

TRANSAMINIERUNG UND DESAMINIERUNG VON PHENYLALANIN IN WURZELN VON *ZEa MAYS**

TATIANA PŠENÁKOVÁ, PETER KOVÁCS und MIKULÁŠ PŠENÁK

Botanisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Abteilung für Physiologie der Pflanzen und Lehrstuhl für Biochemie und Mikrobiologie der Pharmazeutischen Fakultät, Komenský Universität, Bratislava, Tschechoslowakei

(Received 7 February 1969, in revised form 28 May 1969)

Abstrakt—In zellfreien Extrakten aus drei Tage alten Wurzeln von *Zea mays* konnten die Transaminase und Ammonium-Lyase des L-Phenylalanins durch Fraktionierung mit Ammoniumsulfat bzw. Sephadex G-200-Säulen getrennt werden. Es wurden das pH-Optimum und die Temperatur-Stabilität dieser Enzyme, sowie die Substratspezifität der Transaminase bestimmt.

Abstract—L-phenylalanine transaminase and ammonia lyase were isolated from cell-free extracts of 3-day-old *Zea mays* roots and fractionated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and Sephadex G 200. The pH optima and temperature stability of both enzymes and the substrate specificity of the transaminase were determined.

EINLEITUNG

DIE TRANSAMINASE und Ammonium-Lyase des Phenylalanins (E.C. 2.6.1.5 und E.C. 4.3.1.5) spielen eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel dieser Aminosäure. Das Vorkommen der Phenylalanin-Transaminase¹⁻³ und der Phenylalanin-Ammonium-Lyase⁴⁻⁷ in höheren Pflanzen ist bekannt; beide Enzyme wurden schon in gereinigtem Zustande dargestellt.^{1, 2, 6-8}

Im Zusammenhang mit einigen Aspekten des Stoffwechsels des Phenylalanins und weiterer aromatischer Stoffe in Maiswurzeln interessierten wir uns für diese Enzyme.

Die Ergebnisse die wir bei der Isolierung und Reinigung, sowie bei der näheren Charakterisierung dieser Enzyme gewonnen haben, legen wir in dieser Arbeit vor.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Vorkommen der Phenylalanin-Transaminase und Phenylalanin-Ammonium-Lyase wurde in Wurzeln von drei Tage alten Keimlingen der Pflanze *Zea mays* "Český biely kónský zub" nachgewiesen. Die Anreicherung dieser Enzyme ist in der Tabelle angegeben.

Die Fraktion 20-60% Ammoniumsulfatsättigung, die die beiden untersuchten Enzyme enthielt, wurde einer weiteren Trennung an einer Sephadex G-200-Säule unterworfen; in diesem Reinigungsschritt konnten die beiden Enzyme getrennt werden (Abb. 1).

* Teil III der Serie: Enzyme des Aminosäurestoffwechsels; Teil II: *Flora*—im Druck.

¹ O. L. GAMBORG, *Can. J. Biochem.* **43**, 723 (1965).

² O. L. GAMBORG und L. R. WETTER, *Can. J. Biochem. Physiol.* **41**, 1733 (1963).

³ A. JINDRA, P. KOVÁCS, H. ŠMOGROVÍČOVÁ und M. SOVOVÁ, *Lloydia* **30**, 158 (1967).

⁴ J. KOUKOL und E. E. CONN, *J. Biol. Chem.* **236**, 2692 (1961).

⁵ M. ZUCKER, *Plant Physiol.* **43**, 365 (1968).

⁶ D. S. HODGINS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 246 (1968).

⁷ E. A. HAVIR und K. R. HANSON, *Biochemistry* **7**, 1896 (1968).

⁸ E. A. HAVIR und K. R. HANSON, *Biochemistry* **7**, 1904 (1968).

Das Anreicherungsverfahren ergab eine 40-fache bzw. 57-fache Anreicherung der Phenylalanin-Transaminase bzw. Phenylalanin-Ammonium-Lyase. Die Reaktionsgeschwindigkeit war proportional der Enzymkonzentration.

Aus dem Verlauf der Aktivitätsänderungen bei verschiedenen Temperaturen inkubierter Ansätze wurde erkennbar, dass die Phenylalanin-Transaminase bei 50° inaktiviert wird. Eine etwas höhere Temperaturstabilität zeigt die Phenylalanin-Ammonium-Lyase, bei der die Inaktivierung erst bei 70° eintritt. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen anderer Autoren⁹ überein die grosse Empfindlichkeit und Unbeständigkeit der pflanzlichen Transaminasen betreffend.

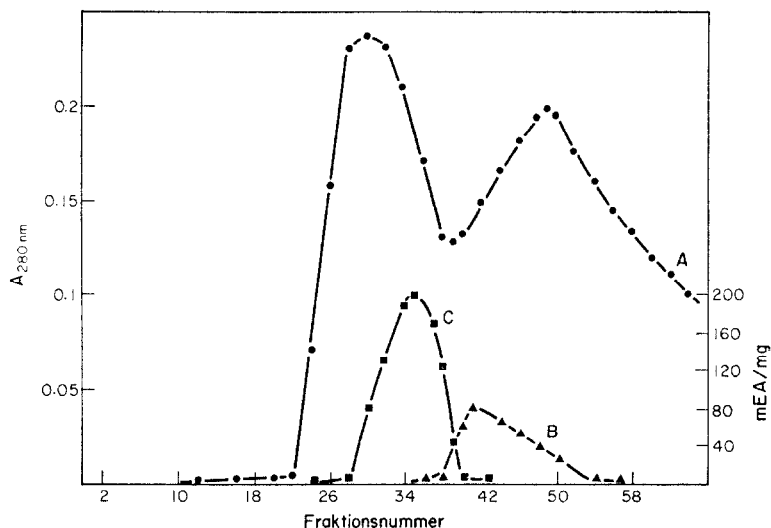


Abb. 1. ELUTIONSVERLAUF DER PROTEINE (A), PHENYLALANIN-TRANSAMINASE (B) UND PHENYLALANIN-AMMONIUM-LYASE (C) AUS SEPHADEX G-200-SÄULE (2 × 40 CM). DIE AKTIVITÄT DER ENZYME IST IN SPEZIFISCHER AKTIVITÄT—mEA/MG PROTEIN—ANGEGEBEN. FRAKTION: 2 ML.

Die gereinigte Phenylalanin-Transaminase zeigt ein verhältnismässig breites pH-Optimum zwischen pH 6 und pH 8. Der nach Lineweaver und Burk¹⁰ bestimmte Wert für K_m beträgt $3,4 \times 10^{-3}$ M. Ein ausgeprägteres pH-Optimum von pH 9 konnte im Falle der Phenylalanin-Ammonium-Lyase bestimmt werden. Die Konstante K_m wurde für dieses Enzym zu $1,1 \times 10^{-3}$ M bestimmt.

Die Phenylalanin-Transaminase aus Maiswurzeln zeigt ein breites Spektrum der Substratspezifität; auch L-Tyrosin, L-Tryptophan, L-Histidin und L-Aspartat können sich als Substrate an der Reaktion beteiligen. Es kam aber nicht zu einer Transaminierung von L-Alanin, L-Ornithin und L-Arginin. Was die Acceptorspezifität dieser Transaminase betrifft, so konnte weder mit Pyruvat noch Oxalacetat eine Transaminierung des L-Phenylalanins mit den gereinigten Enzym nachgewiesen werden.

Die angeführten Ergebnisse weisen daraufhin, dass in den drei Tage alten Wurzeln der Keimlinge des Maises ein intensiver Phenylalaninumsatz stattfindet.

⁹ K. HASSE, O. T. RATYCH und J. SALNIKOW, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 843 (1967).

¹⁰ H. LINEWEAVER und D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658 (1934).

EXPERIMENTELLER TEIL

Pflanzenmaterial

Für die Versuche wurden drei Tage alte Keimlinge des Maises "Česky biely konský zub" verwendet. Die Samen wurden 12 Stunden in Wasser gequollen, auf angefeuchtetes Filtrierpapier ausgesät und bei 25° im Dunkeln gezogen.

Enzymreinigung

Die angegebene Präparation wurde bei 0° durchgeführt. Das Acetongetrocknete Präparat der Wurzeln wurde mit 0,005 M Phosphatpuffer, pH 7, extrahiert. Der von ungelösten Anteilen durch Zentrifugation befreite (15 Minuten bei $10,000 \times g$) Rohextrakt wurde durch Ammoniumsulfatfraktionierung in den Grenzen 0–20, 20–60 und 60–100% Ammoniumsulfatsättigung gefällt. Die einzelnen Eiweißfraktionen wurden in wenig 0,005 M Phosphatpuffer, pH 7, aufgenommen und über Nacht gegen 0,001 M Phosphatpuffer vom gleichen pH-Wert dialysiert.

Nach Auftragen der Enzymlösung wird die Sephadex G-200-Säule mit demselben Puffer entwickelt (0,005 M Phosphatpuffer) mit dem die Säule zuvor äquilibriert wurde. Proteinbestimmungen wurden nach Lowry¹¹ durchgeführt.

Messung der Transaminierungsaktivität

L-Phenylalanin: α -Ketoglutarat Transaminase wurde durch spektrophotometrische Messung der während der enzymatischen Reaktion sich bildenden Phenylbrenztraubensäure² bestimmt. Die Zusammensetzung des Standardansatzes war: 1,3 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8, 10 μ Mol α -Ketoglutarat, 20 μ Mol L-Phenylalanin, 0,5 μ Mol Pyridoxalphosphat und 1 ml Enzymlösung in einem Gesamtvolumen von 3 ml. Die Enzymlösungen wurden bei 40° mit Pyridoxalphosphat 5 Minuten lang vorinkubiert. Proben von 0,7 ml waren vom Anfang der Reaktion (nachdem α -Ketoglutarat zugegeben wurde) in 20 Minuten Abständen zu je 2,3 ml einer 0,5 N NaOH Lösung zugegeben und die Extinktion dieser Proben bei 320 nm gegen Blindproben (Ansätze ohne Acceptor) gemessen. Die Menge des Phenylpyruvats errechnete sich aus einer Kalibrationskurve. Die Einheit der Enzymaktivität (EA) ist als diejenige Enzymmenge definiert, die in 1 Minute die Bildung von 1 μ Mol Phenylpyruvat katalysiert.

Messung der Desaminierungsaktivität

Die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Desaminierung des L-Phenylalanins wurde mittels der während der Reaktion sich bildenden Zimtsäure bestimmt. Die Reaktionsansätze enthielten: 1,3 ml 0,2 M Tris-HCl Puffer, pH 8,8, 20 μ Mol L-Phenylalanin und 0,5 ml Enzymlösung in einem Gesamtvolumen von 3 ml. Die Inkubation wurde bei 40° 1 Stunde lang durchgeführt, wobei alle 15 Minuten 0,5 ml Anteile entnommen und zu je 2,5 ml einer 0,5 N NaOH Lösung zugegeben waren. Die Menge der Zimtsäure wurde bei 268 nm unter Verwendung einer Kalibrationskurve dieser Säure bestimmt. Als Kontrollproben wurden am Anfang der Reaktion abgenommene Proben sowie Ansätze ohne Zugabe von Phenylalanin verwendet. Die Einheit der Enzymaktivität (EA) ist als diejenige Enzymmenge definiert, die in 1 Minute die Bildung von 1 μ Mol Zimtsäure katalysiert.

Enzymeigenschaften

Die Abhängigkeit des Umsatzes von dem pH-Wert der Ansätze wurde bei pH 5,0 (0,1 M Citrat-Phosphatpuffer), bei pH 6,0, 7,0, 8,0 (0,1 M Phosphatpuffer), bei pH 9,0 (0,2 M Tris-HCl Puffer) und bei pH 10,0 (0,1 M Carbonatpuffer) bestimmt. Als Enzymlösung fanden die Fraktionen III (vgl. Tabelle 1) mit spezifischer Aktivität von 32 mEA/mg Protein (bei der Phenylalanin-Transaminase) bzw. von 68 mEA/mg Protein (bei der Phenylalanin-Ammonium-Lyase) Verwendung.

TABELLE 1 ANREICHERUNG DER PHENYLALANIN-TRANSAMINASE (TA) UND PHENYLALANIN-AMMONIUM-LYASE (AL)

| Reinigungsschritt Fraktion | Vol. (ml) | Enzymaktivität (mEA) | | Protein (mg) | Spezif. Aktivität (mEA/mg) | | Anreicherung n-fach | |
|--|--------------|-------------------------|-------|-----------------|-------------------------------|-------|------------------------|------|
| | | TA | AL | | TA | AL | TA | AL |
| Rohextrakt (I) | 36 | 287 | 513 | 151 | 1,9 | 3,4 | 1,0 | 1,0 |
| 20–60% (NH ₄) ₂ SO ₄ Fällung (II) | 14,4 | 158 | 383 | 26,1 | 6,1 | 14,7 | 3,0 | 4,3 |
| Sephadex G-200 Säule (III) | 2 | 8,8* | 21,4* | 0,11 | 81,0 | 195,0 | 40,0 | 57,0 |

* Elutionsfraktionnummer: für TA=41; für AL=35.

¹¹ L. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

Der Temperatureinfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei Temperaturen von 25° bis 70° beobachtet. Es wurden die gleichen Enzymlösungen verwendet wie bei den pH Versuchen.

Substratspezifität

Zur Prüfung der Transaminaseaktivität gegenüber verschiedenen Aminosäuren (L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Histidin, L-Aspartat, L-Alanin, L-Arginin und L-Ornithin) wurden Ansätze mit α -Ketoglutarensäure zur Reaktion gebracht. Die gebildete Glutaminsäure wurde qualitativ papierchromatographisch nachgewiesen. Die verschiedenen Aminosäuren wurden in der gleichen Konzentration von 20 μ Mol/Ansatz zum Standardansatz zugegeben. Es wurde eine Enzymlösung mit spezifischer Aktivität von 80 mEA/mg Protein untersucht.

Acceptorspezifität

Die Acceptorspezifität wurde in Standardansatz untersucht; Pyruvat bzw. Oxalacetat wurden in der gleichen Konzentration (10 μ Mol/Ansatz) beigesetzt, wie es für die α -Ketoglutarensäure beschrieben wurde. Bei diesen Versuchen wurde eine Enzymlösung wie oben angegeben, verwendet.