

УДК 58.01

Кулиева С.М., Гюльяхмедов С.Г., Кулиев А.А.
Бакинский государственный университет (Азербайджан)

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕНИЛАЛАНИН-АММИАК-ЛИАЗЫ, КОЛИЧЕСТВО АНТОЦИАНИНОВ И ФЛАВОНОИДОВ ПРИ РОСТЕ И СОЗРЕВАНИИ ПЛОДОВ ЯБЛОНИ НА МАТЕРИНСКОМ ДЕРЕВЕ

Аннотация. Изучена динамика изменения активности фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ), а также количества антоцианинов и флавоноидов в плодах яблони двух сортов (*Malus domestica* Borkh.) в ходе их роста и созревания на материнском дереве. В зависимости от степени созревания и сортового состава плодов все три исследуемые показатели достоверно отличались между собою. Кривые, отражающие изменение активности ФАЛ, имели два пика. На средней стадии роста плодов активность ФАЛ значительно уменьшилась. Обнаружена положительная корреляция между уровнем активности ФАЛ и общим количеством флавоноидов. С антоцианинами такая корреляция не обнаружена.

Ключевые слова: фенилаланин-аммиак-лиаза (ФАЛ), антоцианины, флавоноиды, яблоко (*Malus domestica* Borkh.).

S. Qulieva, S. Gulahmadov, A. Quliev
Baku State University, Azerbaijan

STUDY OF PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE ACTIVITY, ANTHOCYANIN AND FLAVONOID LEVELS AT DIFFERENT STAGES OF APPLE FRUIT DEVELOPMENT ON MOTHER TREE

Abstract. We report the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, anthocyanin and flavonoid levels at different stages of apple fruit (*Malus domestica* Borkh.) development on mother trees. We have observed a wide variation in the level of the PAL activity, anthocyanin and total flavonoid levels in different apple cultivars and at different stages of development. The curves showing the change in the PAL activity have two distinct peaks. The PAL activity was found to be the highest in immature fruit, dropped to low levels during development, and then rose upon ripening. We have found a significant correlation between the average PAL activity over the all developmental stages and the final concentration of total flavonoids; however, apparent correlation between the average PAL activity and final anthocyanin concentration has not been observed.

Key words: phenylalanine ammonia-lyase (PAL), anthocyanin, flavonoid, apple fruit (*Malus domestica* Borkh.), maturation.

В цепи событий, лежащих в основе формирования товарного вида и вкусового качества плодов яблони и ряда

других сочных плодов, основное место занимает синтез вторичных метаболитов, таких, как антоцианины и флавоноиды. В растительных тканях разнообразность и количество флавоноидов

© Кулиева С.М., Гюльяхмедов С.Г., Кулиев А.А., 2014.

зависит от их генотипа [13, с. 111]. На ранних стадиях роста и развития кожура плодов яблони содержит большое количество проантоцианидинов и флавонолов. В некоторых сортах этих плодов при их созревании накапливаются также антоцианины [8, с. 867].

Углеродный скелет всех флавоноидов формируется из двух основных промежуточных метаболитов фенилпропаноидного пути: малонил-КоА и *p*-кумарил-КоА [14, с. 401]. Первой стадией синтеза этих соединений в тканях высших растений является дезаминирование L-фенилаланина, в результате которого образуются *транс*-коричная кислота и аммиак. Эта реакция катализируется фенилаланин-аммиак-лиазой (ФАЛ КФ 4.3.1.5), которая часто считается ключевым ферментом синтеза флавоноидов [12, с. 851]. В растительных тканях уровень активности ФАЛ зависит от генотипа особей, возраста, степени зрелости, а также от органа и типа тканей [7, с. 178]. На активность ФАЛ влияет ряд факторов, такие, как свет, температура, регуляторы роста, ингибиторы биосинтеза РНК и белка, водное голодание и минеральное питание [16, с. 1355].

Показано, что во многих тканях повышение активности ФАЛ коррелирует с увеличением количества флавоноидов. В большинстве случаев параллельно с этими процессами увеличивается активность также тех ферментов, которые ассоциируются с путем анаболизма флавоноидов [16, с. 1359]. В некоторых растительных тканях биосинтез антоцианинов также ассоциирует с повышением активности ФАЛ. Однако можно привести немало примеров тканей растений, где функционирование ФАЛ не приво-

дит к биосинтезу и накоплению антоцианинов. Это связано с тем, что ФАЛ проявляет активность при биосинтезе целого ряда других фенилпропаноидных соединений, таких, как шикимовая кислота и ее эфирное производное с КоА, а также связанные с ними вещества типа хлорогенной кислоты, кумарина и лигнина [16, с. 1351].

Таким образом, информация о содержании и количестве антоцианинов и флавоноидов в растительных тканях носит неоднозначный характер, а вопрос о месте и роли ФАЛ в биосинтезе и накоплении этих соединений остается открытым. В настоящей работе было изучено изменение активности фенилаланин-аммиак-лиазы, количество антоцианина и флавоноидов на фоне роста и созревания плодов яблони на материнских деревьях.

Материалы и методы

Объектами исследования служили плоды яблوك (*Malus domestica* Borkh.) двух зимних сортов (Гызыл Ахмеди и Ренет Симиренко), произрастающих в окрестностях города Губа, в северо-восточной части Азербайджана. Плоды исследуемых сортов отличались между собою по размерам и окрашиванию. Так, плоды сорта Гызыл Ахмеди по размерам немного уступали плодам Ренет Симиренко. Зрелые плоды сорта Гызыл Ахмеди полностью окрашивались в темно-красный цвет, тогда как зрелые плоды Ренет Симиренко имели желтовато-зеленый цвет. Цветение деревьев наблюдалось в первой декаде мая. Для исследования плоды собирали в разные периоды их роста и развития. Плоды, собранные 15 июня и 1 июля, мы считали как плоды ран-

него срока развития, а 15 июля, 1 и 15 августа – среднего срока развития и, наконец, собранные 31 августа и 15 сентября – позднего срока развития. Осторожно собранные плоды, в картонных коробках, наполненных мелкими опилками, были доставлены в лабораторию и до использования хранились при 4°C.

Ферментный препарат ФАЛ экстрагировали из кожуры плодов по слегка модифицированной методике [17]. С этой целью с пяти плодов снимали 5 г кожуры и помещали ее в фарфоровую ступку с жидким азотом. Экстракцию проводили в среде, состоящей из 15 мл 20 mM Трис-Cl-буфера (pH 8.0), содержащего 5% PVP (МВ 44,000), 20 mM Na аскорбат, 10 mM меркаптоэтанол и 0.1% Тритон X-100. Далее гомогенат пропускали через двойной слой капроновой ткани и центрифугировали 10 мин при 20 000 g. Осадок отбрасывали и на супернатант добавляли сульфат аммония (35%). Спустя 30 мин, с целью удаления PVP, раствор еще раз подвергали центрифугированию в течение 20 мин при 20 000 g. На супернатанте концентрацию сульфата аммония увеличивали до 80%. Фракцию центрифугировали 20 мин при 20 000 g, осадок растворяли в 2 мл экстракционной среде без PVP и Тритон X-100. Полученный раствор подвергали диализу в том же растворе в течение ночи для получения частично очищенного препарата ФАЛ. Весь процесс получения препарата ФАЛ повторяли трижды для каждого сорта яблок и проводили при 4°C. Белок определяли по методу [5], в качестве стандарта использовали БСА.

Инкубационная среда для определения активности фермента в препа-

рате состояла из 15 mM Трис-HCl буфера (pH 8,5), 12 mM L-фенилаланина, 0,5 мл ферментного препарата. Реакцию проводили в кварцевых кюветках (размер 1x1x4 см). Контрольным вариантом служила реакционная смесь, не содержащая L-фенилаланин. Общий объем инкубационной среды составлял 3 мл. В контроль вместо субстрата добавляли 0,5 мл буферного раствора. Реакционную смесь инкубировали в течение часа при 37°C. Реакцию останавливали добавлением в среду 35% ледяную ТФУ. Далее, для осаждения денатурирующих белковых молекул, содержимое инкубационной среды центрифугировали 5 мин при 5000 g. Активность фермента определяли спектрофотометрическим методом по изменению оптической плотности реакционной среды при 290 нм. Активность ФАЛ выражали в единицах оптической плотности. Расчет активности проводили на исходный вес сырой ткани или на 1 мг белка ($\Delta E/\text{мг}$ белка или $\Delta E/\text{г}$ сырого веса ткани).

Количество антоцианинов и флавоноидов определяли по модифицированной методике [15]. Каждый раз, параллельно с процедурой приготовления ферментного препарата ФАЛ, с тех же образцов плодов снимали кожуру (2,5 г) и помещали в жидкий азот. После заморозки ткани осуществляли экстракцию с помощью 15% раствора уксусной кислоты в метаноле (25 мл). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 15000 g. В супернатанте количество проантоцианидинов, флавонолов и антоцианинов определяли спектрофотометрически при длине волны, соответственно, 280 нм, 350 нм и 530 нм. Полученные значения сравнивали со стандартными значениями соответствующих соединений.

Общее количество флавоноидов вычисляли исходя из полученных значений всех трех измерений.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования динамики изменения активности ФАЛ на разных стадиях роста и созревания плодов яблони представлены на рис. 1. Для плодов обоих сортов кривые, отражающие изученную динамику, характеризуются двумя пиками. Первый пик активности наблюдался на ранней

стадии роста плодов. На этой стадии в плодах сорта Гызыл Ахмеди она составляла 48 единиц. Далее по мере развития плодов активность ФАЛ резко уменьшалась и составляла лишь 32% того уровня, которая наблюдалась в начале опытов. Затем по мере созревания плодов активность фермента постепенно увеличивалась и достигала уровня 34 единиц, что уже на 28% меньше по сравнению с активностью, наблюдаемой на начальной стадии развития плодов.

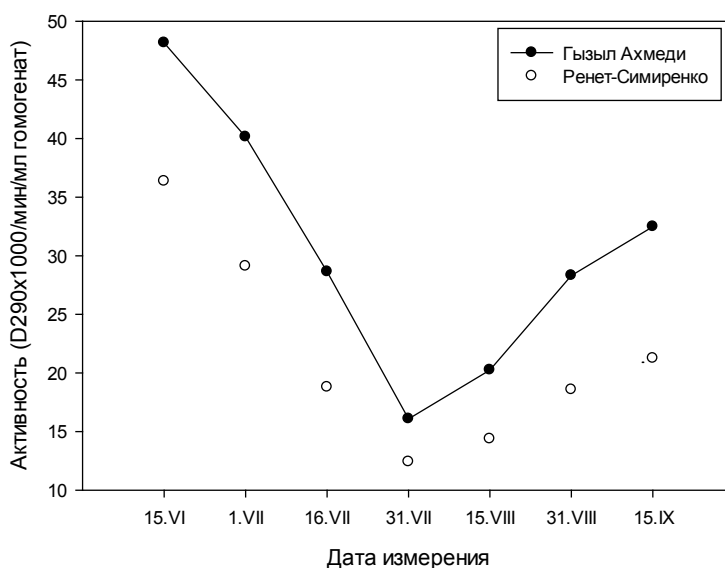


Рис. 1. Активность фенилаланин-аммиак-лиазы в кожуре плодов яблони сортов Гызыл Ахмеди и Ренет Симиренко на разных стадиях их роста и созревания

Аналогичные данные в плодах Ренет Симиренко составляли на начальной стадии роста 37 единиц, далее уровень активности фермента упала до 12 единиц, а на поздней стадии развития плодов повышалась до 22 единиц. Таким образом, разница между плодами исследуемых сортов проявилась лишь на уровнях активности ФАЛ. Так, в

плодах сорта Ренет Симиренко она была значительно меньше (40%), чем у сорта Гызыл Ахмеди.

В следующей серии экспериментов была изучена динамика изменения количества флавоноидов в кожуре на фоне роста и созревания плодов (рис. 2). Результаты исследований показали, что в зависимости от сортового состава

ва, а также от срока развития и степени созревания плодов, количество флавоноидов в кожуре отличается. В плодах обоих исследуемых сортов динамика изменения количества флавоноидов в целом напоминала динамику актив-

ности ФАЛ. Однако на средней стадии созревания плодов обоих сортов количество флавоноидов, в отличие от активности ФАЛ, уменьшилось постепенно, а затем медленно повышалось (рис. 2-А и Б).

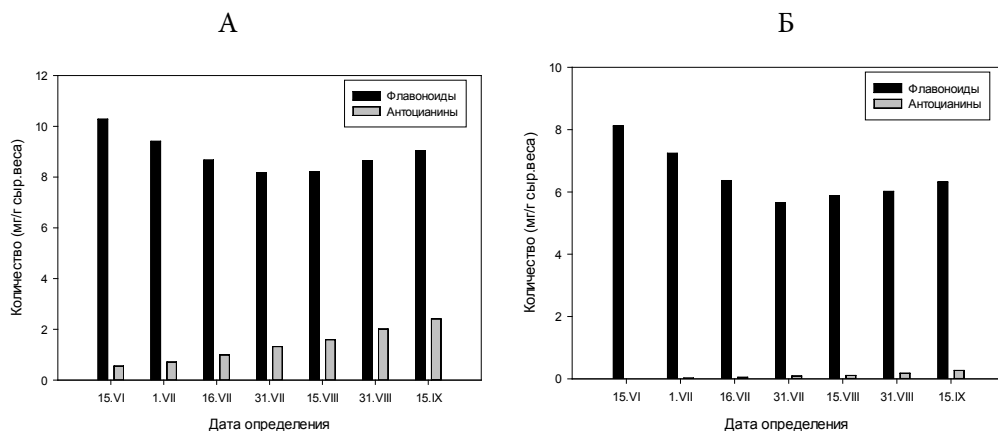


Рис. 2. Количество флавоноидов и антоцианинов в кожуре плодов яблоки сортов Гызыл Ахмеди (А) и Ренет Симиренко (Б) на разных стадиях их роста и созревания

На начальных стадиях роста количество антоцианинов в плодах сорта Гызыл Ахмеди было намного меньше (0,2 мг/г), чем флавоноидов и составляло лишь 1,9% от общего количества последних. Далее, по мере роста и созревания плодов наблюдалось линейное повышение их количества. На поздней стадии созревания количество антоцианинов достигало уровня 2,2 мг/г ткани (24,6% от общего количества флавоноидов). В плодах же сорта Ренет Симиренко, на первой стадии их роста и развития антоцианины практически не обнаруживались. На средней стадии роста и развития плодов (спустя 1 месяц) их наблюдали в следовом количестве (0,03 мг/г). Далее в плодах этого сорта количество антоцианинов тоже повышалось линейно и в конце опытов достигало уровня 0,2

мг/г ткани, что составляло 3,03% от общего количества обнаруживаемых в тот же период флавоноидов.

Таким образом, кривые, отражающие изменение активности ФАЛ в кожуре плодов яблоки в обоих исследуемых сортах, имели два пика. Спад активности ФАЛ обнаружен на средней стадии роста плодов. На наш взгляд, наблюдаемая разница между изученными показателями в плодах связаны в большей степени с генетическим различием сортов, нежели с факторами окружающей среды. Так как деревья находились на соседних участках, агротехнические и климатические условия их выращивания особенно не отличались друг от друга.

Обнаруживаемая в наших опытах динамика изменения активности ФАЛ была похожа на аналогичную

динамику в плодах клубники (*Fragaria ananassa* Duch.). Первый пик активности в этих плодах был обнаружен в зеленых незрелых плодах и совпал с увеличением в них количества флавоноидов. Второй пик был обнаружен в зрелых плодах, где количество антоцианинов было значительно больше [8, с. 866]. Увеличение активности ФАЛ при созревании клубники было обусловлено биосинтезом ферментного белка *de novo* [11, с. 27].

В литературе часто встречаются мнения о том, что ФАЛ является лимитирующим фактором в синтезе флавоноидов, коричной кислоты и других фенилпропаноидов [1, с. 208; 8, с. 866; 24, с. 781]. По мнению [19], наоборот, уровень фенилаланина может быть ключевым фактором в этом процессе. Похоже, что аллостерические механизмы ингибирования могут играть эффективную роль в регуляции активности ФАЛ. Извлечение такого важного метаболита, как фенилаланин, из активного метаболического пути биосинтеза белка должно осуществляться по иным механизмам. Превращение фенилаланина в «дорогие» вторичные вещества без должного регуляторного механизма нереально, поскольку это «не выгодно» организму растения [21, с. 2117].

В плодах яблони на всех стадиях их роста и развития уровень активности ФАЛ в опытах всегда превосходил скорость биосинтеза и накопления флавоноидов. Однако в большинстве случаев количество дезаминированных молекул фенилаланина было больше, чем накопленные фенольные соединения [2, с. 1159; 4, с. 2288; 18, с. 141; 21, с. 2118]. В плодах клубники была обнаружена параллель между

активностью ФАЛ и накоплением антоцианинов, хотя очевидный избыток на уровне активности изученного фермента не определял его как лимитирующий фактор [8, с. 866]. Вопреки всему вышеизложенному, существует мнение о том, что ФАЛ является ключевым ферментом превращения фенилаланина в фенольные соединения, следовательно, и в флавоноиды. Такое расхождение мнений исследователей можно объяснить тем, что, по всей видимости, из-за присутствия возможного(ых) ингибитора(ов) и различия значений рН, существует разница между *in vivo* и *in vitro* активности ФАЛ. Кроме того, существует ряд других факторов, определяющих взаимосвязь между активностью ФАЛ и накоплением флавоноидов. Например, метаболизм флавоноидов, возможно, имеет свою специфику, а их количество в тканях остается относительно стабильным. Что касается катаболизма флавоноидов, то этот процесс протекает в основном очень медленно, если протекает вообще [10, с. 554; 23, с. 477].

На фоне существующей корреляции между уровнем активности ФАЛ и количеством флавоноидов в плодах яблони, прямая связь фермента с количеством антоцианинов не наблюдалась. Это связано с тем, что антоцианины составляют очень небольшую часть общих флавоноидов. ФАЛ участвует в процессе биосинтеза ряда вторичных метаболитов, только малую часть которых составляют флавоноиды. Поэтому лучшую корреляцию можно обнаружить между активностью фермента и общим количеством фенольных соединений. ФАЛ участвует в синтезе хлорогенной кислоты, ко-

торая имеется в коже сочных плодов в достаточно высокой концентрации [6, с. 946; 9, с. 988; 22, с. 322].

Таким образом, кривые изменения активности ФАЛ в коже плодов исследуемых сортов имели два пика. На средней стадии роста плодов активность ФАЛ значительно уменьшилась. Обнаружена положительная корреляция между уровнем активности ФАЛ и общим количеством флавоноидов. С антоцианинами такая корреляция не обнаружена. Без дополнительных исследований невозможно сделать заключение о лимитирующем характере ФАЛ в процессах синтеза флавоноидов и антоцианинов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Кулиева С.М., Гюльяхмедов С.Г. Фенилаланин-аммиак-лиаза плодов яблони (*Pyrus domestica* Borkh.) // Труды ин-та ботаники НАНАз. – 2012. – Т. 32. – С. 206-209.
2. Лаанест Л.Э., Маргна У.В. Роль фенилаланин-амиак-лиазы в накоплении флавоноидов в проростках гречихи // Физиология растений. – 1972. – Т. 19 (вып. 6). – С.1157-1164.
3. Олениченко Н.А., Загоскина Н.В. Ответная реакция озимой пшеницы на действие низких температур: образование фенольных соединений и активность L-фенилаланин-амиак-лиазы // Прикл. биохим. и микробиол. – 2005. – Т. 41 (№ 6). – С. 681-685.
4. Ahmed S.I., Swain T. The effect of light on the activity of enzymes of the aromatic pathway in peas and mung beans // Phytochemistry. – 1970. – V. 9. – P. 2287-2290.
5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Annu. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
6. Burda S., Oleszek W., Lee C.Y. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage // J. Agr. Food Chem. – 1990. – V. 38. – P. 945-948.
7. Camm E.L., Towers G.H.N. Phenylalanine ammonia lyase // Progress in Phytochemistry [Vol. 4] / L. Reinhold, J.B. Harborne and T. Swain (eds.).– Oxford: Pergamon Press, 1977. – P. 169-188.
8. Cheng G.W., Breen P.J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1991. – V. 116. – P. 865-869.
9. Coseteng M.Y., Lee C.Y. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning // J. Food Sci. – 1987. – V. 52. – P. 985-989.
10. Dangelmayr B. Relationship between flower development, anthocyanin accumulation and activity of enzymes involved in flavonoid biosynthesis in *Matthiola incana* R. / B. Dangelmayr, G. Stotz, R. Sribille et al. // Br. Z. Naturforsch. – 1983. – V. 38. – P. 551-555.
11. Given N.K., Venis M.A., Grierson D. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit // J. Plant Physiol. – 1988. – V. 133. – P. 25-30.
12. Gulahmadov S., Kuliyeva S. and Kuliyevev A. Intracellular Localization and Molecular Forms of Phenylalanine Ammonia-Lyase in Apple Fruits (*Pyrus Domestica* Borkh.) // Int. J. Agric. Biol. – 2013. – № 13. – P. 847-855.
13. Hahlbrock K., Grisebach H. Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids // Annu. Rev. Plant Physiol. – 1979. – V. 30. – P. 105-130.
14. Heller W., Forkmann G. Biosynthesis // The flavonoids / J.B. Harborne (ed.). – L.: Chapman and Hall, 1988. – P. 399-425.
15. Jiang Y., Jouce D.C. ABA effects on ethylene productions, PAL activity, antocianyn and

- phenolic contents of strawberry fruit // *Plant Growth Regul.* – 2003. – V. 39. – P. 171-174.
16. Jones D.H. Phenylalanine ammonia-lyase. Regulation of its induction, and its role in plant development // *Phytochemistry.* – 1984. – V. 23. – P. 1349-1359.
17. Lister C.E. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar / C.E. Lister, J.E. Lancaster, K.H. Sutton et al. // *J. Sci. Food Agr.* – 1994. – V. 64. – P. 155-161.
18. Maier V.P., Hasegawa S. L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and naringenin glycoside accumulation in developing grapefruit // *Phytochemistry.* – 1970. – V. 9. – P. 139-144.
19. Margna U. Control at the level of substrate supply – an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cells // *Phytochemistry.* – 1977. – V. 16. – P. 419-426.
20. Stafford H.A. *Flavonoid Metabolism.* – Boca Raton, Fl.: CRC Press, 1990. – 560 p.
21. Swain T., Williams C. The role of phenylalanine in flavonoid biosynthesis // *Phytochemistry.* – 1970. – V. 9. – P. 2115-2122.
22. Walker J.R.L. Studies on the enzymic browning of apple fruit // *N.Z. J. Sci.* – 1962. – V. 5. – P. 316-326.
23. Zenner K., Bopp M. Anthocyanin turnover in *Sinapis alba* L. // *J. Plant Physiol.* – 1987. – V. 126. – P. 475-482.
24. Zucker M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue // *Plant Physiol.* – 1965. – V. 40 (№ 5). – P. 779-784.