

野油菜黄单胞菌8004 α -淀粉酶酶学性质研究^{*}

陈红歌, 陈 健, 王 旭, 胡 渝, 马向东

(河南农业大学 生物技术与食品科学学院, 河南 郑州 450002)

[摘 要] 对野油菜黄单胞菌的 α -淀粉酶进行了定位, 确定该酶为胞外酶, 且只有一型 α -淀粉酶。采用切胶纯化得到纯酶, SDS-PAGE 测得其相对分子质量为52 ku。研究显示, 该酶的最适作用温度为50℃, 最适pH 值为6.2, 通过酶的稳定性研究发现该酶热稳定性较差, 而pH 值在4.86~10.47 具有较好的稳定性。

[关键词] 野油菜黄单胞菌; α -淀粉酶; 酶学性质

[中图分类号] Q 556⁺. 2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)02-0143-04

野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)是一种革兰氏阴性菌, 具有两大特性: 一方面以碳水化合物为原料产生一种高粘度水溶性的胞外多糖——黄原胶而赋予菌落黄色粘液状的菌落特征^[1,2]。另一方面其还是一种能引起十字花科植物黑腐病的致病菌, 根据其寄主的不同, 具有多达123个变种^[1]。

作为一种革兰氏阴性菌, 野油菜黄单胞菌具有多种分泌机制, 能分泌 α -淀粉酶等多种胞外酶和胞外多糖^[3~5]。目前, 国内还未见有对革兰氏阴性菌所分泌的 α -淀粉酶性质的研究报道。本研究对野油菜黄单胞菌8004 α -淀粉酶酶学性质进行了研究, 为进一步对该 α -淀粉酶基因进行分子定向进化研究提供依据, 同时也为生产中能充分利用野油菜黄单胞菌自身的淀粉酶活性提供酶学基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株 野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* p.v. *campestris*)8004 为广西大学分子遗传研究所何勇强惠赠。

1.1.2 培养基、抗生素及主要试剂 NYGA(B)培养基用于野油菜黄单胞菌的培养; NYGB+1 g/L可溶性淀粉用于野油菜黄单胞菌淀粉酶的测定; LBSP培养基: 在LB培养基中添加10 g/L 淀粉和0.1 g/L 曲利本蓝, 用于胞外淀粉酶鉴定。

抗生素: 利福霉素Rif 采用100 μ g/mL; 溶菌酶为BB公司产品; 低分子质量标准蛋白质为中国科

学院上海生物化学研究所产品; 其他化学试剂为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 酶活力测定 采用YOO改良法^[6]。将5 g/L可溶性淀粉溶液2.5 mL和等体积0.04 mol/L磷酸缓冲液(pH 5.9)加入试管中, 于40℃恒温水浴中平衡10 min后加入待测酶液0.5 mL, 摇匀, 准确反应10 min, 然后加入5 mL 0.1 mol/L HCl终止反应, 吸取0.5 mL的上述混合液与5 mL稀碘液混匀。以0.5 mL 0.04 mol/L磷酸缓冲液(pH 5.9)加5 mL稀碘液作空白对照, 于660 nm波长下, 用10 mm玻璃比色皿迅速测定其吸光度值。在上述条件下, 以每min水解1 mg淀粉所需的酶量为一个活力单位。

1.2.2 酶的定位 (1)细胞不同区域待测酶液的制备^[7]。取在NYGA固体培养基上30℃培养2~3 d的Xcc 8004单菌落, 接于加有100 μ g/mL利福霉素的5 mL NYGB试管中, 30℃振荡培养18 h。

取100 μ L培养液, 接入加有100 μ g/mL利福霉素的50 mL NYGB+1 g/L可溶性淀粉液体培养基的三角瓶中, 30℃, 200 r/min振荡培养48 h。

取5 mL液体培养物超声波破碎3 min后, 全部转移到10 mL离心管中, 15 000 g离心20 min, 取上清液作细胞内外全组分。

取5 mL液体培养物于10 mL离心管, 10 000 g离心10 min, 取上清液作细胞外组分。

将沉淀用冷灭菌超纯水洗涤2次, 温和悬浮于5 mL灭菌超纯水, 超声波破碎3 min后全部

* [收稿日期] 2004-08-05

[基金项目] 河南省科技厅重点科技攻关项目(0223013500)

[作者简介] 陈红歌(1967-), 女, 河南许昌人, 副教授, 主要从事微生物酶学研究。

转移到10 mL 离心管中, 15 000 g 离心20 min, 取上清液作细胞内组分。

将 的沉淀用灭菌超纯水洗涤2次, 温和悬浮于0 30 mmol/L Tris-HCl(pH 8 0)-1 mmol/L EDTA -20% 蔗糖溶液中, 加入200 μ g/mL 溶菌酶于0 放置1 h, 15 000 g 离心20 min, 取上清液作细胞周质组分。

在 的沉淀中加入5 mL 50 mmol/L NaAc (pH 4 5)-2 mmol/L CaCl₂-5 mmol/L DTT, 超声波破碎2 min, 匀浆离心, 取上清液作细胞膜内组分。

(2) LBSP 平板鉴定法^[8]。将野油菜黄单胞菌接种于含有100 μ g/mL 利福霉素的LBSP 平板上, 于30 进行培养, 观察菌落周围有无透明水解圈。

1 2 3 α -淀粉酶酶谱制备 将发酵液离心后取上清液, 用聚乙二醇4000 浓缩, 酶谱制备采用淀粉同工酶法^[9], 分离胶质量浓度为50 g/L, 浓缩胶质量浓度为30 g/L。

1 2 4 α -淀粉酶的初步纯化 在用酶谱确定 α -淀粉酶存在的情况下, 对浓缩的粗酶液进行3 mm 垂直板50 g/L 非变性聚丙烯酰胺淀粉凝胶电泳, 电泳完毕后将左右两边约1/4 的胶条用碘液显色, 以确定 α -淀粉酶的位置, 将剩余胶块中对应 α -淀粉酶谱带的地方小心用刀片切下, 用0 04 mol/L 磷酸缓冲液(pH 5 9)过夜浸提, 然后对浸提液进行 SDS-

PAGE 检测。

1 2 5 α -淀粉酶相对分子质量的测定 采用 SDS-PAGE 法测定, 胶质量浓度为120 g/L。

1 2 6 酶的最适作用温度及热稳定性 参照文献[10]进行。

1 2 7 酶的最适作用pH 及pH 稳定性 最适作用pH 参照文献[10]进行; pH 稳定性是将发酵后的粗酶液用1 mol/L HCl和1 mol/L NaOH 溶液调整到不同pH 值, 于室温下放置2 5 h, 按常规方法测定残余酶活力。

2 结果与分析

2 1 酶的定位

对发酵液的不同组分进行酶活力测定, 结果见表1。

表1 α -淀粉酶在细胞不同区域的分布

Table 1 α -amylase location in cell's different fractions

区域 Area	酶活/(U · mL ⁻¹) Activity
细胞内外全组分 All fraction of cell	22 6
细胞外组分 Extracellular fraction	
细胞内 All fraction in cell wall	
细胞周质 Periplasmic	
细胞膜内 Intracellular fraction	

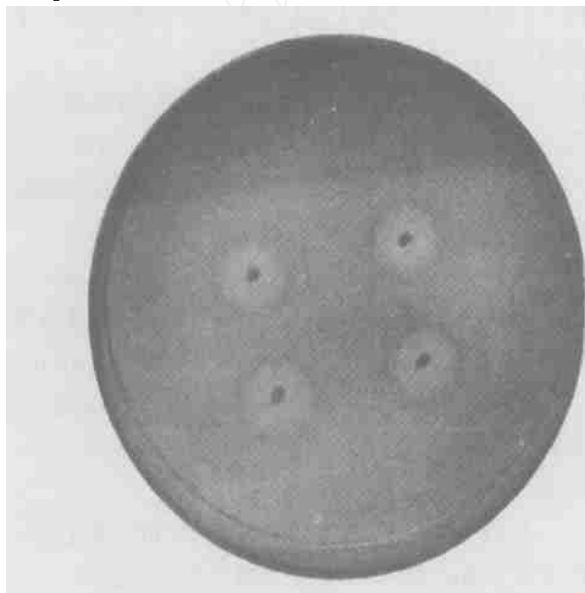


图1 胞外酶的淀粉水解圈

Fig 1 Starch-hydrolyzed holes of α -amylase

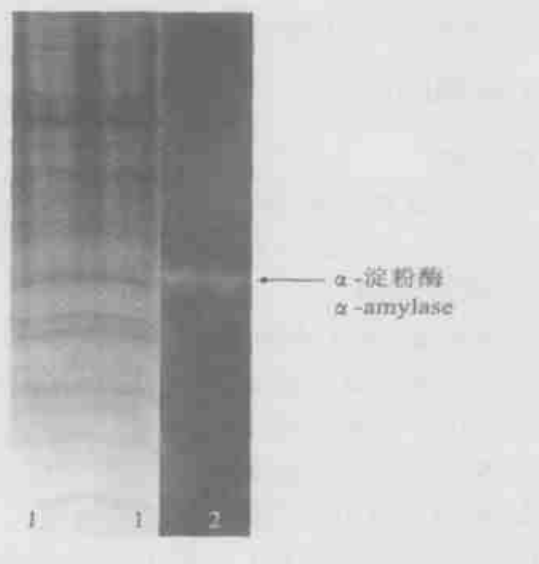


图2 PAGE 检测 α -淀粉酶酶谱

1 粗酶液G-250 染色; 2 α -淀粉酶酶谱

Fig 2 Detection of α -amylase zymogram by PAGE

1 Crude enzyme dyed by G-250; 2 Zymogram of α -amylase

由表1 可以看出, α -淀粉酶约有90 7% 分泌到

胞外, 膜内及周质内的酶可能为不完全转运所致, 据

此可将该酶确定为胞外酶。将该菌接种于LBSP 平板 30 过夜培养后, 亦可见明显的透明水解圈(图1), 同样证明该酶为胞外酶。因此, 只需将野油菜黄单胞菌的发酵液离心即可得到该菌的 α -淀粉酶粗酶液。

2.2 α -淀粉酶酶谱

粗酶液经PAGE 后, 将胶纵向切开, 一半进行全蛋白染色, 一半进行 α -淀粉酶酶谱反应, 结果见图2。从图2 可见一透明带, 即为 α -淀粉酶酶带, 显示粗酶液中只含有一型 α -淀粉酶。

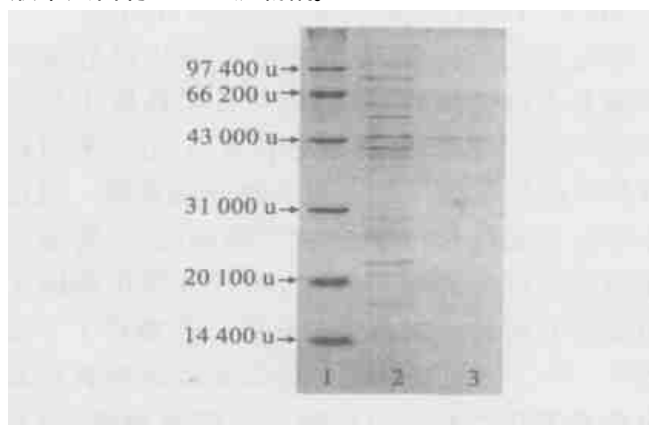


图3 粗酶液和纯酶的SDS-PAGE

1. 蛋白质标准分子质量; 2. 粗酶液; 3. 纯化的 α -淀粉酶

Fig. 3 SDS-PAGE of crude enzyme and purified α -amylase

1. Protein marker; 2. Crude enzyme; 3. Purified α -amylase

2.4 酶的最适温度及热稳定性

在不同温度下测定酶活力, 结果显示该酶的最适作用温度为50 (图5)。将酶液置于不同温度下保温30 min, 按常规方法测定残余酶活力, 以未保温

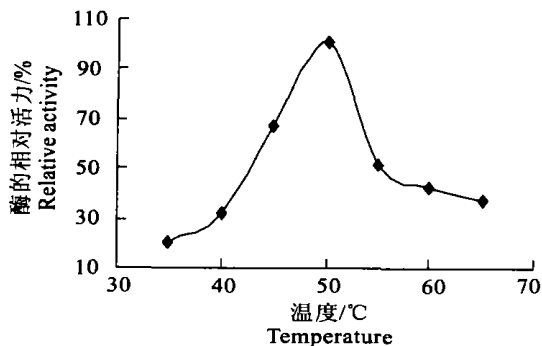


图5 温度对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of temperature on α -amylase's activity

2.5 酶的最适作用pH 及pH 稳定性

在不同pH 值的缓冲液中(pH 2~5.7 用柠檬酸-磷酸缓冲液; pH 5.7~8.0 用磷酸缓冲液; pH 8.0~10.4 则采用甘氨酸-NaOH 缓冲液) 测定酶活力, 结果见图7。图7 结果表明, 该酶最适作用pH

2.3 酶的纯化及相对分子质量

该 α -淀粉酶经淀粉酶酶谱检测和SDS-PAGE 检测, 均显示1 条单一的条带(图2, 3), 由此证明该酶是由一条肽链构成的单体酶。以标准蛋白质的相对分子质量对数($\log MW$) 对相对迁移率(R_m) 作图, 得到分子质量标准曲线, 结果见图4。由图4 计算出该 α -淀粉酶的相对分子质量约为52 ku。所测分子质量与从野油菜黄单胞菌中克隆出的 α -淀粉酶基因所编码的 α -淀粉酶分子质量^[11]相吻合。

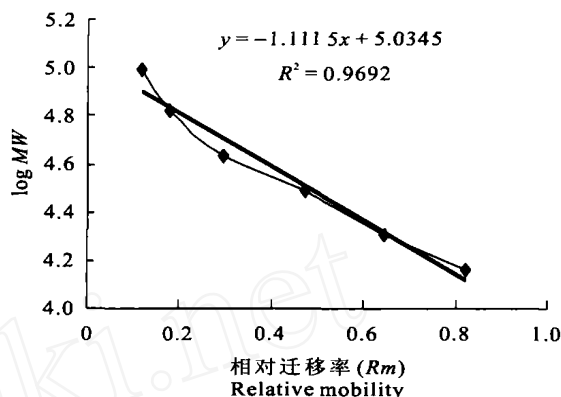


图4 6 种标准蛋白质的相对迁移率

Fig. 4 Electrophoretic mobility of 6 proteins

的酶活力为100%, 结果见图6。图6 结果表明, 该酶热稳定性较差, 在50 以下较稳定, 60 保温30 min 后酶活力已基本丧失。

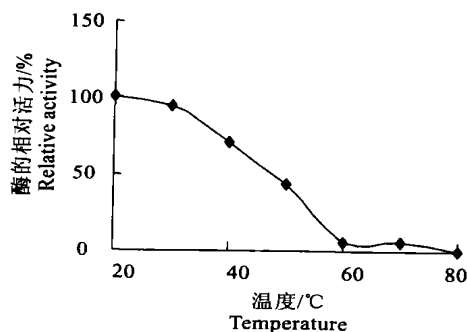


图6 温度对酶稳定性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on α -amylase's stability 值为6.2。将粗酶液用1 mol/L HCl 和1 mol/L NaOH 溶液调整到不同pH 值, 并于室温下放置2.5 h, 按常规方法测定残余酶活力, 以未调节pH 值的酶活力为100%, 结果见图8。图8 结果表明, 该酶具有较好的pH 值稳定性, 在pH 4.86~10.47能维持其

天然的构象,保持较好的稳定性。而pH 值低于4.86 或高于10.47 时,酶蛋白活性构象发生不可逆改变

而严重失活。

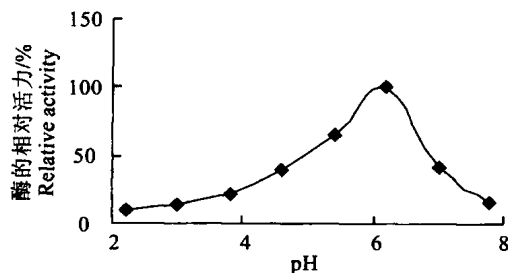


图7 pH 对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of pH on α -amylase's activity

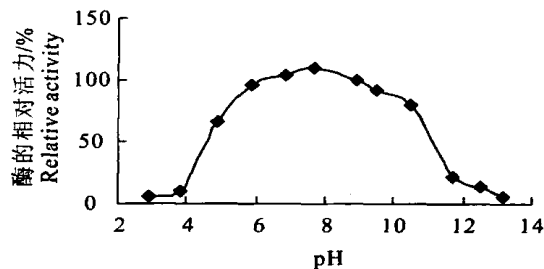


图8 pH 对酶稳定性的影响

Fig. 8 Effect of pH on α -amylase's stability

3 讨论

野油菜黄单胞菌8004只产生一型 α -淀粉酶,了解其酶学性质有助于对野油菜黄单胞菌生长、发酵过程进行有益的控制。如黄原胶的生产主要是采用野油菜黄单胞菌,如果能通过诱变育种或者分子定向进化的方式对菌种进行改良,提高其 α -淀粉酶的活性和稳定性,将有可能提高以淀粉为主要原料^[12]的发酵过程中野油菜黄单胞菌对原料的利用率,降低外加淀粉酶用量,提高产胶率。杨建华等^[13]将 β -淀粉酶基因转入野油菜黄单胞菌NK01,使其与黄单胞菌自身分泌的 α -淀粉酶协同作用,明显提高了淀粉利用率及黄原胶产率。

研究表明^[1~5],野油菜黄单胞菌具有分泌多种胞外酶和多糖的特性,这在革兰氏阴性菌中较为少见。随着基因工程载体的建立和应用,近年来对黄单胞菌分子遗传学的研究也越来越受到重视。通过对其生物合成途径和分泌机制^[14]的阐明,及野油菜黄单胞菌遗传研究系统的建立,国内外利用基因工程定向改造并构建重组菌株的研究工作取得了一定的进展^[3,13,15]。如果能采用一定的方式破坏黄单胞菌的负调控基因^[3]和造成植物病害的致病基因,充分利用其分泌性能好,分泌机制完善的特点,并加以改造,将有可能构建出分泌性能良好的工程菌,用于外源基因的高效分泌表达。

[参考文献]

- [1] Yi Hsiung, Ka Tin Choy, Chih Hsin Hung, et al Chromosome map of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 17 with locations of genes involved in Xanthan Gum synthesis and Yellow Pigmentation[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(1): 117- 125
- [2] 陈焕章 黄原胶的生产与应用[J]. 化学工业与工程, 1996, 13(2): 61- 62
- [3] 牛淑敏, 于松涛, 王玉香, 等 野油菜黄单胞菌8004胞外酶及胞外多糖合成正负调控基因在X. C. NK01菌中功能初探[J]. 南开大学学报(自然科学版), 1997, 30(1): 76- 81
- [4] Hu N T, Hung M N, Chiu S J, et al Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. J Bacteriol, 1992, 174(8): 2679- 2687.
- [5] Liu Y N, Tang J L, Clarke B R, et al A multipurpose broad host range cloning vector and its use to characterize an extracellular protease gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. Mol Gen Genet, 1990, 210: 433- 440
- [6] 史永超, 姜涌明 五种 α -淀粉酶测活方法的比较研究[J]. 微生物学通报, 1996, 23(6): 371- 373
- [7] Jun- ICHIABE, Naoki Onitsuka, Takashi Nakano, et al Purification and characterization of periplasmic α -amylase from *Xanthomonas campestris* K-11151[J]. J Bacteriol, 1994, 176 (12): 3584- 3588
- [8] 马向东, 马立新, 薛征峰, 等 一种鉴定 α -淀粉酶活性及其产生菌的新方法[J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(5): 456- 460
- [9] 胡能书 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985 113- 117.
- [10] 赵莹, 刘红岩, 宫正宇, 等 地衣芽孢杆菌A. 4041耐高温 α -淀粉酶的纯化及性质[J]. 吉林大学学报(自然科学版), 1997, (3): 85- 88
- [11] 马向东 α -淀粉酶的克隆与体外诱变[D]. 武汉: 华中农业大学, 2000
- [12] 王浩, 杨明慧 黄原胶适宜培养条件的研究[J]. 山东科学, 1997, 10(1): 49- 57.
- [13] 杨建华, 李时岩, 孟淑芳, 等 β -淀粉酶基因在黄单胞菌中的克隆和表达[J]. 南开大学学报(自然科学版), 1996, 29(1): 69- 73
- [14] Magdalen L, Carol M B, Noel T K, et al External loops at the C terminus of *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase C are required for species-specific secretion through the out type II pathway[J]. J Bacteriol, 1998, 180(6): 1431- 1437.
- [15] 姚仕义, 王金生 野油菜黄单胞菌重组克隆pXU 9278对黄原胶生物合成的影响[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(1): 36- 40

(下转第154页)

1881- 1885

- [53] Ryu S B, Karlsson B H, Ozgen M, et al Inhibition of phospholipase D by lysophosphatidylethanolamine, a lipid-derived senescence retardant[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94: 12717- 12721.
- [54] Ryu S B, Wang X M. Increase in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor bean leaves[J]. Bilchin Biophys Acta, 1998, 1393: 193- 202
- [55] Van Der Luit A H, Piatti T, van Doorn A, et al Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate[J]. Plant Physiol, 2000, 123: 1507- 1516

Functions of phospholipases D in responses to environmental stress and signal transduction

WANG Guo-ze, MAO Lin-chun, PAN Xin

(College of Biosystem Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029 China)

Abstract: Phospholipases D (PLD) is a multifunctional enzyme that can hydrolyze phospholipids. This article introduced the biochemical properties and functional regulation of PLD, and its role in signal transduction. In addition, responses of PLD to different environmental stresses including wounding, chilling, osmotic stress, hormone, microbes were also reviewed based on the up-dated advances in research.

Key words: phospholipase D; signal transduction; environmental stress

(上接第146页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)02-0107-EA

Study on properties of α -amylase from *Xanthomonas campestris* p.v. *campestris* 8004

CHEN Hong-ge, CHEN Jian, WANG Xu, HU Yu, MA Xiang-dong

(College of Biotechnology and Food Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: The α -amylase derived from *Xanthomonas campestris* p.v. *campestris* 8004 was confirmed as extracellular enzyme by two totally different methods and there was only one type α -amylase existing. The α -amylase was purified by PAGE, and SDS-PAGE indicated its molecular weight was 52 ku. The optimum temperature and pH of this enzyme was 50 and pH 6.2. Stability tests showed that this α -amylase was unstable at higher temperature, yet it was quite stable in wide pH range of 4.86- 10.47.

Key words: *Xanthomonas campestris* p.v. *campestris*; α -amylase; enzyme property