris-HCl溶液1.6 mL。于40℃恒温水浴中反应10 min后测其在波长333 nm的吸光值,以变化0.001个OD值为1个酶活力单位,对照不加香豆酸。

分别用0.15 mL 5 mmol·L⁻¹的咖啡酸、没食子酸、香豆酸、肉桂酸、阿魏酸为底物测酶活性(反应体系的pH为8.0,温度为40℃),其中没食子酸、香豆酸、肉桂酸的吸收峰为333 nm,咖啡酸的吸收峰为362 nm,阿魏酸吸收峰为345 nm,测定重复3次,以OD值变化0.001为1个酶活力单位。

测定最适温度及热稳定性时,以咖啡酸为底物,酶促反应液于不同温度(范围10~60℃,pH 8.0)下保温10 min后测定活性。热稳定性测定时,将酶促反应液于不同温度(范围10~60℃,间隔10℃,pH 8.0)下保温,每隔5 min测活性1次,测定重复3次。

最适pH值测定以咖啡酸为底物,酶促反应液置于不同pH值(范围3.0~10.0,间隔1.0,温度40℃)的缓冲液中测定活性。测定pH稳定性时,将酶促反应液置于不同pH的缓冲液中40℃保温20 min后测酶残余活性(以最大活性管的相对活性为100%)。测定重复3次。

木质素含量测定参照朱海英等(1997)的方法。取6.0 g枇杷果肉于研钵中研碎,精确称取1.0 g置于小烧杯中并加入70%硫酸6 mL,35℃中恒温水浴不断搅拌,1 h后用208.0 mL蒸馏水冲洗到250 mL的三角瓶中,用牛皮纸封口后20℃高压灭菌1 h,之后将此溶液以G₄砂心漏斗过滤并用热水冲洗,置于60℃干燥箱烘干至恒重,计算按木质素的重量=干燥后砂心漏斗重量-砂心漏斗净重,结果以木质素占果肉鲜重的百分比[% (FW)]表示,测定重复3次。

以上测定所得数据均用3次重复的平均值;Duncan's新复极差法进行方差分析,检验差异显著性。

结果与讨论

1 底物、温度和pH对枇杷4-CL活性的影响

表1和图1~3显示:

(1)不同底物表现出不同的酶活性,以香豆酸的活性为100%计算,咖啡酸为125%,没食子酸为62.5%,肉桂酸为62.5%,阿魏酸为31.25%;以咖啡酸为底物的酶活性分别比香豆酸、没食子酸、肉桂酸和阿魏酸高25%、62.5%、62.5%和93.75%,差异均达极显著水平($P<0.01$)。各底物的4-CL酶活性大小顺序为:咖啡酸>香豆酸>没食子酸、肉桂酸>阿魏酸。枇杷4-CL对咖啡酸和香豆酸有较高的活性,与其他植物材料的报道一致(毕咏梅和欧阳光察1990;王隆华等1997),但枇杷4-CL对咖啡酸活性最高,而水稻4-CL对香豆酸表现最大活性(毕咏梅和欧阳光察1990),说明不同植物的4-CL特性存在差异(表1)。

表1 不同底物的枇杷4-CL活性
Table 1 Characteristics of different substrates for the loquat 4-CL activity

底物	4-CL酶活性/%
咖啡酸(caffeic acid)	125
没食子酸(gallic acid)	62.5
香豆酸(<i>p</i> -coumaric acid)	100
肉桂酸(cinnamic acid)	62.5
阿魏酸(ferulic acid)	31.25

(2)在10~30℃内,温度上升则酶活性降低;在10和40℃时酶活性高于其它试验温度的15.8%以上,差异达极显著水平($P<0.01$)。当温度超过40℃时,随温度的升高,酶活性下降(图1)。因此,枇杷加工时用热烫可使多酚氧化酶失

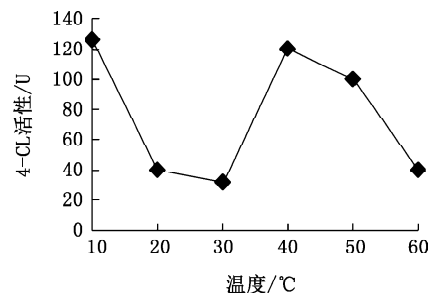


图1 温度对枇杷4-CL活性的影响

Fig. 1 Effect of temperatures on loquat 4-CL activity

活以减轻褐变产生,同时也促使4-CL失活阻止果肉木质化。4-CL在40℃保温10 min后的酶活性比10℃高9.8%,差异达显著水平($P<0.05$);而比在20、30、50和60℃保温10 min后的酶活性均高出20%以上,差异达极显著水平($P<0.01$)。4-CL在40℃时酶活性相对较为稳定,10 min后仍可保留80%以上的酶活性;其次是10℃时4-CL在保温10 min后仍可保留70%以上的酶活性;4-CL在20℃时保温,酶活性快速下降,20 min后酶活性丧失,稳定性最差(图2)。温度对4-CL活性影响较大,毕咏梅和欧阳光察(1990)在研究水稻4-CL特性后认为4-CL最适温度为40℃且热稳定性好;枇杷4-CL与水稻一样,在40℃时表现活性较高且热稳定性好,但枇杷4-CL在10℃低温时同样具有较高的活性。枇杷果实常温贮藏果肉木质化程度较低,而低温贮藏果肉木质化程度较高,冷藏枇杷果肉发生严重的木质化败坏可能与4-CL低温时酶活性较高相关,其内在机制有待进一步研究。

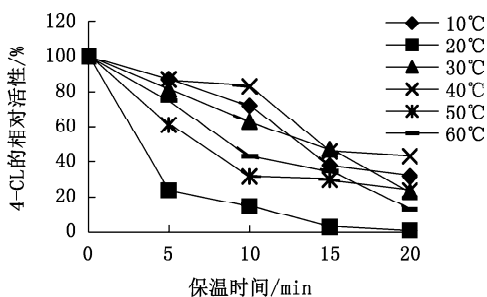


图2 枇杷4-CL的热稳定性
Fig. 2 Heat stability of loquat 4-CL

(3)当pH 4.0时酶活性呈现一个小的峰,但酶活性不高;pH 6.0~8.0时酶活性显著上升,pH为8.0的酶活性最高,pH>8.0时酶活性开始下降(图3)。*‘解放钟’*枇杷果实在贮藏过程中酸度不断下降,pH值上升,果实贮藏早期pH值较低(何志刚等2005)。本文结果显示,当pH在3.0~6.0较低时,枇杷4-CL活性较低,生物合成木质素少,与果实贮藏早期木质素含量呈现缓慢上升的结果相吻合。果实贮藏14 d后,木质素含量上升较快(图4、5),这可能与贮藏过程中pH值上升而提高4-CL活性有关。枇杷4-CL最适pH值为

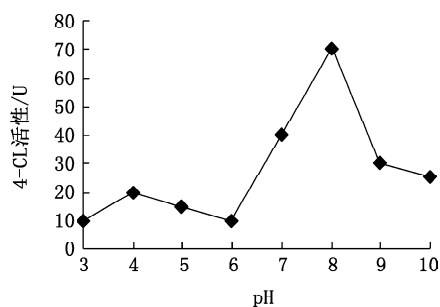


图3 pH对枇杷4-CL活性的影响
Fig. 3 Effect of pH on loquat 4-CL activity

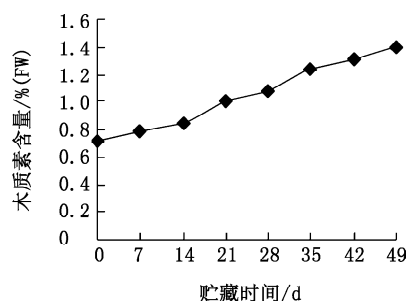


图4 枇杷果实冷藏过程中木质素含量的变化
Fig. 4 Changes in lignin of loquat at cold storage

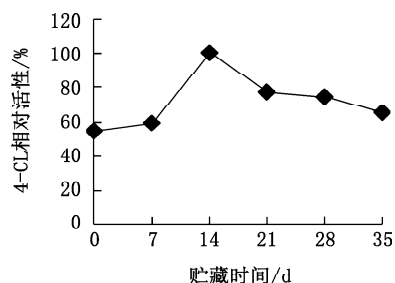


图5 枇杷冷藏期间4-CL活性的变化
Fig. 5 Changes in 4-CL activity of loquat at cold storage

8.0。

2 冷藏过程中的枇杷果实木质素含量变化

如图4所示,枇杷果实冷藏过程中木质素含量呈上升趋势。其中,在第14~21天和第28~35天期间木质素含量增加较为明显,分别为果实冷藏其它时期木质素增长量的1.67和1.78倍以上,差异达极显著水平($P<0.01$)。枇杷果实冷藏35 d,因严重木质化而基本丧失商品价值,说明果实冷藏期的第14~21天和第28~35天是枇杷果实品质木质化劣变的重要时期。

3 枇杷果实冷藏过程中的枇杷4-CL活性变化

从图5可以看出, 贮于4℃下的枇杷果实4-CL活性在前14 d内呈上升趋势, 14 d后开始下降, 呈现先升后降的变化规律。贮藏的前7 d内果实4-CL活性差异不显著($P>0.05$), 贮藏7 d后果实4-CL活性上升最快, 14 d时达到峰值, 差异达极显著水平($P<0.01$)。14 d后仍然继续下降, 但21 d后下降趋缓, 并仍高于贮藏前7 d的。

参考文献

- 毕咏梅, 欧阳光察(1990). 水稻4-香豆酸CoA连接酶的基本性质. 植物生理学通讯, (6): 18~20
- 何志刚, 林维新, 李晓姿, 潘葳, 苏德森, 庄林歆(2005). 枇杷果实成熟和贮藏过程中有机酸的代谢. 果树学报, 22 (1): 23~26
- 林革, 陈国碧, 吴锦程(2004). 外源水杨酸对枇杷常温贮藏效果的影响. 江西农业大学学报, 26 (增刊): 79~83
- 欧阳光察, 薛应龙(1988). 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控. 植物生理学通讯, (3): 9~16
- 王隆华, 姜宁, 黄详辉, 李人圭, 颜季琼(1997). 丝瓜果实发育过程中4-CL连接酶的特性研究. 华东师范大学学报, (2): 83~89
- 余叔文, 汤章城主编(1998). 植物生理与分子生物学. 第2版. 北京: 科学出版社, 390~400
- 郑永华, 李三玉, 席屿芳(2000). 多胺与枇杷果实冷害的关系. 植物学报, 42 (8): 824~827
- 朱海英, 李人圭, 王隆华(1997). 丝瓜果实发育中木质素代谢及有关导管分化的生理生化研究. 华东师范大学学报, (1): 87~94
- Grand C, Boudet A, Boudet AM (1983). Isoenzymes of hydroxycinnamate: CoA ligase from poplar stems properties and tissue distribution. *Planta*, 158: 225~229
- Knobloch KH, Hahlbrock K (1977). 4-Coumarate: CoA ligase from cell suspension culture of *Petroselinum hortense* Hoffm. Partial purification, substrate specificity, and further properties. *Arch Biochem Biophys*, 184: 233~248