

研究报告

苹果树腐烂病菌胞外果胶酶分离纯化及其性质

冯浩¹ 何媛媛² 甄伟² 高小宁¹ 王惠² 黄丽丽^{1*}

(1. 西北农林科技大学植物保护学院 陕西 杨凌 712100)

(2. 西北农林科技大学理学院 陕西 杨凌 712100)

摘要:【目的】分离纯化苹果树腐烂病菌的果胶酶,明确其酶学性质。【方法】利用 0.5%淀粉 MS 培养基对苹果树腐烂病菌分别进行不同天数发酵, DNS 法定量测定果胶酶活性。通过硫酸铵梯度盐析、Sephacryl S-100 凝胶过滤层析和阴离子交换层析 DEAE-Sephacryl Fast Flow 分离纯化果胶酶,经 SDS-PAGE 检测样品纯度,并利用生物化学技术分析其酶学性质。【结果】发酵 10 d 的发酵液中果胶酶活性最高;分离得到的果胶酶为鼠李糖半乳糖醛酸酶,分子量为 58.83 kD,等电点为 6.03,最适反应温度为 40 °C,最适反应 pH 为 3.5,在 pH 2.0–5.5 之间酶活性比较稳定。 Ca^{2+} 、 Li^{+} 、 Co^{2+} 对酶活力有激活作用, K^{+} 、 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{+} 对酶活有抑制作用, Ba^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活性有钝化作用。酶动力学常数 K_m 和 V_m 值分别是 3.600 g/L 和 0.162 7 g/(L·min)。【结论】从苹果树腐烂病菌的发酵液中分离得到鼠李糖半乳糖醛酸酶并明确了其酶学性质,为果胶酶抗体的制备和细胞化学研究奠定基础。

关键词: 苹果树腐烂病菌, 果胶酶, 分离纯化, 酶学性质

Isolation, purification and characterization of extracellular pectinase produced by *Valsa mali*FENG Hao¹ HE Yuan-Yuan² ZHEN Wei² GAO Xiao-Ning¹ WANG Hui² HUANG Li-Li^{1*}

(1. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2. College of Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this study was to separate and purify the pectinase of *Valsa mali*, and explore the corresponding enzymatic properties. [Methods] *V. mali* was cultured in MS medium containing 0.5% starch, and maintained for different days. The pectinase was extracted using ammonium sulphate gradient fractionation and purified by Sephacryl S-100 gel filtration and DEAE-Sephacryl Fast Flow ion exchange chromatography. The purity was examined by SDS-PAGE. The properties of rhamnose galacturonic acid enzyme were studied using biochemical techniques. [Results] The result showed that the activity of the pectinase was highest after 10 days' fermentation.

Foundation item: Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20120204110002)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-29-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

Received: March 23, 2016; Accepted: April 26, 2016; Published online (www.cnki.net): June 06, 2016

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目(No. 20120204110002)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-29-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2016-03-23; 接受日期: 2016-04-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-06

The pectinase was identified to be rhamnose galacturonic acid enzyme. The properties including the molecular mass, the isoelectric point, the optimal temperature and pH were 58.83 kD, 6.03, 40 °C and 3.5, respectively. The rhamnose galacturonic acid enzyme was stable when its pH varied from 2.0 to 5.5. Ca^{2+} , Li^{+} , Co^{2+} could active the rhamnose galacturonic acid enzyme, while the metal ions of K^{+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{+} could inhibit it, especially Ba^{2+} and Mg^{2+} . Besides, the kinetic constants was also detected, and the K_m and V_m values were 3.600 g/L and 0.162 7 g/(L·min), respectively. **[Conclusion]** The rhamnose galacturonic acid enzyme was isolated from the fermentation liquor of *V. mali*, and enzymatic properties were explored. The results will lay the foundation for the preparation of antibody to pectinase and studies of cytochemistry.

Keywords: *Valsa mali*, Pectinase, Separation and purification, Enzymatic property

由黑腐皮壳属真菌(*Valsa mali*)引起的苹果树腐烂病是严重危害我国苹果产区的重要病害之一。由于对苹果树腐烂病菌的致病机理了解甚少,导致生产上防控该病害盲目、低效。探究苹果树腐烂病菌的致病机理对制定有效的病害防控策略具有重要意义。

有许多研究表明果胶酶是病原真菌的一个重要致病因子。早在 1966 年, Bateman 和 Millar^[1]发现了果胶酶在植物细胞壁降解中的作用。Gairola 等^[2]发现果胶酶在桃树腐烂病菌(*Cytospora*)降解寄主细胞壁的过程中起关键作用。在黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和灰霉菌(*Botrytis cinerea*)中,同样证实了多聚半乳糖醛酸内切酶为病菌的致病因子^[3-4]。在炭疽菌(*Colletotrichum magna*)的致病力缺失突变体研究中,果胶裂解酶基因的缺失能够导致病原菌的致病力缺失^[5]。此外,研究者们还发现 *Didymella bryonia* 等病原真菌能够产生果胶酶,且在病菌侵染过程中对寄主组织的降解起重要作用^[6-7]。

同样,果胶酶在苹果树腐烂病菌致病过程中的作用也逐渐被人们发现。20 世纪 80 年代,刘福昌等^[8]对苹果树腐烂病病原菌致病因素进行了探讨,认为病原菌产生的果胶酶在其致病过程中起着重要作用。此外,研究发现在苹果树腐烂病菌的发酵液中检测到高活性的果胶酶^[9-10]。Ke 等^[11]利用电子显微镜以及免疫胶体金细胞化学标记技术发现,在腐烂病菌侵染树皮过程中有大量的果胶酶产生,而其他细胞壁降解酶类没有明显的积累。转录组分析发现苹果树腐烂病菌在侵染过

程中,果胶酶等大量水解酶基因显著上调表达^[12]。

通过测定不同致病力的苹果树腐烂病菌突变体的胞外果胶酶活性,发现其与病菌致病力呈正相关^[13]。以上结果从不同层面证实了果胶酶是苹果树腐烂病菌的致病关键因子。

本研究拟通过分离、纯化苹果树腐烂病菌发酵液中的果胶酶并开展酶学性质研究,以确证苹果树腐烂病菌的果胶酶类型,为以后果胶酶抗体的制备和组织细胞化学研究奠定基础,进而为揭示苹果树腐烂病菌的致病机理和防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及培养基: 供试菌种为苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)野生型菌株 03-8,由西北农林科技大学植物病害综合治理实验室提供,4 °C 保存,在 PDA 培养基(200 g 马铃薯洗净去皮切碎,加水 1 L 煮沸 30 min,八层纱布过滤,加入葡萄糖 20 g,琼脂粉 15 g)上活化后使用。发酵培养基为 0.5%淀粉 MS 液体培养基,配方为每 1 000 mL 培养基含可溶性淀粉 5.00 g, L-天门冬酰胺 2.00 g, KH_2PO_4 1.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.88 g, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.50 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.44 mg, 生物素(VH) 5.00 μg , VB1 0.10 mg。

1.1.2 主要试剂和仪器: 钨红、叠氮化钠、果胶购自美国 Sigma-Aldrich 公司;考马斯亮蓝 G-250、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自西安沃尔森生物技术有限公司。

AKTA 蛋白层析系统、蛋白层析柱购自美国

GE Healthcare 公司; 冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司; Mini protein 蛋白电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司; 紫外分光光度计购自上海尤尼柯仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的制备: 将苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8 接种于 PDA 平板培养基, 25 °C 培养 3 d, 于菌落边缘的幼嫩菌丝打菌饼(6 mm), 将菌饼接种于配好的 0.5% 淀粉 MS 液体培养基, 每 250 mL 培养基放置 10 个菌饼, 接种后将三角瓶置于 25 °C 恒温分别静置培养 5、10、15 d, 每天定时摇动两次。将培养好的菌液 10 000 r/min 离心 10 min, 弃掉菌体得粗酶液。

1.2.2 粗酶液果胶酶定量测定方法: (1) D-半乳糖醛酸标准曲线的制作。果胶酶的定量测定采用 DNS 法^[14]。配制 2 g/L 的 D-半乳糖醛酸标准溶液 100 mL, 分别取标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中, 用蒸馏水补足到 1 mL, 分别加入 0.5 mL pH 4.8 的柠檬酸缓冲液和 3.0 mL DNS 试剂, 沸水浴中反应 5 min, 用流动水冷却至室温, 用蒸馏水定容到 10 mL。以 D-半乳糖醛酸含量为 0 的试管为对照, 测定各处理在 540 nm 波长下的吸光值 A 。以吸光值为纵坐标, D-半乳糖醛酸毫克数为横坐标, 绘制标准曲线。(2) 粗酶液果胶酶活性定量检测。取 1 mL 粗酶液于试管中, 在 50 °C 水浴中平衡 5 min, 加入预平衡至 50 °C 的果胶底物 0.5 mL, 50 °C 恒温浴 30 min, 加入 3.0 mL DNS 终止反应后, 沸水浴 5 min, 用流动水冷却至室温, 最后加蒸馏水定容到 10 mL。以煮沸 10 min 灭活的粗酶液为对照在 540 nm 处测吸光值。酶活力单位(U): 1 mL 酶在 50 °C、pH 4.8 的条件下, 1 h 分解果胶产生 1 mg D-半乳糖醛酸为一个酶活力单位。

1.2.3 果胶酶活性定性测定: 果胶酶活性定性测定方法采用钨红染色法^[15]。取 0.1 g 果胶溶于 100 mL pH 5.0、50 mmol/L 醋酸钠缓冲液, 称取 2 g 琼脂糖加入到果胶溶液中加热至琼脂糖溶解,

然后降温至 60 °C, 再补加叠氮化钠使其终浓度为 2.5 mmol/L, 将配好的液体直接倒入培养皿中, 每个皿 50 mL。培养皿冷却之后打 2 mm 直径的小孔, 然后取 20 μ L 粗酶液于小孔中, 取 20 μ L 适当稀释的 Sigma 果胶酶作阳性对照, 在 25 °C 培养 16 h, 用 0.05% 钨红染液染色 45 min, 然后用蒸馏水简单冲洗凝胶。

1.2.4 粗酶粉的制备: 将发酵 10 d 的苹果树腐烂病菌 03-8 发酵液抽滤, 硫酸铵分级沉淀, 根据果胶酶活性确定最佳硫酸铵饱和度, 透析除盐, 冷冻干燥, 即得粗酶粉^[16]。

1.2.5 果胶酶的纯化: Sephacryl S-100 凝胶过滤层析: 将粗酶粉用 3 mL pH 5.0、50 mmol/L 醋酸钠缓冲液溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤, 样品预处理后过 Sephacryl S-100 (Φ 1.6 cm \times 60 cm) 柱, 洗脱液为 pH 5.0、50 mmol/L 醋酸钠缓冲液, 先用洗脱液平衡 Sephacryl S-100 (Φ 1.6 cm \times 60 cm) 柱子至基线平衡, 上样, 洗脱, 流速为 1.5 mL/min, 分管收集洗脱液, 每管 1.5 mL, 用钨红染色法逐管检测是否有果胶酶活性。将有果胶酶活性的样品合并, 过 DEAE-Sepharose Fast Flow (1 mL) 阴离子交换柱。A 液: pH 5.0、50 mmol/L 醋酸钠缓冲液; B 液: 1 mol/L NaCl 的 pH 5.0、50 mmol/L 醋酸钠缓冲液。先用 A 液平衡柱子, 然后 B 液从 0–100% 进行梯度洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 分管收集洗脱液, 每管 1 mL, 用钨红染色法逐管检测酶活性。将有活性的样管用 SDS-PAGE 电泳进行检测, 条带相同的样管进行浓缩合并后备用。同时取有果胶酶活性的样品进行 SDS-PAGE 电泳, 切下条带通过 LC-ESI-MS/MS 技术进行肽段氨基酸序列的测定。

1.2.6 果胶酶性质研究: (1) 蛋白质分子量的测定。采用 SDS-PAGE 电泳法来测定蛋白质亚基的分子量, 详细方法参考 Laemmli 等^[17], 采用 5% 和 12.5% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶分别为浓缩胶和分离胶。考马斯亮蓝染色, 根据蛋白 Marker 和条带迁移率计算分子量。(2) 酶的最适温度。100 μ L 酶液与 50 μ L 0.5% 的果胶溶液(用 pH 5.0、50 mmol/L 的醋酸钠缓冲液溶解), 分别在 20、30、35、40、

45、50、55、60、70、80 °C 反应 30 min, 用 DNS 法测定酶活力, 确定酶的最适反应温度。(3) 酶的最适 pH。用不同 pH 值(2.0、2.4、3.0、3.5、4.0、4.4、5.0、6.0、6.5、7.0、7.6、8.0) 的 50 mmol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制 0.5% 的果胶溶液。100 μ L 酶液与 50 μ L 不同 pH 的 0.5% 果胶溶液在 50 °C 反应 30 min, 用 DNS 法测定酶活, 确定酶的最适反应 pH。(4) 酶的热稳定性。100 μ L 酶液与 50 μ L 0.5% 果胶溶液(用 pH 5.0、50 mmol/L 的醋酸钠缓冲液溶解)分别在 30、40、50、60、70 °C 水浴中反应, 每隔 10 min 测一次酶活, 比较相对酶活力, 以 0 min 为对照, 确定酶的热稳定性。(5) 酶的 pH 稳定性。用不同 pH 的缓冲溶液溶解果胶和果胶酶, 4 °C 过夜, 分别调 pH 至 4.8 后用 DNS 法测酶活, 比较相对酶活力, 确定酶的 pH 稳定性。(6) 金属离子对酶活力的影响。分别取 20 μ L 50 mmol/L 的 AgNO_3 、 KCl 、 $\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 LiCl 、 $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 盐溶液加入 50 μ L 0.5% 果胶溶液(用 pH 5.0、50 mmol/L 的醋酸钠缓冲液溶解)中, 各加入 100 μ L 酶液于 50 °C 反应 30 min, 用 DNS 法测定酶活力, 以双蒸水作对照, 确定这些金属离子对果胶酶活性的影响。(7) 酶的动力学常数 V_m 及 K_m 。分别取 50 μ L 浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L 的果胶(用 pH 5.0、50 mmol/L 的醋酸钠缓冲液溶解)与 100 μ L 酶液 50 °C 反应 30 min, 用 DNS 法测定酶活力, 用 Lineweaver-Burk 作图法求酶动力常数 V_m 及 K_m 。

2 结果与分析

2.1 不同发酵天数的粗酶液中果胶酶活性的定量及定性检测

发酵液果胶酶活性用 DNS 法进行定量测定, D-半乳糖醛酸的标准曲线见图 1。通过测定, 发现苹果树腐烂病菌在 0.5% 淀粉 MS 培养基中发酵 10 d 后果胶酶活性最高(图 2), 以后的研究均采用此条件。

为了进一步检测该活性的特异性, 用钉红染

色法对该粗酶液果胶酶进行了定性检测。由图 3 可以看出, 缓冲液(图 3 中 3)和酸碱(图 3 中 2 和 6)都没有显色圈, 甲基化(图 3 中 5)也不能产生显色圈, 只有 Sigma 果胶酶对照(图 3 中 1)和粗酶液具有明显的显色圈, 表明该方法作为检测果胶酶的存在十分有效, 同时也表明粗酶液中含有果胶酶。

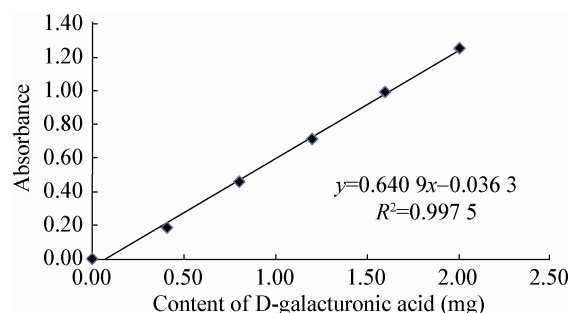


图 1 D-半乳糖醛酸标准曲线

Figure 1 Standard curve of D-galacturonic acid

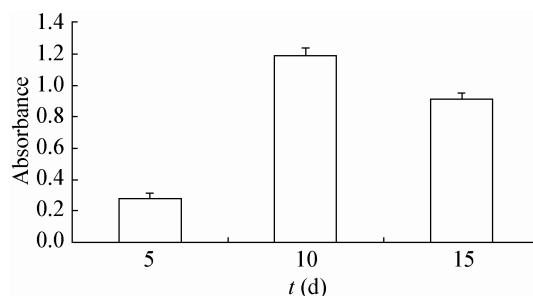


图 2 果胶酶活性随发酵时间的变化

Figure 2 The variety of the pectinase activity at different fermentation time

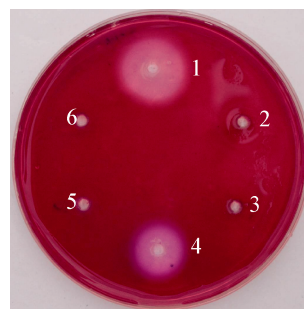


图 3 果胶琼脂糖凝胶钉红染色结果

Figure 3 Staining of agarose gel containing pectin using RR

注: 1: 20 μ L Sigma 果胶酶; 2: 20 μ L 1 mol/L 氢氧化钠; 3: 20 μ L pH 5.0 50 mmol/L 醋酸钠缓冲液; 4: 粗酶液; 5: 20 μ L 甲醇; 6: 20 μ L 1 mol/L HCl。

Note: 1: 20 μ L Sigma pectinase; 2: 20 μ L 1 mol/L sodium hydroxide; 3: 20 μ L pH 5.0 50 mmol/L sodium acetate buffer; 4: Crude enzyme solution; 5: 20 μ L of methanol; 6: 20 μ L 1 mol/L HCl.

2.2 硫酸铵分级沉淀

发酵液过滤后用不同饱和度的硫酸铵进行梯度盐析。结果见表 1，当硫酸铵饱和度低于 40%时没有沉淀析出；当硫酸铵饱和度达到 70%时，析出大量沉淀，沉淀溶解之后检测到较强的果胶酶活性；上清中继续加硫酸铵至饱和度为 90%，此时仍有沉淀析出，但是沉淀中果胶酶的比活较低，可能大部分是一些杂蛋白，因此选择硫酸铵饱和度为 70%的沉淀作为目的蛋白。

2.3 果胶酶的分离纯化

粗酶粉经缓冲液稀释后过分子筛柱 Sephacryl S-100 后，每管测果胶酶活(图 4)，结果表明 2-S 和 1-S 两个峰对应的酶液均有酶活，但 2-S 峰的果胶

酶活性整体高于 1-S 峰中果胶酶活性。由于果胶酶是一种复合酶，说明 1-S 和 2-S 可能是两种不同的果胶酶。

将 1-S 和 2-S 对应的粗酶液分别过阴离子交换柱 DEAE-Sepharose Fast Flow (图 5)。进行果胶酶活性检测，将有果胶酶活性的样品进行 SDS-PAGE 电泳(图 6)，1-S 由于蛋白种类太多没有得到有效分离，由 2-S 分离得到的果胶酶已达到电泳纯。肽段序列测定发现该氨基酸序列为 MTAGTGGGNLFIEHTTDFEFYSANSK 和 GGNKGGLDGIDIWGTNIWVHDVEVTNK，通过 NCBI 数据库比对可知该酶为鼠李糖半乳糖醛酸酶，等电点为 6.03。

| 表 1 硫酸铵分段盐析结果 | | | |
|---|------------------------|--------------------|--------------------------|
| Table 1 The result of salting out by ammonium sulfate | | | |
| 硫酸铵饱和度 | 酶活力 | 蛋白总量 | 比活 |
| Saturability of ammonium sulfate | Enzyme activity (U/mL) | Total protein (mg) | Specific activity (U/mg) |
| 粗酶液 Crude Enzyme | 46.06 | 2.56 | 17.99 |
| 0-40% | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 40%-70% | 36.53 | 1.06 | 34.46 |
| 70%-100% | 6.24 | 0.82 | 7.61 |

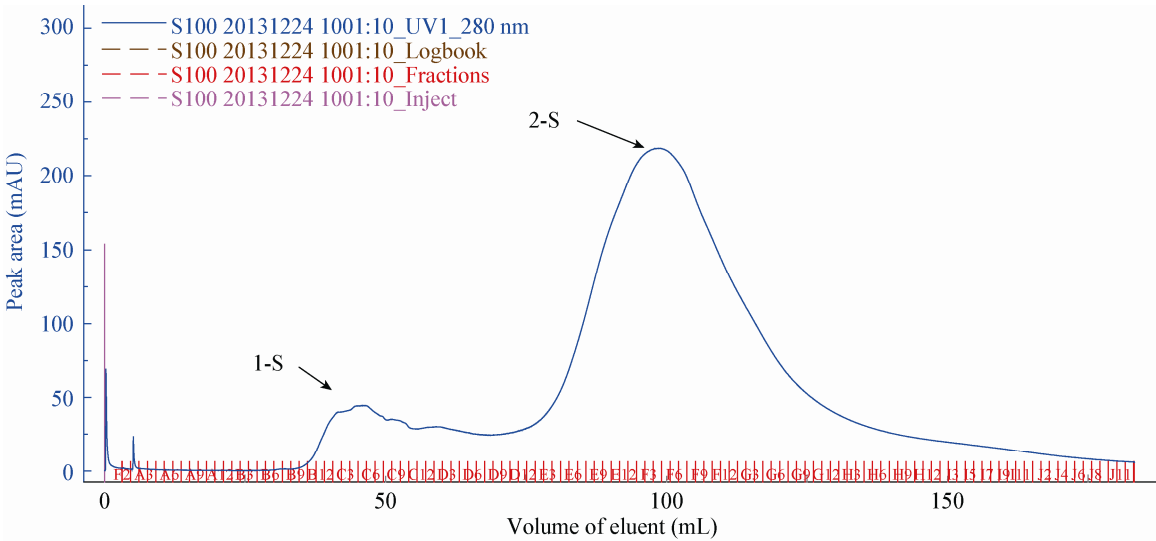


图 4 粗酶液经过 Sephacryl S-100 洗脱图谱
Figure 4 Elution profile of coarse enzyme on Sephacryl S-100

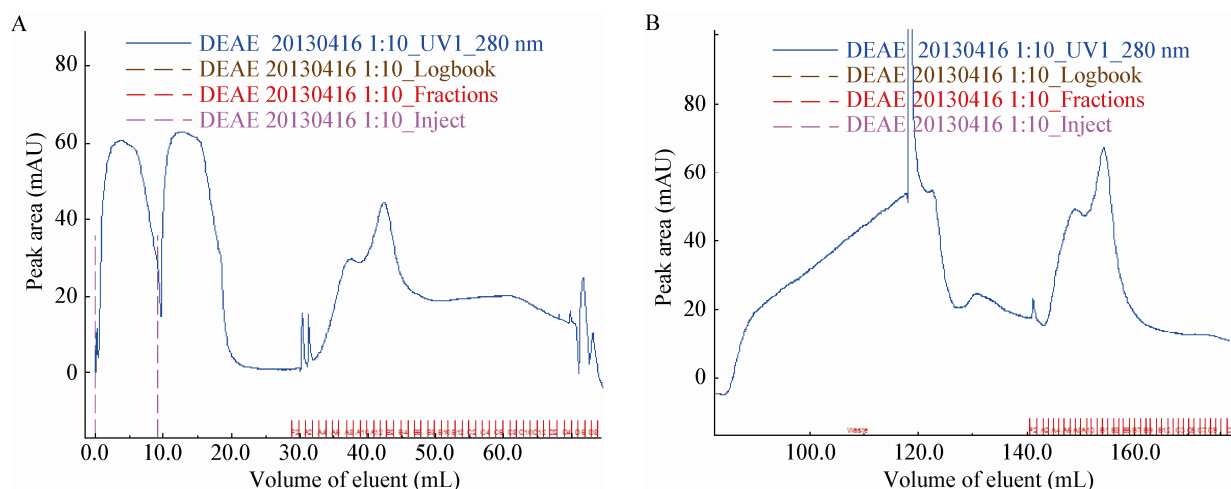


图 5 1-S (A)和 2-S (B)分别经过阴离子交换柱 DEAE-Sepharose Fast Flow 洗脱图谱

Figure 5 Elution profile of 1-S (A) and 2-S (B) on DEAE-Sepharose Fast Flow

2.4 果胶酶的酶学性质

2.4.1 分子量：SDS-PAGE 电泳后根据标准蛋白的标准曲线方程计算出鼠李糖半乳糖醛酸酶的分子量为 58.83 kD (图 6)。

2.4.2 最适反应温度：利用 DNS 法对鼠李糖半乳糖醛酸酶进行最适反应温度测定，发现其最适反应温度约为 40 °C；在 20 °C 和 30 °C 时，酶活性较

低，分别为最高酶活性的 21.06%和 35.89%；当温度达到 45 °C 时酶活性比较高，为最高酶活性的 90.45%；当温度超过 45 °C 时，果胶酶活性开始明显下降；在 80 °C 时，酶活性仅为最高酶活性的 17.97% (图 7)。

2.4.3 最适反应 pH 值：由图 8 可以看出，鼠李糖半乳糖醛酸酶的最适反应 pH 为 3.5 左右；pH 范围在 2.0–4.0 时，果胶酶的相对酶活力能保持在最高酶活力的 80%以上；当 pH 高于 5.5 时，相对酶活力下降，低于 50%。

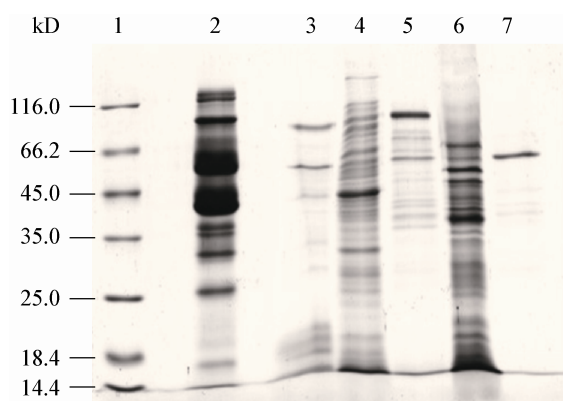


图 6 SDS-PAGE 电泳图

Figure 6 Electrophoresis of SDS-PAGE

注：1：Marker；2：Sigma 果胶酶；3：粗蛋白；4：1-S-1；5：1-S-2；6：2-S-1；7：2-S-2。

Note: 1: Marker; 2: Sigma pectinase; 3: Crude protein; 4: 1-S-1; 5: 1-S-2; 6: 2-S-1; 7: 2-S-2.

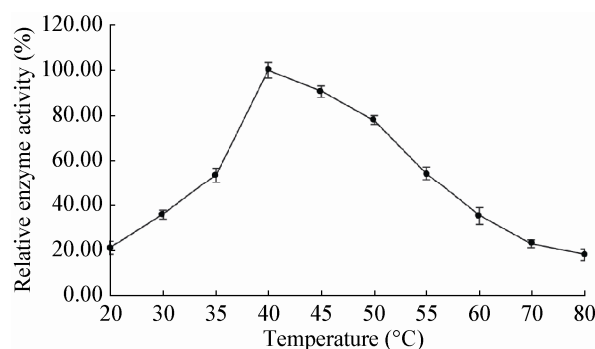


图 7 鼠李糖半乳糖醛酸酶最适反应温度

Figure 7 Effect of temperature on the activity of rhamnose galacturonic acid enzymes

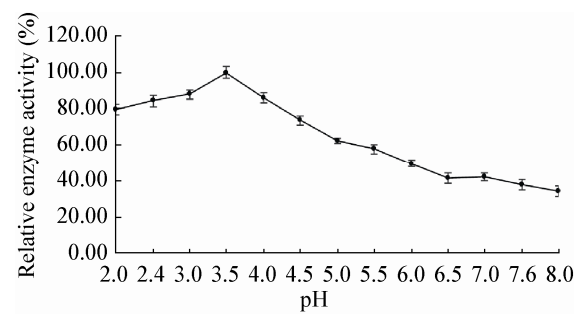


图 8 鼠李糖半乳糖醛酸酶最适催化 pH
Figure 8 Effect of pH on the activity of rhamnose galacturonic acid enzymes

2.4.4 果胶酶的稳定性: (1) 热稳定性。由图 9 可以看出, 鼠李糖半乳糖醛酸酶在 30 °C 时酶活力较为稳定, 保温 1 h 后仍能保持 80% 以上的酶活力; 在 40 °C, 40 min 以内时仍能保持 80% 以上的酶活力, 40 min 以上时酶活力急剧下降 温度高于 50 °C 时酶活力迅速下降; 60 °C 和 70 °C 保温 10 min 时酶活力仅为 22.0% 和 16.8%。(2) pH 稳定性。鼠李糖半乳糖醛酸酶在 pH 2.0–5.5 之间的果胶酶活性比较稳定, 能保持 50% 以上的酶活力; 在 pH 7.0–8.0 之间检测不到果胶酶活性, 见图 10。(3) 金属离子的稳定性。金属离子对鼠李糖半乳糖醛酸酶活性的影响见表 2。由表 2 可以看出, Ca^{2+} 对酶活力有强烈的激活作用, Li^+ 、 Co^{2+} 对酶活有轻微的激活作用, K^+ 对酶活有轻微的抑制作用, Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^+ 对酶活有较强的抑制作用, Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 加入之后检测不到果胶酶活性。

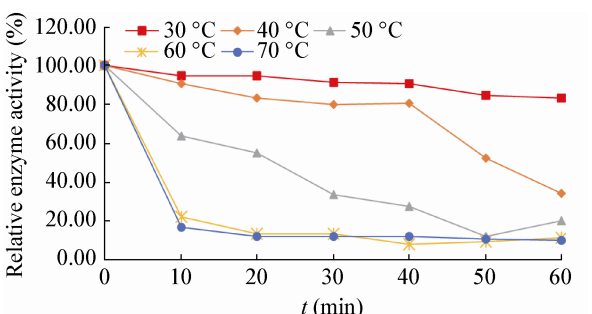


图 9 鼠李糖半乳糖醛酸酶热稳定性
Figure 9 Thermal stability of rhamnose galacturonic acid enzymes

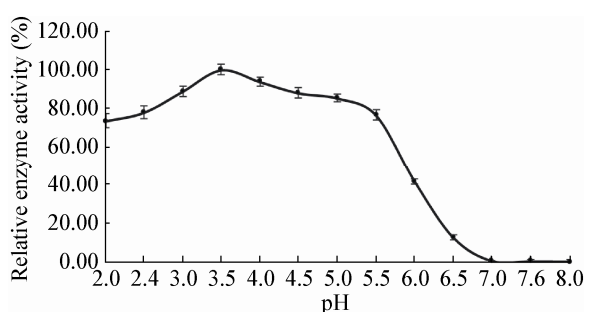


图 10 鼠李糖半乳糖醛酸酶 pH 稳定性
Figure 10 pH stability of rhamnose galacturonic acid enzymes

2.4.5 酶促反应动力学研究: 用定量的果胶酶鼠李糖半乳糖醛酸酶与不同浓度的底物(果胶)反应, 测得不同底物浓度条件下的反应速度。根据 Lineweaver-Burk 法可得 $y=23.095x+6.415$ 3, 求出: $K_m=23.095/6.415$ 3=3.600 g/L, $V_m=1/6.415$ 3=0.162 7 g/(L·min)。

| 表 2 金属离子对鼠李糖半乳糖醛酸酶酶活力的影响 Table 2 The effect of metal ion on rhamnose galacturonic acid enzyme activity | | | |
|---|---------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| 金属离子 Metal ions | 相对酶活力 Relative enzyme activity (%) | 金属离子 Metal ions | 相对酶活力 Relative enzyme activity (%) |
| Control | 100.0 | Control | 100.0 |
| K ⁺ | 86.2 | Cu ²⁺ | 24.0 |
| Ca ²⁺ | 231.1 | Li ⁺ | 133.9 |
| Mg ²⁺ | 0.0 | Ba ²⁺ | 0.0 |
| Fe ²⁺ | 65.0 | Mn ²⁺ | 70.9 |
| Pb ²⁺ | 51.6 | Ni ⁺ | 41.1 |
| Zn ²⁺ | 36.2 | Co ²⁺ | 107.4 |

3 结论

苹果树腐烂病菌的侵染致病过程是一个相当复杂的互作过程。目前,已有很多研究表明果胶酶可能是苹果树腐烂病致病过程中的一个重要致病因子。

本实验通过测定发酵液果胶酶活性确定了最适发酵时间,并通过对发酵液进行硫酸铵盐析、透析、冷冻干燥、Sephacryl S-100, DEAE-Sephacryl Fast Flow 柱层析等过程从苹果树腐烂病菌发酵液中分离得到了鼠李半乳糖醛酸酶,等电点为6.03。与SDS-PAGE中标准蛋白的相对迁移率(R_f)比较,得到其亚基分子量为58.83 kD。经测定,该果胶酶最适反应温度为45 °C,最适pH为3.5。Normand等^[18]通过毕氏酵母真核表达分离到了担子菌中存在的一种鼠李聚半乳糖醛酸酶,它的分子量为56 kD,最适反应温度为40–50 °C,最适pH为4.5–5.0之间。二者的研究数据基本一致。同时,本研究还对分离到的酶的酸稳定性和热稳定性进行了研究,发现该酶在pH 2.2–5.5之间酶活性基本稳定,在40 °C以下比较稳定,这些数据目前尚未见报道。此外,本实验还发现,Ca²⁺对鼠李半乳糖醛酸酶活力有强烈的激活作用, Li⁺和 Co²⁺离子对酶活也有一定的激活作用,而 K⁺、Fe²⁺、Pb²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Ni⁺对该酶活有抑制作用,特别是 Ba²⁺和 Mg²⁺离子完全能抑制该酶的活性。由此可以推测,如果在苹果树腐烂病防治过程中能考虑到 Ba²⁺和 Mg²⁺离子或者 K⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺等离子的应用,也许可以增强树木对病菌侵染的抵抗能力。这一结果对苹果树腐烂病的防治具有重要的指导意义。

本实验在分离过程中分析有两个果胶酶区段(1-S和2-S),但由于1-S中蛋白种类较多,各组分含量较少,未能分离纯化出来。实际上,在苹果树腐烂病菌的致病过程中,起致病作用的成分也许是能够分解果胶物质的果胶复合酶。许多研究也表明不同微生物产生的果胶酶都不是单一组分,通常为一种或几种复合酶^[19]。因此要研究清楚苹果树腐烂病

菌的致病机理,还需要进一步分离纯化其他果胶酶。

参考文献

- [1] Bateman DF, Millar RL. Pectic enzymes in tissue degradation[J]. Annual Review of Phytopathology, 1966, 4: 119-146
- [2] Gairola C, Powell D. Extracellular enzymes and pathogenesis by peach *Cytosporas*[J]. Journal of Phytopathology, 1971, 72(4): 305-314
- [3] Shieh MT, Brown RL, Whitehead MP, et al. Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(9): 3548-3552
- [4] ten Have A, Mulder W, Visser J, et al. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11(10): 1009-1016
- [5] Wattad C, Freeman S, Dinooor A, et al. A nonpathogenic mutant of *Colletotrichum magna* is deficient in extracellular secretion of pectate lyase[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995, 8(4): 621-626
- [6] Reignault P, Kunz C, Delage N, et al. Host-and symptom-specific pectinase isozymes produced by *Botrytis cinerea*[J]. Mycological Research, 2000, 104(4): 421-428
- [7] Zhang JX, Bruton BD, Miller ME, et al. Relationship of developmental stage of cantaloupe fruit to black rot susceptibility and enzyme production by *Didymella bryoniae*[J]. Plant Disease, 1999, 83(11): 1025-1032
- [8] Liu FC, Li MN, Wang YQ. Pathogenic factor of apple valsa canker pathogen: preliminary discussion of pectinase[J]. China Fruits, 1980(4): 45-48 (in Chinese)
刘福昌, 李美娜, 王永淦. 苹果树腐烂病菌的致病因素: 果胶酶的初步探讨[J]. 中国果树, 1980(4): 45-48
- [9] Zang R. Studies on biological characters and pathogenicity of different isolates of *Cytospora* isolated from apple tree[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2006 (in Chinese)
臧睿. 陕西苹果树腐烂病菌不同分离株生物学特性及致病性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2006
- [10] Wang J, Ma Q, Zhuang X, et al. Determination of pectinase in fungi secretion of apple tree canker[J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2009(4): 39-40 (in Chinese)
王娟, 马强, 庄霞, 等. 苹果树腐烂病原菌分泌物中果胶酶的测定[J]. 内蒙古农业科技, 2009(4): 39-40
- [11] Ke XW, Huang LL, Han QM, et al. Histological and cytological investigations of the infection and colonization of apple bark by *Valsa mali* var. *mali*[J]. Australasian Plant Pathology, 2013, 42(1): 85-93
- [12] Ke XW, Yin ZY, Song N, et al. Transcriptome profiling to identify genes involved in pathogenicity of *Valsa mali* on apple tree[J]. Fungal Genetics and Biology, 2014, 68: 31-38
- [13] He YY. Isolation, purification and properties of extracellular pectinase produced by *Valsa mali*[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2012 (in Chinese)
何媛媛. 苹果树腐烂病菌胞外果胶酶的分离纯化及其性质研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2012
- [14] Wang XM, Wu WL, Lü LF, et al. Study on the spectrophotometric analysis of pectinase activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(5): 227-229 (in Chinese)
王小敏, 吴文龙, 阎连飞, 等. 分光光度计法测定果胶酶活

- 力的方法研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(5): 227-229
- [15] Cruickshank RH, Wade GC. Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gels[J]. Analytical Biochemistry, 1980, 107(1): 177-181
- [16] Huang BQ, Huang LL, Kang ZS, et al. Purification and characterization of an extracellular antifungal protein from wheat endophytic *Bacillus subtilis* strain E1R-j[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2009, 18(6): 285-290 (in Chinese)
- 黄保全, 黄丽丽, 康振生, 等. 小麦内生枯草芽孢杆菌 E1R-j 胞外抗菌蛋白的分离纯化和性质[J]. 西北农业学报, 2009, 18(6): 285-290
- [17] Laemmli UK, Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4: I. DNA packaging events[J]. Journal of Molecular Biology, 1973, 80(4): 575-599
- [18] Normand J, Bonnin E, Delavault P. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of an *Irpex lacteus* rhamnogalacturonan hydrolase tolerant to acetylated rhamnogalacturonan[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(6): 1543-1552
- [19] Zhang HX. Studies on the pectinase of *Aspergillus tamari* 827[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Sciences, 1992
- 张洪勋. 溜曲霉 827 果胶酶研究[D]. 北京: 中国科学院博士学位论文, 1992

2017 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

| 序号 | 会议名称 | 主办/协办单位 | 时间 | 人数 | 地点 | 联系方式 |
|----|--|---|---------|-----|------|---|
| 20 | 第三届中国临床微生物学医院感染学术会议 | 中国微生物学会临床微生物学专业委员会 | 9 月 | 50 | 待定 | 马晓莹 |
| 21 | 2017 年中国微生物学会酿造分会学术年会 | 中国微生物学会酿造分会 | 10 月 | 200 | 青岛 | 鲁菲 高洁 |
| 22 | 第 13 届全国海洋药物年会 | 中国微生物学会海洋微生物学专业委员会 | 10 月 | 300 | 青岛 | 于广利 |
| 23 | 2017 国际化学生物学会议 | 中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会 | 10 月 | 500 | 上海 | 谭高翼 |
| 24 | 2017 年中国微生物学会学术年会 | 中国微生物学会 | 10 月中下旬 | 800 | 待定 | 杨海花 王旭 010-64807200 |
| 25 | 第三届放线菌生物学与产业化暨首届微生物药物学术研讨会 | 中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会 | 10 月下旬 | 100 | 湖南长沙 | 夏立秋 |
| 26 | 第十届全国青年微生物学工作者学术讨论会 | 中国微生物学会普通微生物学专业委员会 | 10 月 | 200 | 湖南长沙 | 王琳淇 胡胜标 胡玮 |
| 27 | 首届微生物前沿交叉创新论坛 | 中国微生物学会普通微生物学专业委员会、环境微生物学专业委员会和分子微生物学及生物工程专业委员会联合主办 | 10 月 | 50 | 湖南长沙 | 李越中 覃重军 周宁一 |
| 28 | 第二届全国昆虫肠道微生物与环境治理学术研讨会暨第五届全国食用昆虫与微生物转化废弃物及产业化研讨会 | 中国微生物学会农业微生物学专业委员会 | 10 月 | 200 | 湖北武汉 | 郑龙玉 罗勤 ly.zheng@mail. hzau.edu.cn |
| 29 | 类鼻疽病的实验室诊断与临床诊治 | 中国微生物学会临床微生物学专业委员会 | 11 月 | 50 | 海南三亚 | 陈海 |
| 30 | 幽门螺杆菌快速分离培养、鉴定、药敏试验新技术培训班 | 中国微生物学会临床微生物学专业委员会 | 11 月 | 50 | 浙江宁波 | 吕宝霞 |
| 31 | 第九届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行与服务研讨会 | 中国微生物学会微生物资源专业委员会 | 11 月 | 400 | 江苏南京 | 阮志勇 010-8210863 李 盼 010-82105075 |
| 32 | 人体微生物组学与健康 | 中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会 | 待定 | 50 | 上海 | 郭晓奎、秦金红 |
| 33 | 全国医学微生物学高峰论坛 | 中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会 | 待定 | 200 | 上海 | 郭晓奎、秦金红 |
| 34 | 第二十次全国环境微生物学学术研讨会 | 中国微生物学会环境微生物学专业委员会 | 11 月 | 600 | 浙江杭州 | 钟卫鸿 |
| 36 | 2017 中国生物制品年会 | 中国微生物学会生物制品专业委员会 | 11 月 | 800 | 四川成都 | 毛群颖 |
| 37 | 第十二届全国芽孢杆菌青年工作者学术研讨会 | 中国微生物学会农业微生物学专业委员会 | 12 月 | 200 | 江苏南京 | 高学文 025-84395268 |