

黄原胶寡糖生物活性的研究

何晓燕² 张利英² 白雪芳¹ 杜昱光¹ 李宪臻^{1, 2 *}

(中国科学院大连化学物理研究所生物工程学部 大连 116023)¹

(大连轻工业学院生物与食品工程系 大连 116034)²

摘要: 利用黄原胶降解菌 *Cellulomonas* sp. XT11 生产的黄原胶降解酶, 对黄原胶进行生物降解, 生产具有不同粘度/还原末端比的黄原胶寡糖, 并研究了黄原胶寡糖在清除羟基自由基、植物防卫反应中激活因子活性和对植物病原菌抑制能力等方面的生物活性, 结果表明黄原胶寡糖具有清除羟基自由基能力, 并能激活植物防卫系统以抵御病原菌的侵染, 同时对野油菜黄单孢菌也具有抑菌活性。

关键词: 黄原胶寡糖, 黄原胶降解酶, 羟基自由基, 生物活性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0087-04

Bioactivity of Oligosaccharide Produced by Depolymerisation of Xanthan with Xanthan-degrading Enzyme

HE Xiao-Yan² ZHANG Li-Ying² BAI Xue-Fang¹ DU Yu-Guang¹ LI Xian-Zhen^{1, 2 *}

(Department of Bioengineering, Dalian Institute of Physical Chemistry, Dalian 116023)¹

(Department of Bio & Food Engineering, Dalian College of Light Industry, Dalian 116034)²

Abstract: The production of xanthan-degrading enzyme was induced when newly isolated *Cellulomonas* sp. XT11 grown in xanthan medium and inhibited by the addition of glucose. Oligosaccharides with different ratio of viscosity and reducing sugar were prepared by depolymerization of xanthan with xanthan-degrading enzyme. These oligosaccharides were tested for their ability of clearing hydroxyl radical *in vitro*, defence responses in plant and antimicrobial. The results indicated that the oligosaccharide with 222 of ratio between viscosity and reducing sugar showed the better bioactivity.

Key words: Xanth-oligosaccharide, Xanthan-degrading enzyme, Hydroxyl radical, Bioactivity

随着分子生物学、医学和细胞生物学的快速发展, 人们逐渐认识到糖类物质不仅是能量储存和结构物质的存在形式, 也与蛋白质和核酸一样可作为生物信息的载体。特别是寡糖, 它以糖蛋白和糖脂的形式广泛存在于细胞膜的表面, 在细胞正常或不正常的识别过程中都发挥着重要作用^[1]。自从 Ayer 等^[2]首次发现寡葡聚糖可诱导大豆产生植保素后, 人们便开始关注寡糖作为植物免疫激活因子的基础研究。由于寡糖安全无害, 能刺激植物的免疫系统产生防御反应, 合成具有抗病害的活性物质, 特别是不同来源的寡糖可针对不同的病原菌, 因此可开发出针对各类病害的系列寡糖农药, 解决基因工程遗传育种也很难解决的病菌生态变异小种的问题^[3]。目前已发现具有诱抗活性的寡糖包括寡聚葡萄糖、寡聚几丁质和寡聚脱乙酰壳多糖等^[4]。

在过去的 20 多年中, 有关功能性寡糖方面的研究多集中在海洋性寡糖, 如几丁质、褐藻胶和卡拉胶等制备的寡糖^[5]。黄原胶是由 *Xanthomonas campestris* 菌生产的一

* 通讯作者 Tel: 0411-86314195, E-mail: xianzhen@dlil.edu.cn

收稿日期: 2004-09-06, 修回日期: 2004-09-29

种胞外多聚阴离子多糖,它以纤维素链结构为碳骨架,每隔一个葡萄糖单位连接一个线性三糖链⁶。这种结构能使黄原胶形成高度稳定的(α -螺旋有序空间结构,因此大多数微生物都很难将其降解⁷,尽管某些纤维素酶能够部分降解处于无序构型时的黄原胶⁸。本文以黄原胶降解菌 *Cellulomonas* sp. XT11 为研究材料,通过对其胞外降解酶降解黄原胶为黄原胶寡糖的研究,检测了不同降解程度的黄原胶寡糖的生物学活性。

1 材料与方法

1.1 黄原胶降解酶的生产

按2%接种量接种黄原胶降解菌 *Cellulomonas* sp. XT11 于含有0.3%黄原胶的基础培养基中,28℃摇床培养(150 r/min)3d,离心(8,000 r/min)取上清液为黄原胶降解酶粗酶液。基础培养基的组成为:0.05%酵母浸粉和0.5%的5种无机盐溶液(5% CaCl_2 , 5% K_2HPO_4 , 8% NaCl , 2.5% MgSO_4 , 7% KNO_3) (pH 7.0)。

1.2 黄原胶降解酶活力测定

将0.5mL溶解于50mmol/L磷酸缓冲溶液(pH7.0)的0.5%黄原胶溶液和0.5mL黄原胶降解酶液混合后,40℃水浴保温40min,沸水浴加热5min终止反应,并测定反应液的粘度变化。酶活力单位定义为:在上述反应条件下,使黄原胶溶液每下降一个粘度单位所需要的酶量为一个酶活力单位。

粘度采用黄原胶溶液的自然沉降速度表示:取0.1mL的移液管吸取反应液至满刻度,记录反应液下降5个刻度所需要的时间(秒),并以时间“秒”为粘度计量单位。

1.3 黄原胶寡糖的制备

将0.3%的黄原胶溶液和黄原胶降解酶液按9:1的比例混合后,于40℃水浴中振荡保温,每隔一定时间取出30mL反应液,沸水浴中加热10min终止反应后,作为黄原胶寡糖样品,并分别测定其粘度和还原糖浓度(3,5-二硝基水杨酸法⁹)。

1.4 黄原胶寡糖的生物活性测定

1.4.1 体外清除羟基自由基活性分析:在反应体系中加入0.5mL 0.2mol/L磷酸缓冲液(pH7.5)、0.1mL 0.52mg/mL番红和0.5mL 2mmol/L的 $\text{EDTANa}_2\text{-Fe}^{2+}$,再加入0.5mL的黄原胶寡糖溶液,用水补足体积为4.9mL,最后加入0.1mL 1%的 H_2O_2 溶液,混匀后于40℃水浴保温30min,在波长520nm处测吸光度值 OD 。空白组以等体积的重蒸水代替寡糖溶液,对照组以等体积的重蒸水代替寡糖溶液和 $\text{EDTANa}_2\text{-Fe}^{2+}$ 溶液。实验结果以清除率 E 表示: $E = (OD_{\text{样品}} - OD_{\text{空白}}) \times 100 / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}})$ 。

1.4.2 苯丙氨酸解氨酶活性分析:将无菌水浸泡24h的大豆置于铺有滤纸的塑料筐内,并用湿纱布将滤纸与水源相连。在25℃,光照-黑暗(8h:16h)交替培养10d左右,直至大豆长出两片真叶,剪下该两片真叶并用无菌蒸馏水冲洗干净,再用滤纸吸干。无菌条件下,用刀片削出真叶下表皮厚约1mm,直径约6mm的伤口。去离子水中浸泡清洗30s后取出,用滤纸吸干水份,放在铺有滤纸的培养皿中,每个培养皿放约20mg真叶作为一个处理。分别取5 μL 寡糖液处理每片子叶伤口,并于室温放置6h后,置于含有0.1mL甘油、0.2mL L-半胱氨酸和0.5mL 0.2mol/L硼酸缓冲溶液的混合液中,冰浴上充分研磨,并振荡浸提5min,于10,000 r/min离心15min,取0.2mL上清液,与0.3mL 75mmol/L苯丙氨酸溶液混合,30℃水浴保温30min,于冰浴中停止反应,测定 OD_{290} 。苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活力单位定义为:上述反应条件下,在30min

内生成的肉桂酸使 OD_{290} 增加 0.01 个单位所需要的酶量为一个活力单位。

1.4.3 抑菌活性分析: 将野油菜黄单孢菌 (*Xanthomonas campestris*) 于 30 mL 液体培养基 (1.5% 葡萄糖, 0.3% 酵母膏, 0.2% KH_2PO_4 , 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 中 28℃ 摇床 (150 r/min) 培养 24h, 取培养液分别稀释 3、6 和 30 倍后, 用 300 μ L 均匀涂平板 (1% 蛋白胨, 0.3% 牛肉膏, 0.5% NaCl, 1.7% 琼脂), 待菌液吸收后用打孔器在每个平板上等距打 5 个直径为 3mm 的孔, 做好标记, 分别加入 15 μ L 的寡糖样品, 30℃ 培养 24h 后观察并测定抑菌圈的大小。

2 结果与讨论

2.1 黄原胶降解酶的生产

将 *Cellulomonas* sp. XT11 菌分别接种于含有 0.3% 黄原胶、0.3% 葡萄糖、0.3% 黄原胶并添加 0.1% ~ 0.3% 葡萄糖的基础培养基中, 在 28℃ 摇床中振荡培养 (150r/min), 定时取样, 测定发酵上清液中的黄原胶降解酶活性, 结果如图 1 所示。

XT11 菌在含有 0.3% 黄原胶的基础培养基中生长时能够分泌黄原胶降解酶, 而在含有 0.3% 葡萄糖的基础培养基中则不能合成黄原胶降解酶, 说明 *Cellulomonas* XT11 合成的黄原胶降解酶应是底物诱导酶。当在含有黄原胶的基础培养基中添加不同浓度的葡萄糖时, 结果显示外源葡萄糖的加入会影响 *Cellulomonas* XT11 的产酶起始时间, 说明葡萄糖的加入抑制酶的合成, 只有在外源葡萄糖被消耗后黄原胶诱导的酶合成才能启动。同时还发现, 外源葡萄糖浓度的增加导致合成酶活力的下降。其它糖类如蔗糖、乳糖、麦芽糖、淀粉和纤维素等与葡萄糖一样, 对黄原胶的诱导产酶具有抑制作用。

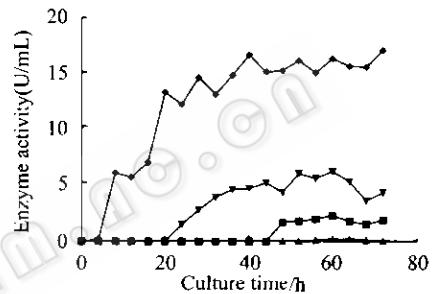


图 1 黄原胶降解酶的生产及外源葡萄糖的影响

◆ 0.3% xanthan, ▼ With 0.1% glucose,
■ With 0.2% glucose, ▲ Only 0.3% glucose

2.2 黄原胶寡糖的生物活性

2.2.1 黄原胶寡糖清除羟基自由基的活性: H_2O_2 在 Fe^{2+} 存在下可以发生 Fenton 反应, 生成羟基自由基 ($\cdot OH$): $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ 。

由于羟基自由基能够使番红产生特异性脱色反应, 根据番红溶液的脱色程度即可测定羟基自由基的含量^[10]。当在反应体系中加入具有羟基自由基清除功能的被测物时, 部分生成的羟基自由基在与番红发生脱色反应前被清除掉, 从而降低了番红溶液的脱色程度, 导致吸光度值的减小程度降低。所以, 利用 Fenton 反应可检测各种自由基清除剂对羟基自由基的清除能力。取酶水解不同时间的黄原胶寡糖样品分别测定其羟基自由基的清除能力, 结果如表 1 所示。

表 1 黄原胶寡糖的生物活性比较

酶解时间 (min)	50	100	150	200	250
粘度	91	76	62	40	27

续表1

还原糖 (mg/mL)	0.071	0.125	0.161	0.180	0.200
粘度/还原糖	1281.7	608.0	385.1	222.2	135.0
清除率 (%)	0	0	1.0	16.9	7.2
$\Delta E (U)^*$	2.7	8.2	0	27.1	/

注解: * $\Delta E =$ 苯丙氨酸解氨酶活力_{寡糖处理样} - 苯丙氨酸解氨酶活力_{未处理样}

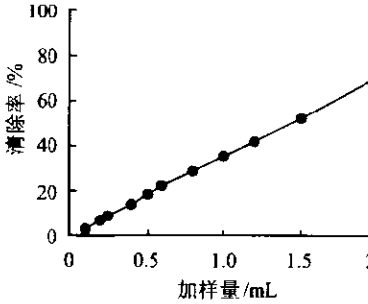


图2 黄原胶寡糖添加量与羟基自由基清除率的关系

黄原胶本身不具有清除自由基能力,但当黄原胶被降解到某种程度后所形成的黄原胶寡糖,则具有清除羟基自由基的功能,其中,以粘度与还原末端比为222.2时羟基自由基清除能力最强。以该寡糖样品为研究材料,考察不同黄原胶寡糖加量对羟基自由基清除能力的影响,结果如图2所示。黄原胶寡糖的加样量与其清除羟基自由基的能力基本成正相关。

2.2.2 黄原胶寡糖的激活因子活性:植物防卫反应中有相当数量的激活因子都是寡糖,很多寡糖作为

激活因子能够诱导植物的非特异性免疫反应,从而启动抵抗病原菌侵袭的植物防御系统,使植物具有抵抗病原菌侵染的能力。苯丙氨酸代谢途径中的产物如木质素、香豆素、类黄酮等都具有抑制病原菌的作用,因此该代谢过程中的第一个关键酶苯丙氨酸解氨酶的活性可作为植物抗病性的重要生理指标。将不同降解程度的黄原胶寡糖样品作用与大豆子叶后发现(表1),黄原胶寡糖确实能诱导苯丙氨酸解氨酶活性,且最高酶活性表达发生在作用后6h左右,说明黄原胶寡糖具有激活植物防卫反应的功能。

2.2.3 黄原胶寡糖对野油菜黄单孢菌的抑菌活性:采用上述具有生物活性的黄原胶寡糖,我们试验了寡糖的抑菌能力,结果发现黄原胶寡糖对 *E. coli* 的生长没有影响,但却能抑制野油菜黄单孢菌的生长,其中以粘度与还原末端比为222.2的寡糖样品的抑菌能力最强,抑菌圈可达2.7mm~3.0mm。野油菜黄单孢菌是引起油菜发生茎腐病的致病菌,每年可使油菜减产30%左右,黄原胶寡糖对其抑菌活性的发现,说明黄原胶寡糖具有潜在的防治油菜茎腐病能力。由上述研究结果说明,黄原胶寡糖确实具有生物活性,本文仅对黄原胶寡糖的部分生理活性做了初步研究,还有待今后详细研究黄原胶寡糖的结构与生物活性间的相互关系及其它可能的生理功能。

参考文献

[1] Rina S, Desh D, Anakshi K. *Biochem Biophys Acta*, 1999, **1428**: 433~438.
 [2] Ayer A R, Ebel J, Finelli F. *Plant Physiol*, 1976, **57**: 751~759.
 [3] Bof J F, Linthorst H J M, Cornelissen B J C. *Annu Rev Phytopath*, 1990, **28**: 113~138.
 [4] Ebel J, Cosio E G. *Int Rev Cytol*, 1994, **148**: 1~36.
 [5] Lasky L A. *Annu Rev Biochem*, 1995, **64**: 113~117.
 [6] Garcia-Ochoa F, Santos V E, Casas J A, *et al.* *Biotechnol Adv*, 2000, **18**: 549~579.
 [7] Cadmus M C, Jackson L K, Burton K A, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1982, **44**: 5~11.
 [8] Rinaldo N J, Milas M. *Int J Biol Macromol*, 1980, **2**: 45~48.
 [9] Miller G L. *Anal Chem*, 1959, **31**: 426~428.
 [10] 张乃东, 郑威, 彭永臻. *分析化学研究简报*, 2003, **5**: 552~555.