

吴 媚, 徐 凡. 豆芽吡哆胺-丙酮酸转氨酶的分离纯化及部分酶学性质[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 240-243.

豆芽吡哆胺-丙酮酸转氨酶的分离纯化 及部分酶学性质

吴 媚, 徐 凡

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽合肥 230036)

摘要:通过 2 次硫酸铵分段沉淀、2 次 Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析、2 次 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换柱层析, 对新鲜豆芽中的吡哆胺-丙酮酸转氨酶进行分离纯化, 经 SDS-PAGE 电泳检测, 样品达到电泳级纯。结果显示: 该酶被纯化了 207.56 倍, 得率为 7.84%, 最适反应温度为 50 ℃, 最适反应 pH 值为 9.0, 酶的温度稳定范围为 0~50 ℃, pH 值稳定范围为 7.0~9.0。在最适反应条件下, 以吡哆胺和丙酮酸为反应底物时测得酶的 K_m 分别为 1.776 5、5.333 5 mmol/L。

关键词: 豆芽; 吡哆胺-丙酮酸转氨酶; 分离纯化; 酶学性质

中图分类号: Q563⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0240-03

维生素 B₆ 是一类吡啶化合物的总称, 2-甲基-3-羟基-5-羟甲基吡啶是维生素 B₆ 的母体, 吡啶环第四碳位被羟甲基、氨甲基、甲酰基取代后分别形成吡哆醇 (pyridoxine, PN)、吡哆胺 (pyridoxine, PM) 和吡哆醛 (pyridoxal, PL), 三者相应磷酸酯形式为磷酸吡哆醇 (pyridoxine-5'-phosphate, PNP)、磷酸吡哆胺 (pyridoxine-5'-phosphate, PMP) 和磷酸吡哆醛 (pyridoxal-5'-phosphate, PLP)。维生素 B₆ 广泛存在于自然界中, PLP 和 PMP 是其主要形式, 作为多种酶的辅酶, 参加催化涉及氨基酸的各种代谢反应^[1]。

吡哆胺-丙酮酸转氨酶 (pyridoxamine-pyruvate aminotransferase, PPAT) 是 PLP 非依赖性转氨酶^[2-3], 它以 PM 和丙酮酸为底物生成 PL 和 L-丙氨酸, 酶促 PM 和酮酸之间的氨基转换不存在氨的中间形式^[4-5], 而且此反应是可逆的。另外, 研究发现猪心脏中的谷草转氨酶经过脱辅基 (PLP) 后, 也可以催化 PM 和草酰乙酸生成 PL 和相应的氨基酸^[6]。目前, 对于微生物和动物体内的 PPAT 已有广泛的研究, 但在植物中鲜有相关研究的报道。Yoshikane 等首次在固氮共生根瘤菌中发现编码此酶的基因, 将重组的 PM-丙酮酸转氨酶基因导入大肠杆菌细胞中表达, 超声破碎得到粗酶液, 经过 30%~70% (NH₄)₂SO₄ 分段沉淀、离子交换层析、疏水层析等步骤对酶进行纯化, 并对其动力学进行了研究, 发现 PPAT 以 PM 和丙酮酸为底物时米氏常数 (K_m) 分别为 0.044 mmol/L、0.34 mmol/L^[7]。Wada 等将土壤假单胞杆菌中的 PPAT 通过精蛋白硫酸盐过滤、热处理、硫酸铵分段盐析、丙酮沉淀等进行纯化, 发现假单胞杆菌中的 PPAT 具有很强的耐热性, 且缓冲液中的磷酸盐离子对此酶的活性既没有抑制也没有促进作用, 而 PM-草酰乙酸转氨酶在没有磷酸盐离子的缓冲液中不能反应^[2]。曾海彬等研究发现, 植物中存在 PM 和 PL 之间

的相互转换^[8], 但在其转换的过程中可能存在以多种酮体作为受体的氨基转移酶, 这一问题还未明确。本试验以豆芽为材料, 对 PPAT 进行分离纯化和鉴定, 发现在植物 PM 和 PL 氨基转移过程中起作用的是 PPAT, 这对研究植物体内维生素 B₆ 的代谢途径有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

新鲜豆芽购自农贸市场; 盐酸吡哆胺、盐酸吡哆醛购于美国 Sigma 公司。高氯酸、丙酮酸 α -酮戊二酸、草酰乙酸、盐酸苯肼、甘油、等购自上海生物工程公司 (Sangon); Tris 购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 豆芽 PPAT 的分离纯化

称取 150 g 新鲜豆芽, 按固液比 1 g : 2 mL 的比例加入预冷的 300 mL 的提取液 (pH 值 7.4 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液) 中, 一起放入电动匀浆器制成细胞匀浆, 4 ℃、8 000 r/min 高速离心 20 min, 上清液即为粗酶液。向粗酶液中缓慢加入干燥的硫酸铵粉末至 35% 饱和度, 4 ℃ 搅拌 1 h, (4 ℃、8 000 r/min 离心 20 min), 弃去沉淀, 向上清液中加入硫酸铵粉末至 60% 的饱和度, 相同条件下离心, 沉淀即为目的蛋白。4 ℃ 条件下于超纯水中透析, 每 4 h 更换 1 次透析液。将透析后的目的蛋白进行第 2 次硫酸铵盐析, 收集饱和度为 40%~60% 的硫酸铵沉淀, 上样于 Sephadex G-100 (柱长 500 mm, 直径 20 mm) 凝胶柱, 用蒸馏水进行洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 5 mL/管, 收集活性高的部分进行透析浓缩。将浓缩的酶液上样于用缓冲液 I (10 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 值 8.9) 平衡后的 DEAE-Sephrose Fast Flow (柱长 300 mm, 直径 20 mm) 阴离子交换柱中, 以缓冲液 I 和 0.6 mol/L NaCl 溶液进行梯度洗脱, 流速为 2.0 mL/min, 收集活性部分进行透析, 每 4 h 更换 1 次透析液。第 2 天将透析好的酶液进行浓缩, 再次上样于 Sephadex G-100 凝胶柱, 条件方法同上。将收集的活性部分进行浓缩, 再次上样于 DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子交换柱中, 方法同上, 最后收集具有活性峰

收稿日期: 2013-03-15

作者简介: 吴 媚 (1987—), 女, 湖北十堰人, 硕士研究生, 主要从事维生素 B₆ 相关代谢酶的研究。E-mail: haitun_tomorrow@163.com。

的洗脱液。

1.3 吡哆胺-丙酮酸转氨酶的活性测定

烟草转氨酶的活力检测参照 Yoshikane 等的方法^[7,9]。反应体系为 1.5 mL,其中包括 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 值 8.9)缓冲液、3 mmol/L 酮酸、3 mmol/L PM、酶液。37 ℃水浴振荡反应 1 h,加入 0.3 mL 3 mol/L 高氯酸终止反应。8 000 r/min 离心 15 min,弃去沉淀,加入 1 mL 蒸馏水与 0.2 mL 苯胍,60 ℃反应 20 min,410 nm 下测定吸光度。酶活力单位(U)定义为:1 min 1 mg 蛋白催化生成 PL 的量(nmol/L)。

1.4 蛋白浓度的测定

蛋白质浓度测定采用 Bradford 的方法^[10]。

1.5 SDS-PAGE 电泳检测酶的纯度

SDS-PAGE 电泳分离胶和浓缩胶的浓度分别为 12% 和 14%,开始的操作电压为 100 V,当样品刚跑过浓缩胶时,加压到 200 V,电泳时间为 4 h 左右。

1.6 PPAT 部分酶学性质的测定

1.6.1 酶的最适反应温度 分别在 20、30、40、50、60、70、80、100 ℃,pH 值 8.9 的条件下测定酶活力,设其中最高点酶活力为 100%,其余与之比较得到相对酶活力,由相对酶活力对应反应温度作图,即得到最适反应温度。

1.6.2 酶的温度稳定性 酶分别在 0、20、30、40、50、60、70、80 ℃下保温 3 h,于最适反应条件下反应,检测酶活力。设其中最高点酶活力为 100%,其余与之比较得到相对酶活力,由相对酶活力对应反应温度作图,即得到温度的稳定范围。

1.6.3 酶的最适 pH 值 将反应体系的 pH 值分别调至 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0,测定其酶活力,设其中最高点酶活力为 100%,其余与之比较得到相对酶活力,由相对酶活力对应 pH 值作图,即得到最适 pH 值。

1.6.4 酶的 pH 稳定性 将酶液分别于 pH 值 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0 的磷酸缓冲液中放置 3 h,在最适条件下进行反应,设其中最高点酶活力为 100%,其余与之比较得到相对酶活力,由相对酶活力对应反应温度作图,即得到 pH 值的稳定范围。

1.6.5 双底物乒乓反应动力学和底物特异性 动力学性质研究:由于该反应是双底物反应,米氏方程不能完全精确,而一般转氨酶的反应都符合乒乓反应机制(方法略有不同)^[11],即酶结合底物 A 放出产物后,才能结合底物 B 生成另一产物。底物特异性研究:测定不同化学试剂(PM,丙酮酸;PM,草酰乙酸;PM,α-酮戊二酸;DL-天冬氨酸;α-酮戊二酸;DL-丙氨酸;α-酮戊二酸)作为底物时酶的活力,并进行比较。

2 结果与分析

2.1 PPAT 的纯化

由表 1 可知,PPAT 通过 2 次硫酸铵分段盐析、2 次 Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析、2 次 DEAE-Sephacrose Fast Flow 阴离子交换柱层析分离纯化后,该酶的比活力逐渐上升,由 0.86 U/mg 上升至 178.38 U/mg,酶被纯化了 207.56 倍,得率为 7.84%,说明经过以上步骤去除了很多杂蛋白。

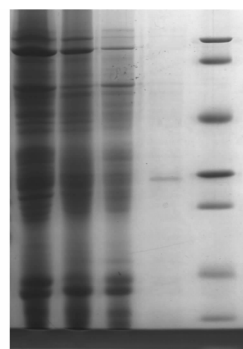
2.2 PPAT 的纯度鉴定

采用 SDS-PAGE 电泳检测纯度,结果如图 1 所示,经过

纯化,杂蛋白被逐一去除,纯化后的酶液有 1 条较明显的单一区带,说明用此方法纯化 PPAT 能达到理想的效果。

表 1 豆芽吡哆胺-丙酮酸转氨酶的分离纯化结果

处理	总活力 (U)	总蛋白 (mg)	比活力 (U/mg)	纯化 倍数	得率 (%)
粗酶液	523.56	609.20	0.86		100.00
第 1 次硫酸铵沉淀	309.42	49.24	6.28	7.31	59.10
第 2 次硫酸铵沉淀	179.18	17.27	10.37	12.07	34.22
Sephadex G-100	101.28	5.48	18.47	21.49	19.34
DEAE Sepharose F.F.	52.70	1.36	38.72	45.05	10.06
Sephadex G-100	48.93	0.64	75.94	88.36	9.35
DEAE Sepharose F.F.	41.05	0.23	178.38	207.56	7.84



1—Sephadex G-100; 2—DEAE Sepharose F.F.; 3—Sephadex G-100; 4—DEAE Sepharose F.F. M.Marker protein

图 1 PPAT 纯化的 SDS-PAGE 分析结果

2.3 PPAT 的部分酶学性质的研究

2.3.1 酶促反应的最适温度 由图 2 可知,该酶的最适反应温度为 50 ℃,随着反应温度的升高,酶的活力逐步升高,50 ℃时酶活力达到最高,继续升高反应温度,活力逐渐降低。

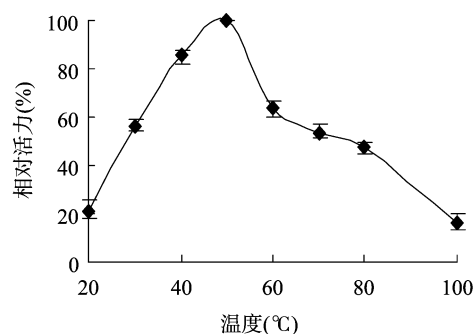


图 2 PPAT 的最适反应温度

2.3.2 酶的温度稳定性 由图 3 可知,在 0~50 ℃保温 3 h 后,残留酶活力仍在 90% 以上;60 ℃、70 ℃保温 3 h 后酶活力分别下降了 44.54%、56.62%;70 ℃下保温 3 h 后残留酶的活力仍有 43.48%。说明该酶有较好的耐热性。

2.3.3 酶促反应的最适 pH 值 由图 4 可知,PPAT 的最适反应 pH 值为 9.0,该酶在 pH 值 8.0~10.0 的条件下具有较高的酶活力,pH 值过高或过低,酶活力相对有较大损失,pH 值为 6.0 和 12.0 时,酶活力分别只有峰值的 15.03% 和 21.68%。

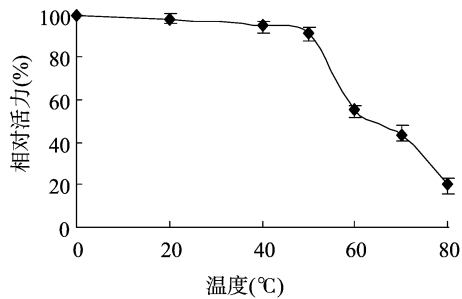


图3 PPAT 的温度稳定性

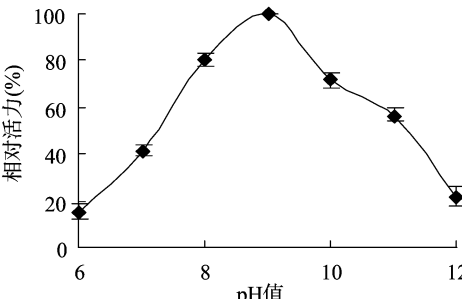


图4 PPAT 的最适反应 pH 值

2.3.4 酶的 pH 值稳定性 由图 5 可知,PPAT 的 pH 值稳定范围在 7.0~9.0 之间,3 h 后残留的酶活力仍在 90% 以上,当 pH 值低于 7.0 或高于 10.0 酶活力下降迅速。

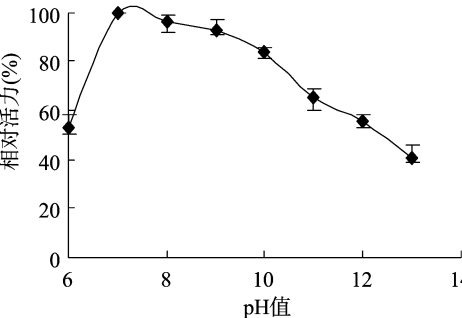


图5 PPAT 的 pH 值稳定性

2.3.5 双底物乒乓反应动力学常数的测定和底物特异性
2.3.5.1 豆芽 PPAT 动力学常数的测定 在 37℃、pH 值 9.0 的条件下,采用双底物乒乓反应动力学的方法,以 PM、丙酮酸作为底物,测得该酶的 K_m 分别为 1.67、5.33 mmol/L (图 6、图 7)。

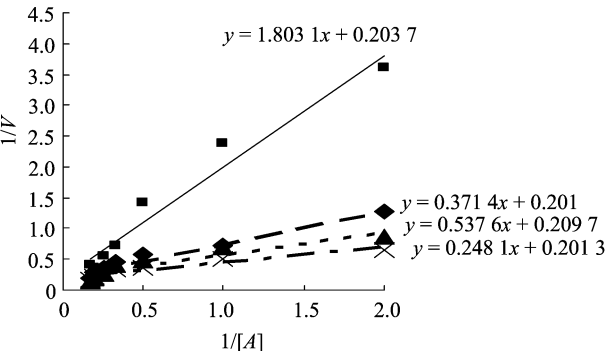


图6 乒乓反应的 $1/V$ 对 $1/[A]$ 双倒数趋势($[B]=x[A]$)

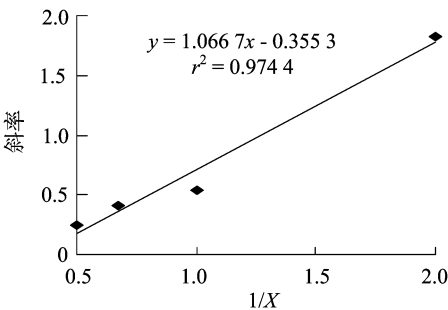


图7 直线斜率对相应的 $1/X$ 直线图

2.3.5.2 底物特异性 由表 2 可知,以 PM、丙酮酸;PM、草酰乙酸作为底物时,豆芽 PPAT 表现出较强的活性;而以 PM、 α -酮戊二酸; DL -天冬氨酸、 α -酮戊二酸; DL -丙氨酸、 α -酮戊二酸作为底物时,该酶具有相对较小的催化活性。

表 2 豆芽 PPAT 的底物特异性

氨基供体	氨基受体	相对活性 (%)
PM	丙酮酸	100 ± 0.8
PM	草酰乙酸	98.4 ± 0.6
PM	α -酮戊二酸	18.1 ± 1.2
DL -天冬氨酸	α -酮戊二酸	19.4 ± 1.6
DL -丙氨酸	α -酮戊二酸	3.5 ± 1.0

3 结论与讨论

本试验通过硫酸铵分段盐析、Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析、DEAE-Sephadex Fast Flow 阴离子交换柱层析,对新鲜豆芽中的吡哆胺-丙酮酸转氨酶进行分离纯化,该酶被纯化了 207.56 倍。经 SDS-PAGE 电泳检测,提供的酶样品达到电泳级纯。

部分酶学性质研究结果表明,该酶的最适酶促反应温度为 50℃,温度的稳定性范围为 0~50℃,最适酶促反应 pH 值为 9.0,pH 值稳定范围为 7.0~9.0。另外,当底物为 PM、丙酮酸和 PM、草酰乙酸时,PPAT 具有较高活性。Wada 等发现草酰乙酸在较高温度的条件下可以分解成丙酮酸,所以在进行底物特异性测定时,PM 和草酰乙酸作为底物,PPAT 表现出较高活性。同时,也说明 PM 和丙酮酸是作为 PPAT 酶促反应的特异性底物,此酶为专一性转氨酶^[2],这与 Yoshikane 等研究的结论^[3]相符。以 PM 和丙酮酸作为底物,通过乒乓双底物反应动力学方法得到该纯化样品酶 K_m 分别为 1.67、5.33 mmol/L,结果表示底物 PM 和 PPAT 的亲合力更强。

参考文献:

[1] Kerry J A, Kwok F. Purification and characterization of pyridoxal kinase from human erythrocytes[J]. Preparative Biochemistry, 1986, 16(3):199-216.
[2] Wada H, Snell E E. Enzymatic transamination of pyridoxamine. II. Crystalline pyridoxamine-pyruvate transaminase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1962, 237:133-137.
[3] Yoshikane Y, Yokochi N, Yamasaki M, et al. Crystal structure of pyridoxamine-pyruvate aminotransferase from *Mesorhizobium loti* MAFF303099[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(2):1120-1127.

王白娟. 高压脉冲电场对普洱茶中茶水浸出物含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 243–245.

高压脉冲电场对普洱茶中茶水浸出物含量的影响

王白娟

(云南农业大学基础与信息工程学院, 云南昆明 650201)

摘要:以云南勐库大叶种普洱茶为原料, 利用 3 组不同条件的高压脉冲电场(HPEF)对茶样进行处理, 检测经 HPEF 处理前后的茶样的茶水浸出物。结果表明, 经 HPEF 处理后, 茶样的茶水浸出物含量明显增加。

关键词:普洱茶; 高压脉冲电场(HPEF); 茶水浸出物

中图分类号:TS272 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2013)10–0243–03

普洱茶是以云南省一定区域内的云南大叶种晒青毛茶为原料, 经过后发酵加工工艺制成, 是具有特殊品质的茶叶, 按加工工艺分为熟茶和生茶^[1], 具有香气独特陈香, 汤色红浓明亮, 滋味醇厚回甘的特点^[2], 普洱茶因其对人体健康具有特殊的保健功效和“越陈越香”的存储方式, 备受国内外饮茶者的喜爱。在几百年的生产实践中, 人们已经摸索出一整套关于发酵、贮藏与陈化的工艺方法, 尤以贮藏与陈化作为至关重要的环节备受重视。当年的新鲜普洱茶刺激性大、苦涩, 需要经过自然贮藏很长时间, 使其陈化老熟, 柔和醇厚, 达到最佳饮用期, 但随着存储时间增长, 普洱茶中茶水浸出物的含量明显下降, 如何提高陈年普洱茶的茶水浸出物含量的研究备受关注。

茶叶水浸出物即茶叶中能溶于热水中的茶多酚类、游离氨基酸类、咖啡碱、维生素 C 等品质化学成分和保健成分, 是茶叶品质的重要指标之一^[3]。茶水浸出物是人体所必需及平衡协调作用的营养成分, 有研究表明, 茶叶品质优与次是由茶叶中生化成分种类、含量及其比例决定。水浸出物对茶叶品质起着决定性作用。“祁红美名甲天下, 祁红品质群芳最”就是因为各种可溶性物质含量和比例较协调, 形成了祁红声誉百年不衰。研究不同处理对水浸出物含量及制茶品质影响, 对茶树育种、栽培管理和茶叶制作等都具有积极意义^[4]。

本研究对不同年份的 14 种云南勐库大叶种普洱茶茶水浸出物含量进行分析, 比较相同茶叶在经过不同存储时间以

后茶水浸出物含量的差异。结果表明, 时间存放越久, 茶水浸出物含量越低; 比较不同加工工艺的茶叶(生茶和熟茶), 发现生茶的茶水浸出物含量高于熟茶的茶水浸出物含量。利用 3 组不同条件(电压/频率/时间)的高压脉冲电场(HPEF)对茶样进行处理, 高压脉冲电场是近年来非热杀菌技术的热门研究领域之一, 它具有能耗低、传递均匀、作用时间短、无污染等诸多优点, 已被广泛应用于食品加工工业中^[5]。除了杀菌外, 同时也越来越多地应用于物质提取、污水处理、烟草除虫、白酒和红酒的陈化等^[6–9]。本研究结果为提升普洱茶的品质提供了新的途径, 也为今后普洱茶深加工和开发普洱茶功能食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 普洱茶样品

普洱茶样品来自普洱茶第一品牌云南勐海茶厂的大益品牌, 选择了被誉为“普洱茶标准”的大益 7572 和大益 7542, 原料均来源于云南省的主要产茶区勐海县, 普洱茶品名、类型、形状、等级、生产日期、产地等见表 1。

1.2 茶水浸出物检测

茶水浸出物测定按照中华人民共和国国家标准 GB/T 8305—2002《茶 水浸出物测定》。

1.3 高压脉冲电场(HPEF)的产生

采用由大连理工大学静电与特种电源研究所研制的直流高压发生器, 配上储能电容 C_e 和脉冲电容 C_p 等 2 组电容器, 通过相互垂直的 2 个火花隙开关 RSG1 和 RSG2 的一通一断, 实现脉冲电容的充电和向高压接口相连的反应器极板与地板板间放电, 从而在两极板间形成前沿陡峭的高压脉冲电场(图 1)。主要性能参数: 输出电压 0~60 kV 可调, 脉冲宽度

收稿日期: 2013–03–14

基金项目: 云南省教育厅重点课题(编号: 2012Z134C)。

作者简介: 王白娟(1979—), 女, 云南剑川人, 硕士, 副教授, 主要从事生物物理方面的研究。E-mail: wangbaijuan123@126.com。

[4] Tanenbaum S W. A study of the transamination reaction by use of isotopic nitrogen[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1956, 218(2): 733–743.

[5] Wilson D G, King K W, Burris R H. Transamination reactions in plants[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1954, 208(2): 863–874.

[6] Wada H, Snell E E. Enzymatic transamination of pyridoxamine. I. With oxaloacetate and α -ketoglutarate[J]. Biological Chemistry, 1962, 237: 127–132.

[7] Yoshikane Y, Yokochi N, Ohnishi K, et al. Molecular cloning, expres-

sion and characterization of pyridoxamine–pyruvate aminotransferase[J]. Biochemistry, 2006, 396(3): 499–507.

[8] 曾海彬, 张剑韵, 黄龙全. 采用高效液相色谱技术分析烟草体内的维生素 B6 化合物[J]. 广西植物, 2011, 31(5): 695–698, 710.

[9] 钱嘉渊. 酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991: 279–316.

[10] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 102–208.

[11] 朱妹. 天冬氨酸转氨酶分离纯化及其性质研究[D]. 南京: 南京工业大学, 2004: 1–52.