

陶 朕. 烟草叶际微生物中维生素 B₆ 代谢酶吡哆醛还原酶的研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 324–326.

烟草叶际微生物中维生素 B₆ 代谢酶吡哆醛还原酶的研究

陶 朕

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽合肥 230036)

摘要:吡哆醛还原酶(pyridoxal reductase, PLR)是维生素 B₆ 代谢关键酶。从烟草-叶际微生物共生系统中提取 PLR 粗酶后, 采用苯肼衍生方法测定 PLR 活性, 鉴定 PLR 酶的来源, 对叶际表面微生物进行分离、计数, 并分析对应的活性, 对其基本的酶学性质进行初步研究。结果表明: 叶际微生物是 PLR 酶的主要来源, 从烟草叶面分离得到了细菌、真菌、放线菌 3 种微生物; 数量上细菌 > 真菌 > 放线菌; 而同浓度下 PLR 活性比较, 真菌 > 细菌 > 放线菌; 该酶的最适反应温度为 35 ℃, 在 pH 值 7.0 时, 酶活力最高。

关键词:烟草; 叶际微生物; 吡哆醛还原酶; 活性分析

中图分类号: S572.01; Q563⁺.3 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-1302(2013)10-0324-03

磷酸吡哆醛(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)是维生素 B₆ 的主要辅酶形式, 在生物体氨基酸代谢、抗生素合成、调节免疫功能等^[1]方面有重要的生理作用。吡哆醛还原酶(pyridoxal reductase, PLR)在 PLP 补救途径中起重要作用。PLR 催化吡哆醛(pyridoxal, PL)生成吡哆醇(pyridoxine, PN), 再经催化生成磷酸吡哆醇(pyridoxine-5'-phosphate, PNP), 最后生成 PLP^[2-4]。

目前, 大多数对维生素 B₆ 的研究都是集中于其特定几个成分转换间的反应, 而很少研究使 PL、PLP 转化成其他成分的反应^[5]。早期在粟酒裂殖酵母和啤酒酵母中提取得到 PLR, 这种酶可以有效催化 PL-PN 的 NADPH 依赖型可逆反应。2011 年, Herrero 等从拟南芥中提取 PLR 的基因片段在受体中进行表达研究, 揭开了 PLR 还原酶在植物中研究的序幕^[5]。烟草作为一种模式植物与其生长环境中的微生物关系密切, 两者共同形成了植物-微生物共生体系统^[6]。叶际微生物作为微生态分子生态学一个新兴的研究领域, 已经引起人们的广泛关注。研究烟草叶际微生物中的 PLR, 既有利于进一步了解叶际微生物的某些特定性质, 也对进一步认识维生素 B₆ 代谢过程有意义, 同时也对研究这种共同环境下, 叶际表面微生物与植物中维生素 B₆ 代谢相互影响有重要的指导作用, 但叶际微生物的研究在国内鲜有报道。

本研究以烟草和烟草表面微生物为一个整体, 对 PLR 来源进行确认, 以及对烟草叶面微生物进行培养、分类、鉴定、计数, 得到了微生物量与 PLR 活性关系, 最后还对 PLR 的基本酶学性质进行了研究与分析。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

烟草种子来自安徽省农业科学院烟草研究院, 品种为云烟 21。MOPS、吡哆醛(PL)、苯肼、NADPH、高氯酸均购自上海生工生物工程公司, 试验用的高氯酸和纯水为分析纯。

分离所用培养基包括: 分离真菌用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(马铃薯 20 g、蔗糖 2 g、琼脂 2 g、水 100 mL); 分离细菌用牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏 0.3 g、蛋白胨 1.0 g、氯化钠 0.5 g、琼脂 1.5 g、水 100 mL); 分离放线菌用高氏一号培养基(可溶性淀粉 2 g、KNO₃ 0.1 g、K₂HPO₄ 0.05 g、琼脂 2 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g、NaCl 0.05 g、FeSO₄ · 7H₂O 0.001 g、水 100 mL)。

1.2 烟草叶际微生物和内生菌中 PLR 的提取

1.2.1 叶际微生物中 PLR 提取 取烟草叶片 2 g, 置于无菌烧杯中, 加入 10 mL 无菌水充分振荡(摇床 170 r/min, 2 h), 在无菌条件下取出叶片, 将摇匀的冲洗液划平板培养 48 h, 得到菌落后再进行扩大培养, 最后得到的菌液即为粗酶液。

1.2.2 内生菌中 PLR 提取 取烟叶 2 g, 用清水冲洗 2 h 后晾干, 70% 乙醇表面消毒 1 min, 然后用 0.01% 氯化汞表面消毒 8 min, 无菌水冲洗 3 次后, 放入无菌研钵中研碎加入 10 mL 无菌水后划平板培养 48 h, 得到菌落后进行扩大培养, 富集菌液即为粗酶液。

1.3 PLR 活性的测定

参照 Yokochi 等的 PLR 活力检测方法^[7], 略有改动。反应体系为 600 μL: 300 μL 粗酶液, 60 μL PL (2 mmol/L), 60 μL NADPH (2 mmol/L), 180 μL MOPS (50 mmol/L), 在对照组中另加入 200 μL 高氯酸 (2 mol/L) 灭活。试验组和对照组于 35 ℃ 水浴 2 h, 向试验组中加入 200 μL 2 mol/L 高氯酸, 终止反应。8 000 r/min 离心 10 min, 取 600 μL 上清于棕色试管, 加入 200 μL 苯肼 (0.1 mol/L)、2 mL 水, 在 60 ℃ 中反应 25 min, 在 410 nm 下检测吸光度。酶活单位 (U) 定义为: 每 min 每 mg 蛋白催化减少的 PL 的量 (nmol/L)。

1.4 叶际微生物的计数、鉴定

取 1 cm² 烟叶置于 10 mL 无菌水中, 在超声波振荡仪中振荡 4 min 后^[8], 在无菌环境中取出叶片, 得到淋洗液进行梯度稀释, 分别将原液稀释为 10⁻³ 原液、10⁻⁵ 原液、10⁻⁷ 原液。取上述各浓度样品液 1 mL, 分别均匀涂布于马铃薯葡萄糖琼脂培养基、牛肉膏蛋白胨培养基和高氏一号培养基, 将培养皿倒置于 28 ℃ 生化培养箱中, 2~3 d 后检查细菌并计数; 3~5 d 后检查真菌并计数; 5~8 d 检查放线菌并计数。得到的

收稿日期: 2013-03-15

作者简介: 陶 朕 (1987—), 男, 江苏苏州人, 硕士研究生, 主要研究维生素 B₆ 代谢途径。E-mail: taozhen19871007@126.com。

菌,用 OLYMPUS 倒置 IX51 荧光仪观察各微生物形态,然后依据真菌鉴定手册、细菌系统鉴定手册^[9]、放线菌鉴定等标准进行初步鉴定。

2 结果与分析

2.1 烟草叶片与微生物共生体系统 PLR 来源的确定

由表 1 看出,当烟草在立即磨碎反应条件下,无菌组培烟草 PLR 活性比有菌自然生长的烟草略低。而通过 35 ℃ 水浴 6 h 后磨碎,无菌组培烟草 PLR 活性远小于有菌自然生长的烟草。通过上述 2 组试验得出,有菌烟草在适宜的条件下 PLR 活性有较大增长,而无菌烟草在相同条件下 PLR 活性基本不变,即 PLR 的主要来源并非植物内部维生素 B₆ 的代谢产物,而主要是来自微生物自身维生素 B₆ 代谢产生的。

表 1 不同处理方式烟草 PLR 活性

处理	PLR 活性($D_{410\text{ nm}}$)			
	组 1	组 2	组 3	平均值
无菌 35 ℃ 水浴 6 h	0.043	0.039	0.046	0.043
有菌 35 ℃ 水浴 6 h	0.694	0.703	0.711	0.703
无菌立即反应	0.038	0.044	0.041	0.041
有菌立即反应	0.093	0.101	0.108	0.101

从有菌自然生长的烟草分离得到叶面微生物和内生菌,经扩大培养后,调整到相同浓度($D_{600\text{ nm}}$ 绘制标准曲线),测定 PLR 活性(图 1),烟草内生菌维生素 B₆ 代谢过程中的 PLR 活性远低于叶面微生物维生素 B₆ 代谢过程的 PLR 活性。从而得出,烟草叶片与微生物共生体系统中的 PLR 主要来于烟草叶面微生物。

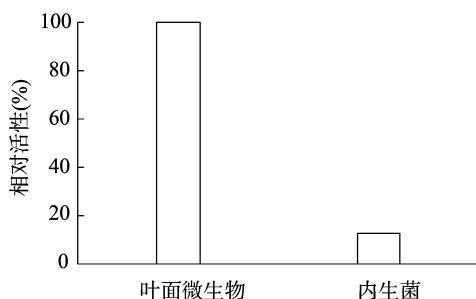
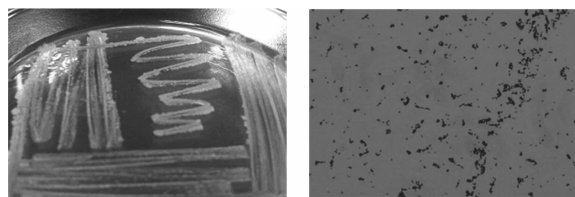


图1 内生菌和叶面微生物PLR活性比较

2.2 烟草叶际微生物分离

用 OLYMPUS 倒置 IX51 荧光仪观察 3 种不同培养基培养的菌,经过微生物鉴定手册初步鉴定分别为细菌(图 2)、真菌(图 3)、放线菌(图 4)。

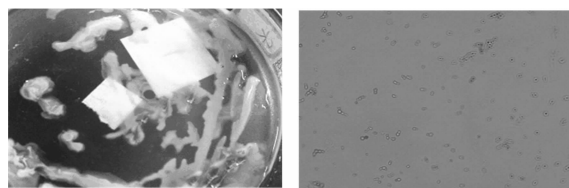


细菌菌落 细菌(1 000×)

图2 细菌分离鉴定

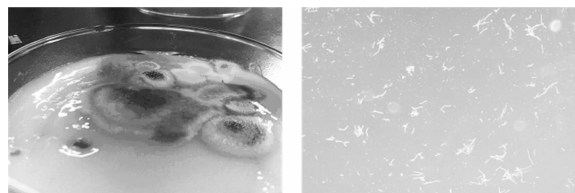
2.3 烟草叶际微生物菌种 PLR 活性比较

叶面分离得到的 3 种菌稀释至同一浓度,测得各种菌 PLR 活性如图 5 所示。同一浓度下,维生素 B₆ 代谢过程中



真菌菌落 真菌(100×)

图3 真菌分离鉴定



放线菌菌落 放线菌(400×)

图4 放线菌分离鉴定

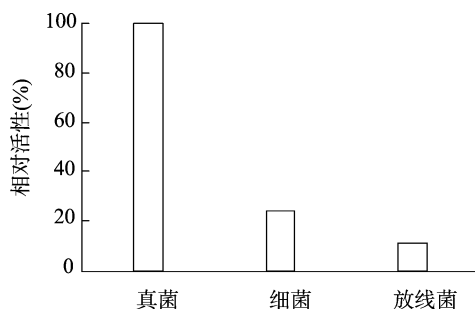


图5 真菌、细菌、放线菌代谢过程中PLR活性比较

PLR 活性从大到小依次为:真菌、细菌、放线菌。即真菌在维生素 B₆ 代谢过程中的 PLR 酶含量大于细菌与放线菌。

2.4 不同处理方式烟草叶面微生物的数量以及对活性

由表 2 可知,3 种环境处理方式,由于其烟草叶面的湿度是不同的,最后得到菌的数量不同。结果显示,经过 3 种方式处理后,细菌数量多于真菌和放线菌,表明在叶际表面微生物中细菌为优势菌种。而从总的微生物数量上,完全浸没于无菌水 35 ℃ 恒温一夜后的总微生物量多于洒 1 mL 无菌水于叶面和恒温箱 35 ℃ 处理,表明水溶液环境更适合微生物生长。

表 2 不同环境处理方式叶际微生物的数量比较

处理	数量(CFU/cm ²)		
	细菌	真菌	放线
完全浸没于无菌水,35 ℃ 1 夜	1.3×10^8	6.2×10^5	2.3×10^4
洒 1 mL 无菌水于叶面,35 ℃ 1 夜	5.2×10^6	0.7×10^5	1.5×10^4
恒温箱,35 ℃ 1 夜	0.8×10^5	4.2×10^3	0.9×10^3

由表 3 可见,3 种处理方式后 PLR 活性不同,活性大小与烟草叶片表面微生物数量呈正相关,即烟草叶际微生物数量决定了维生素 B₆ 代谢过程 PLR 活性。

2.5 烟草叶际微生物 PLR 的基本酶学性质

2.5.1 反应时间对酶活性的影响 由图 6 可以看出,随时间变化,PLR 的相对活性与反应时间基本呈正相关关系,2 h 后随时间延长 PLR 活性趋于平缓,即该酶适宜的反应时间应为 2 h。

表 3 不同环境处理方式叶面微生物的 PLR 活性比较

处理方式	PLR 活性($D_{410\text{ nm}}$)			
	组 1	组 2	组 3	平均值
完全浸没于无菌水,35 ℃ 1 夜	0.779	0.771	0.782	0.777
洒 1 mL 无菌水于叶面,35 ℃ 1 夜	0.353	0.388	0.396	0.379
恒温箱,35 ℃ 1 夜	0.071	0.133	0.128	0.111

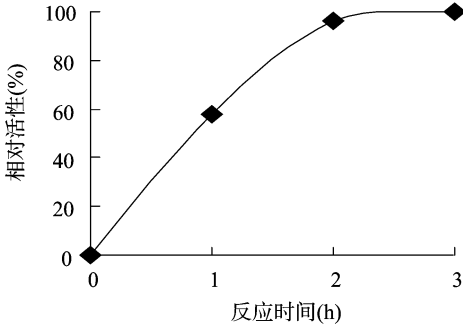


图6 PLR 的酶反应时间曲线

2.5.2 反应温度对酶活性影响 由图 7 可以看出,随反应温度的升高,PLR 活性逐渐增大,当温度 35 ℃ 时,PLR 活性达到最大;温度继续升高,反应活性降低,当温度超过 50 ℃ 后,该酶就失去活性。说明 PLR 的最适催化温度为 35 ℃。

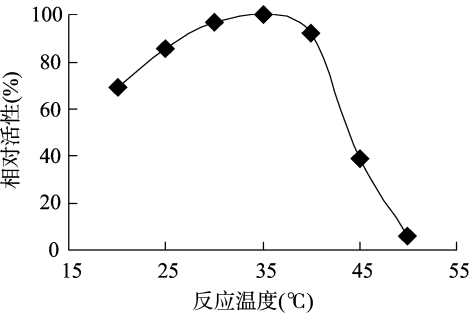


图7 温度对PLR酶催化活性的影响

2.5.3 pH 值对酶活性影响 pH 值是影响酶活性的一个重要因素,只有在合适的 pH 值区间中酶的催化反应才能顺利进行。从图 8 可以看出,PLR 活性区间为 pH 值 5.5~8.5;pH 值低于 5 或高于 9,酶均未表现出活性;而 pH 值 7.0 时 PLR 的活性最大。

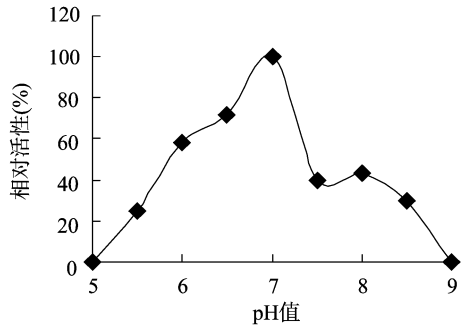


图8 pH值对PLR活性的影响

3 结论与讨论

通过对烟草与烟叶表面微生物的共生系统中 PLR 的研究,确认了在此共生系统中 PLR 酶的主要来源为叶际微生物;对叶际微生物进行了初步的分离与计数,得到了细菌、真菌、放线菌在烟草叶际的数量与其活性的关系;同时也得到了在相同菌浓度下,PLR 活性大小依次为真菌、细菌、放线菌的结论;最后对此酶的基本酶学性质进行了分析,得到了此酶最适的反应条件,即在 35 ℃ 恒温水浴下,当 pH 值 7.0 时,反应 2 h 以上,此酶活性最大。

在自然生长的烟草叶际表面存在大量的微生物,在适宜的湿度和温度下,微生物会大量繁殖,尤其是细菌和真菌,从而使叶际表面微生物维生素 B₆ 代谢过程中的 PLR 增多,而植物本身 PLR 含量较少,由此猜测,植物在自身维生素 B₆ 补救途径过程中有可能受外界微生物中的大量 PLR 影响。

同时在对 PLR 酶进行破碎提取时,发现其破碎后上清液活性基本为 0,而活性主要集中在沉淀中,在对其沉淀进行分级沉淀后,得到的分级沉淀的活性基本一致,初步判断此酶是一种膜蛋白酶^[10]。

参考文献:

[1] Rall L C, Meydani S N. Vitamin B₆ and immune competence[J]. Nutrition Reviews, 1993, 51 (8) : 217 - 225.

[2] Morita T, Takegawa K, Yagi T. Disruption of the *plrI*⁺ gene encoding pyridoxal reductase of *Schizosaccharomyces pombe* [J]. The Journal of Biochemistry, 2004, 135 (2) : 225 - 230.

[3] McCormick D B, Chen H. Update on interconversions of vitamin B₆ with its coenzyme [J]. Journal of Nutrition, 1999, 129 (2) : 325 - 327.

[4] McCormick D B, Gregory M E, Snell E E. Pyridoxal phosphokinases. I. Assay, distribution, I. Assay, distribution, purification, and properties [J]. Journal of Biological Chemistry, 1961, 236 (7) : 2076 - 2084.

[5] Herrero S, González E, Gillikin J W, et al. Identification and characterization of a pyridoxal reductase involved in the vitamin B₆ salvage pathway in *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology, 2011, 76 (1/2) : 157 - 169.

[6] 国 辉, 毛志泉, 刘训理. 植物与微生物互作研究进展 [J]. 中国农学通报, 2011, 27 (9) : 28 - 33.

[7] Yokochi N, Yoshikane Y, Trongpanich Y, et al. Molecular cloning, expression, and properties of an unusual Aldo - Keto reductase family enzyme, pyridoxal 4 - dehydrogenase, that catalyzes irreversible oxidation of pyridoxal [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279 (36) : 37377 - 37384.

[8] 周 育, 乔梧梧, 王 静, 等. 植物叶际微生物提取方法研究 [J]. 植物研究, 2006, 26 (2) : 233 - 237.

[9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349 - 354.

[10] Nakano M, Morita T, Yamamoto T, et al. Purification, molecular cloning, and catalytic activity of *Schizosaccharomyces pombe* pyridoxal reductase [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274 (33) : 23185 - 23190.