

# 植物低聚糖提取和生物活性鉴定

李宏潮 王虹 胡道芬 余露\*

(北京市植物细胞工程实验室, 北京 100081)

**摘要** 应用酶解法从小麦细胞壁中提取出低聚糖。经过活性鉴定, 具有诱导大豆和小麦抗毒素产生, 特别是从小麦代谢、细胞、植株等水平上改善该作物体内防御功能等生物作用。水解酶的种类、纯度、酶活值与所降解低聚糖的活性程度密切相关; 高纯度、高酶活单位的水解酶提取的低聚糖, 具有较强的生物功能。对来源不同的低聚糖进行了活性差异的比较, 同时还讨论了其它因素——诸如小麦细胞的生理状态, 低聚糖保存条件等对低聚糖活性的影响。

**关键词** 酶解法 植物低聚糖 小麦细胞壁 生物活性

低聚糖是从植物细胞壁中降解的多糖分子片断, 约含2至15个单糖分子。各种具有生物活性的低聚糖统称为低聚糖素。80年代中期, 美国的Peter Albersheim教授首次提出了这个新概念和新的研究领域<sup>[1]</sup>, 并认为低聚糖具有调控植物生长、发育、繁殖、防病和抗病等方面的功能, 是一类新型的植物激素(或称植物调节分子)。

从植物细胞壁中提取低聚糖的方法迄今有3种: 化学法、酶解法及化学结合酶解法<sup>[2,4,7]</sup>。目前国际上有关低聚糖的研究主要集中在双子叶植物上<sup>[3,5,6]</sup>, 在粮食作物上还未见报道。

本文将介绍应用酶解法从小麦细胞壁中提取低聚糖, 并鉴定其活性。

## 材料和方法

采用小麦种子胚或花药在MS培养基上诱导产生愈伤组织, 经过3个月继代培养获得了大量的胚性和非胚性细胞系。利用这些细胞系分别建立了悬浮细胞培养。

参照Kurosaki法<sup>[4]</sup>加以修改: 取2克旺盛生长的小麦细胞, 加入0.1M乙酸钠溶液中, 经3000rpm 5~10分钟粉碎匀浆, 倒入酶液(60个酶活单位的果胶酶, 果胶裂解酶和纤维素酶等)在37℃条件下酶解3小时后, 立即取出在沸水中处理20分钟终止酶解作用, 冷却后, 11000rpm离心30分钟。上清液取少量样品重复用蒽酮法测定其中性糖浓度作为低聚糖的参比浓度使用。

为了比较不同来源低聚糖的作用差异, 作者分别从小麦细胞壁和小麦赤霉病的菌丝细胞壁[Gibbrellia zeae (Schw.) Petch]分离出低聚糖, 并与美国乔治亚大学提供的低聚糖(来源于Phytophthora megasperma f. sp. glycinea的细胞壁<sup>[5]</sup>)进行了生物作用方面的差异

比较分析。

## 结果与分析

### 一、低聚糖提取

利用悬浮培养细胞和愈伤组织多次酶解的重复结果表明,以中性糖浓度计算,每克小麦细胞均获得0.1克低聚糖,提取率约10%。在提取方法和程序相对一致的条件下,不同来源的细胞对低聚糖的产生率不造成差异;另外各种水解酶类或组合对低聚糖的酶解产量亦不产生明显差异,但在其生物活性上引起较大的差别(后面详述)。

为了获得准确的实验结果,每次提取低聚糖应当采用生长状态相对一致的悬浮培养细胞或愈伤组织;蒽酮反应需防止沉淀,减小测定误差。

### 二、大豆子叶法测定低聚糖活性

大豆子叶法是检测大豆抗毒素的经典方法<sup>[2]</sup>。我们利用此法鉴定从小麦细胞壁降解获得的低聚糖是否能够刺激大豆抗毒素合成与积累,作为检测作者提取的低聚糖有无生物活性的一种间接手段。二次实验结果如表1。

测定结果表明,我们提取的低聚糖对大豆抗毒素的诱导和积累具有一定作用,间接地证明从小麦细胞壁中分离的低聚糖可以作为一种促进植物抗毒素形成的诱导物。

表1 大豆抗毒素的诱导测定

低聚糖浓度	实验 I O. D. 值	实验 II O. D. 值
25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.114	0.091
0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (对照)	0.000	0.000

注:大豆抗毒素的测定波长为285nm; O. D. 值表示大豆抗毒素的含量;对照自发诱导产生的大豆抗毒素的 O. D. 值调至零。

### 三、低聚糖对PAL (苯丙氨酸解氨酶) 的作用

通过测定低聚糖对小麦细胞PAL的作用,可以直观而准确地显示低聚糖对该作物体内防御系统的影响,直接检测作者提取的低聚糖是否具有生物活性。我们将25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 低聚糖处理小麦悬浮细胞和愈伤组织后测定的PAL酶活峰值并与对照比较的结果列于表2。

表2的结果说明,无论是悬浮细胞还是愈伤组织,低聚糖都能大幅度地提高其PAL活性;同时对抗病和感病的小麦品种均具有激发PAL活性的有益效果。

表2 测定PAL酶活峰值

小麦细胞来源	低聚糖浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	PAL 酶 活 值*	
		抗病品种: 临7410	感病品种: 有7
悬浮细胞	0 (对照)	42.1	34.5
	25	74.6	48.1
愈伤组织	0 (对照)	46.2	-
	25	59.5	-

\* PAL在290nm处,其O. D.值变化0.01为1个酶活值。

采用不同来源的低聚糖,通过测定对小麦细胞内PAL的影响比较其活性强度(见表3)。

**表3 不同来源的低聚糖对小麦细胞内PAL的影响**

低聚糖来源	PAL 酶 活 值	
	处理 1 天	处理 2 天
小麦细胞壁	23.2	40.6
赤霉菌菌丝细胞壁	40.9	28.3
美国提供	23.5	40.5
无低聚糖的对照	16.7	20.1

注:四次重复;实验材料为小麦感病品种有7;低聚糖量为25 $\mu$ g/ml

从表3可以看出,低聚糖处理的PAL酶活峰值大大高于对照。三种不同来源的低聚糖都明显地提高了PAL活性水平。作者从小麦细胞壁提取的低聚糖具有同等的作用强度。

#### 四、不同水解酶降解的低聚糖活性比较

利用几种水解酶单独处理或配合使用处理小麦细胞壁,分别获得了低聚糖,其生物活性和作用效果有很大差异(见表4)。

**表4 不同水解酶提取低聚糖的生物活性和效果**

组 别	水 解 酶	低聚糖浓度( $\mu$ g/ml)	PAL酶活值	处理时间(天)
1	果 胶 酶	25	11.6	2
2	果胶酶+纤维素酶R-10	25	21.7	2
3	果胶酶+纤维素酶RS	25	26.5	2
4	纤维素酶RS+果胶裂解酶	25	40.9	2
5	无低聚糖的对照	0	10.6	2

从表4可见:果胶酶单独使用分离的低聚糖对PAL的影响甚微;第2组处理的低聚糖对提高PAL活性有正作用,第3组处理的低聚糖使酶活作用进一步加强;而第4组处理提取的低聚糖表现出最强的活性,显著地提高了小麦细胞内PAL的活性水平。

更进一步的研究表明,第2、3、4组处理的低聚糖都能使小麦品种获得代谢、生化和细胞水平上不同程度的抗病性,但只有第4组的低聚糖能够使这种抗性在小麦植株水平上表达,即在大田条件下,改善和提高小麦植株的抗病性。

#### 五、影响低聚糖作用活性的其它因素分析

多次实验结果表明:生长快速、分裂能力强的细胞类型作为低聚糖的提取材料比其它类型的细胞要好得多。曾对4个小麦品种(京花1号、有7、临7410、德麦1号)进行了比较,都以生长快速、分裂能力强的细胞类型的细胞壁中释放出来的低聚糖活性最高,作用效果最理想。

小麦细胞的生理状态也影响低聚糖活性。一般处于生长旺盛状态的细胞是分离低聚糖的适宜材料。通常悬浮培养4~7天的细胞,固体培养10~15天的愈伤组织产生的低聚糖,具有较好的活性和生物功能。

低聚糖的妥善贮存是影响其活性的另一个重要因素。实验中发现,低聚糖溶液如果污染,将使低聚糖的活性急剧下降直至完全丧失。作者采用细菌过滤器处理低聚糖液并贮

存在冰箱中,保存一个月后,低聚糖活性没有明显下降。

## 讨 论

1. 从病原体或寄主细胞壁无论是用化学法还是酶解法均可降解产生低聚糖,通过鉴定才能确定所获得的低聚糖是否可作为改善植物防御功能的诱导物。利用大豆子叶法,鉴定从小麦细胞壁提取的低聚糖活性,仅仅是一种间接鉴别法。真正研究低聚糖对小麦抗病性的作用机制,须有一套准确的利用小麦本身为材料建立的实验系统的鉴定方法。本文应用PAL测定小麦细胞壁低聚糖活性,可能是一种有意义的尝试。

2. 从本文研究结果中看出,低聚糖的活性和作用效果与采用的水解酶种类密切相关,其实质是水解酶的纯度(或酶活值)制约着低聚糖的活性程度。例如,纤维素酶RS和果胶裂解酶是高纯度、高酶活值的酶类,比果胶酶和普通的纤维素酶高数百至数千倍。因而提取的低聚糖呈现相应强的生物活性。特别是在植株水平上,在大田各种不利因素的干扰下,能够提高小麦品种的抗性,更具有研究价值。

3. 作者从小麦细胞壁中分离得到了能够改善小麦抗病性的低聚糖。该研究途径与从其它来源提取低聚糖的方法比较具有2个优点:①小麦细胞培养方法成熟,短时间容易获得庞大群体的细胞。例如,悬浮培养10天可收集到约100万个细胞/ml,可在任何季节提供充足的实验材料。②用小麦来源的低聚糖改善小麦本身的防御系统更能准确地揭示两者关系和低聚糖的作用机制。

4. 因为低聚糖是从细胞壁中降解出来的,所以其活性也必然会受细胞的生理状态和培养条件影响。在本研究中观察到处于旺盛生长期的细胞最适合作为低聚糖的提取材料。其原因可能是细胞快速生长,细胞内各种代谢活性也旺盛,有助于提高低聚糖活性。细胞生长迅速,促使新生细胞数量和体积增加,利于水解酶从细胞壁结构上释放更多有活性的低聚糖。Kurosaki报道(4),从胡萝卜细胞壁酶解的低聚糖活性受细胞脂化程度影响,脂化作用愈强,低聚糖活性愈低。这与我们的实验结果相似。

5. 在本研究中,从小麦细胞壁提取的低聚糖实质上是多种低聚糖的混合物,其中可能掺杂一些非活性的低聚糖。限于条件,我们暂不能对低聚糖进行结构分析和定性分析。若能将各种有活性的低聚糖分离纯化并定性定量鉴定,则可进一步提高低聚糖的作用效果,有利于低聚糖的研究。因此,建立一套快速、稳定提取高活性、高纯度低聚糖的有效程序,还有待进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 1 皮特·沃伯希姆. 低聚糖素. 科学, 1986, (1): 19~26
- 2 Eugene A et al. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. Plant Physiol, 1983, (71): 916~920
- 3 Kurosaki F et al. Isolation and antimicrobial activity of the phytoalexin 6-Methoxymellein from cultured carrot cells. Phytochemistry, 1983, (22): 669~672

- 4 Kurosaki F. et al. Phytoalexin production in cultured carrot cells treated with pectinolytic enzymes. *Pythochemistry*, 1985, (24): 1479~1480
- 5 Janice K et al. Purification and partial characterization of a Glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean, *The Journal of Biological Chemistry*, 1984, (259): 11312~11320
- 6 Jin D. F. et al. *The Journal of Biological Chemistry*, 1984, (74): 989~992
- 7 Stoddart R W et al. Pectic polysaccharides of growing plant tissues. *Biochemistry*, 1967, (102): 194~204

## Extraction and Bioactivity Analyses of Plant Oligosaccharides

Li Hongchao    Wang Hong    Hu Daofen    Yu Lu

(*Beijing Plant Cell Bioengineering Laboratory, Beijing 100081*)

**Abstract** Plant oligosaccharides were enzymatically extracted from wheat cell walls. After their bioactivity analyses, the oligosaccharides were proved to possess functions upon induction of both soybean and wheat phytoalexins and improvement of wheat defence at its metabolism, cell and plant levels. Bioactivity of wheat oligosaccharide was closely correlated with variety, purification and active unit of the hydrolytic enzymes used; strongly biofunctional oligosaccharides could be released by enzymes of high purification and active unit. Three kinds of oligosaccharides from different sources were compared in their biofunctions, while other factors were also discussed about their influence on oligosaccharide bioactivity, such as the physiological status of wheat cells and the conditions to preserve oligosaccharides.

**Key words:** Enzymatic method; Plant oligosaccharides; Wheat cell wall; Bioactivity