

酵母菌中超氧化物歧化酶的研究

冯清平 张晓君

(兰州大学生物系 兰州 730000)

摘要 首次提出了用甲苯破壁提取酵母菌中 SOD 的方法,此法提取 SOD 的含量分别为氯仿-乙醇法、酶裂解法和细胞自溶法的 1.29、1.08 和 2.01 倍。通过对 5 种酵母菌的测定,发现酵母菌对氧的抗性与其 SOD 含量密切相关;同时对一株 SOD 含量较高的卡尔酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*) BY2 菌株进行了营养和培养条件的研究,结果表明它们对该菌株 SOD 含量和 SOD 同功酶的影响较大。

关键词 酵母菌,超氧化物歧化酶 (SOD), 营养物,培养条件

超氧化物歧化酶 (EC 1.15.1.1 Superoxide Dismutase, 简称 SOD) 是生物细胞内产生的一类特殊的酶,它可以催化超氧阴离子 O_2^- 的歧化反应并产生分子氧和过氧化氢^[1]。超氧阴离子是一种活性氧自由基,它对细胞有毒害作用,而 SOD 能专一地清除 O_2^- ,使生物体免受伤害。因此,SOD 作为一种重要的氧自由基清除剂,已引起人们的极大关注。它可以预防和治疗一些疾病,如慢性炎症、某些自身免疫病、肺气肿和氧中毒等,还有抗衰老、防辐射和防肿瘤等作用^[2]。目前,SOD 已应用于医药和化妆品生产,而且随着研究的深入,它的应用范围还在不断扩大。

SOD 广泛分布于动、植物和微生物体内^[2]。近年来,对微生物的 SOD 进行了许多研究,但对酵母菌 SOD 的研究主要集中于 SOD 纯化和结构特征以及高产菌株的选育上^[3-7],而对其形成的生理学研究还缺少报道。根据这一现状,作者近几年对酵母菌 SOD 形成的生理进行了较系统的研究。本文对选出的一株 SOD 高产菌株 BY2 形成 SOD 的生理条件作一报道。同时,为了提高 SOD 提取效率,对 SOD 破壁提取方法做了初步研究,提出一种优于现有方法^[4,6,9]且有利于工业化生产的方法。

1 材料和方法

1.1 菌种

1.1.1 BY2 菌株:卡尔酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*),分离自扎啤。

1.1.2 3453 菌株:面包酵母 (*S. cerevisiae*),本实验室保藏。

1.1.3 NY5 菌株:酒精酵母 (*S. cerevisiae*),本实验室保藏。

1.1.4 RY 菌株:深红酵母 (*S. ruber*) 分离自党参组织培养物。

1.1.5 AY 菌株:产酸酵母 (*S. acidifaciens*) 分离自市售酸奶。

1.2 培养基

1.2.1 斜面保存培养基: 8°Be 麦芽汁固体培养基。

1.2.2 酵母菌分离培养基: YEPD 培养基^[10]。

1.2.3 发酵培养基(%): 蛋白胨 2, 酵母膏 1, 葡萄糖 1, 8°Be 麦芽汁 5(V/V), 自然 pH 值。

1.2.4 测碳源培养基: 见文献[11]。

1.2.5 测氮源培养基(%): 琥珀酸钠 1.4, 蔗糖 0.7, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.1, 氮源 1, pH 5.5。

1.2.6 测定碳氮配比培养基(%): 琥珀酸钠 2, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.1, 蛋白胨 0.5—4, pH 5.5。

1.2.7 测金属离子影响培养基: 酵母菌基本培养基^[10]中加入不同金属离子。

1.2.8 测 pH 影响培养基(%): 琥珀酸钠 1.5, 蔗糖 0.5, 酵母膏 0.5, 蛋白胨 0.5, 以 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 溶液调 pH 至不同值。

1.3 破壁方法和 SOD 的提取

采用甲苯破壁法^[12]破壁。每克酵母加入 0.8ml 甲苯, 35℃破壁 45min, 以磷酸缓冲液 (pH 7.8, 含 0.1 mmol/L EDTA) 提取 5 h, 4000 r/min 离心 5 min, 分离出水相, 10000r/min 离心 15min, 收集上清液, 此即 SOD 粗提液。

1.4 培养方法

斜面菌种接入试管发酵培养基中, 静置培养 14h 后, 以 4% 的接种量接入装有 60ml 发酵培养基的三角瓶中, 30℃摇床(转速 140r/min) 培养 15h。

1.5 SOD 活性测定

参照文献[13]。

1.6 SOD 的电泳

SOD 的电泳和电泳凝胶酶活性染色参照文献[13]方法进行。染色结果以岛津 CS-910 型双波长薄层色谱扫描仪扫描记录。

2 结果和讨论

2.1 不同破壁方法提取 SOD 的比较

分别以超声波处理(以 JC-2 型超声处理仪处理 5min)、细胞自溶法^[10](提取 5h)、酶裂解法(2% 蜗牛酶液 30℃ 保温 7.5 h)、氯仿-乙醇法^[10]和甲苯法 5 种方法破壁, 制备 SOD 粗提液, 测定酶活力分别为 216、700、1310、1094.1 和 1410.2 (u/g 细胞)。结果表明甲苯法效果最优, 酶活力分别为前 4 种方法的 6.53、2.01、1.08 和 1.29 倍。

2.2 酵母菌菌种间 SOD 含量的差异与其对氧抗性的关系

将不同酵母菌接到发酵培养基中增殖后, 分别测定 SOD 的含量及对氧的抗性(表 1)。以同量菌液接种麦芽汁平板, 分别在充入纯氧和空气的密闭容器中培养, 对比菌体生长量^[14], 以氧气对于空气中培养的相对存活率大小来表示酵母菌对氧的抗性。

从表 1 结果可以看出, BY2 菌株的 SOD 含量最高, 同时它对氧的抗性也最强, 它在氧气中培养的相对存活率为 84.3%。另外, 还可以看出各酵母菌的 SOD 含量与氧中存活率呈一致关系, 通过回归分析得其相关系数为 0.9772, 说明这两个指标显著相关。由此也

表 1 不同酵母菌 SOD 的含量及对氧的抗性

Table 1 Content of SOD in different yeasts and tolerance of yeast to O_2

菌株 Strain	酶含量 Content of SOD (u/g cells)	相对存活率(%) Relative percentage of survive
BY2	773.2	84.3
NYS	545.7	43.0
3453	708.3	65.6
RY	568.0	50.7
AY	633.1	ND*

* ND. 无数据 No data

可以证明,酵母菌对氧的抗性与它的 SOD 含量紧密相关。

2.3 BY2 菌株不同生长期 SOD 含量的变化

由 BY2 菌株的生长曲线和各生长阶段 SOD 含量的变化(图 1)可以看出,在培养的对数生长期后期菌体内酶含量最高,此时菌体生物量也基本达到顶峰。因此, SOD 总量在对数后期达到最大,以此期培养物提取 SOD 产量也最高。

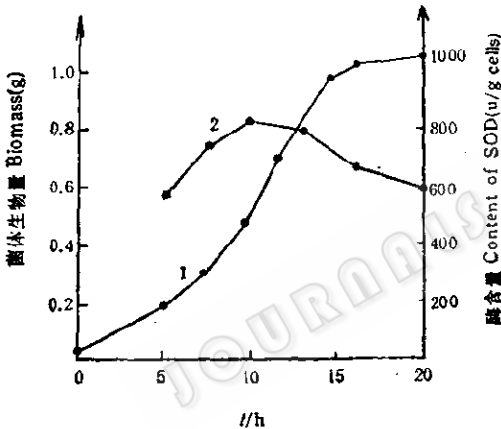


图 1 BY2 菌株不同生长期 SOD 含量的变化

Fig. 1 Change in content of SOD of BY2 strain at different phase

1. 菌体生物量 Biomass; 2. 酶含量 Content of SOD.

2.4 培养条件对 BY2 菌株 SOD 形成的影响

2.4.1 碳源的影响: 分别以乳酸钠、葡萄糖、蔗糖、琥珀酸钠、松三糖、熊果苷、淀粉、蜜二糖、麦芽糖以及松三糖 + 0.2% 蔗糖、琥珀酸钠 + 0.2% 蔗糖为碳源,培养至对数后期收集菌体,测定菌体湿重和 SOD 含量(表 2)。结果表明,以蔗糖、葡萄糖和麦芽糖为碳源时,菌体生物量较高,而以乳酸钠、琥珀酸钠为碳源则不利于菌体生物量的形成;以

松三糖和琥珀酸钠为碳源时,单位菌体生物量的 SOD 含量最高;而以松三糖 + 0.2% 蔗糖为碳源时,等量发酵液中 SOD 的总含量最高,仅以蔗糖为碳源时次之;以乳酸钠为碳源时,无论菌体的生物量或 SOD 的含量均最低。

2.4.2 氮源的影响: 由 7 种氮源对 BY2 菌株的生物量和 SOD 含量的影响试验结果(表 3)可以看出,氮源对酵母菌 SOD 的含量影响较大,以蛋白胨为氮源时,菌体 SOD 含量是以硝酸铵为氮源时的 3 倍多,增加幅度较大,差异显著。BY2 菌株以有机氮为氮源相对比以无机氮为氮源时 SOD 含量更高,而又以蛋白胨为最佳氮源,以此为氮源时菌体生物量和 SOD 含量均最高。

2.4.3 碳氮配比的影响: 固定碳源浓度为 2%,改变氮源浓度以形成不同的碳氮配比,培养后测定菌体的生物量和 SOD 含量(表 4)。当氮源浓度为 2% 时,菌体生物量最大;氮

表 2 碳源对 BY2 菌株生物量和酶含量的影响

Table 2 Effects of carbon sources on biomass and SOD activity in strain BY2

碳源 Carbon source	菌体湿重 Wet weight of cells (g)	酶含量 Content of SOD (u/g cells)
乳酸钠 Sodium lactate	0.38	532.0
葡萄糖 Glucose	1.33	555.5
蔗糖 Sucrose	1.60	678.7
琥珀酸钠 Sodium succinate	0.65	821.1
松三糖 Melicitose	0.97	841.5
熊果苷 Arbutin	1.01	687.0
淀粉 Starch	0.80	766.8
蜜二糖 Melibiose	0.89	750.5
麦芽糖 Maltose	1.31	713.3
松三糖+0.2%蔗糖 Melicitose +0.2% sucrose	1.02	1085.2
琥珀酸钠+0.2%蔗糖 Sodium succinate +0.2% sucrose	1.08	785.3

表 3 氮源对 BY2 菌株生物量和酶含量的影响

Table 3 Effects of nitrogen sources on biomass and SOD activity of strain BY2

氮源 Nitrogen source	菌体湿重 Wet weight of cells (g)	酶含量 Content of SOD (u/g cells)
NH_4NO_3	1.66	191.8
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.55	353.7
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	ND*	335.7
$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	1.61	434.5
酒石酸铵 Ammonium tartrate	1.70	393.8
草酸铵 Ammonium oxalate	1.54	503.6
蛋白胨 Peptone	1.97	635.6

* ND. 无数据 No data.

表 4 碳氮比对 BY2 菌株生物量和酶含量的影响

Table 4 Effects of ratio of carbon to nitrogen on biomass and SOD activity in strain BY2

碳源浓度 Content of carbon source (%)	氮源浓度 Content of nitrogen source (%)	菌体湿重 Wet weight of cells (g)	酶含量 Content of SOD (u/g cells)
2	0.5	1.17	414.7
2	1	1.23	403.5
2	2	1.36	409.4
2	3	1.30	391.2
2	4	1.28	485.0

源浓度为 0.5—3% 时菌体 SOD 含量基本相同, 而氮源浓度增至 4% 时, SOD 含量约提高 20%, 显著增加, 因此增加氮源浓度有利于 SOD 的形成。

2.4.4 金属离子的影响: 金属离子对 BY2 菌株生长和 SOD 含量的影响试验结果 (表 5) 表明, 基本培养基中添加微量的 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{3+} 离子均可促进 SOD 的生成, 但 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 离子均明显抑制菌体的生长; Fe^{3+} 离子单独作用时可以促进菌体的生长, 而且可以使 SOD 含量提高 2.1 倍; Fe^{3+} 离子与 Cu^{2+} 或 Mn^{2+} 离子同时加入培养基时, 可以减轻它们对菌体生长的抑制。因此, 在培养基中添加微量的 Fe^{3+} 离子对促进 BY2 菌株的生长和提高其 SOD 含量有很大作用。

表 5 金属离子对 BY2 菌株生物量和酶含量的影响

Table 5 Effects of metal ions on biomass and SOD activity in strain BY2

CuSO_4 ($10\mu\text{mol/L}$)	MnCl_2 ($100\mu\text{mol/L}$)	FeCl_3 ($500\mu\text{mol/L}$)	菌体湿重 Wet weight of cells (g)	酶含量 Content of SOD (u/g cells)
			0.83	268.0
+			0.10	670.1
	+		0.46	353.3
		+	1.10	560.7
	+	+	1.07	223.4
+	+		ND*	ND
+		+	0.39	164.1

* ND. 无数据(菌体生物量太小) No data.

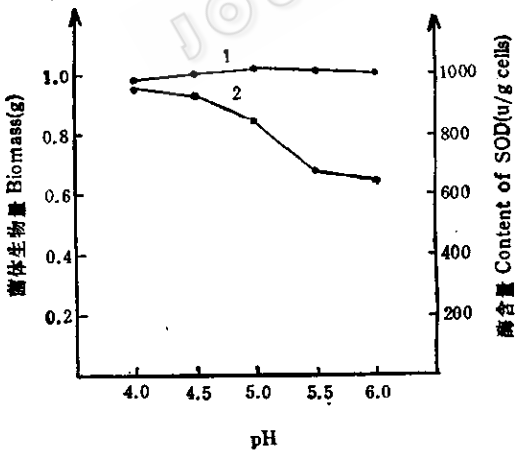


图 2 pH 对 BY2 菌株生长和 SOD 含量的影响

Fig. 2 Effects of pH on biomass and SOD activity in strain BY2

1. 菌体生物量 Biomass; 2. 酶含量
Content of SOD.

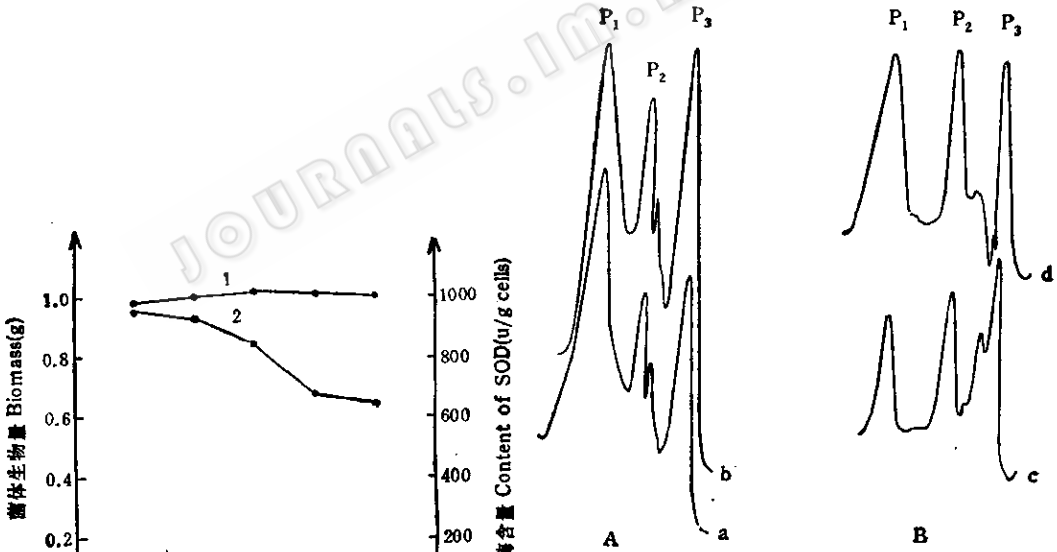


图 3 不同培养条件下 SOD 电泳凝胶扫描结果
Fig. 3 Result of densitometric scanning of SOD isoenzymes under different culture conditions

A. 以葡萄糖(a)和琥珀酸钠(b)为碳源, 氯仿-乙醇法破壁; B. 以酒石酸铵(c)和蛋白胨(d)为氮源, 甲苯法破壁。

A. Glucose (a) and sodium succinate (b) as carbon source, cells were broken with Chloroform-Ethanol; B. Ammonium tartrate (c) and peptone (d) as nitrogen source, cells were broken with toluene.

2.4.5 pH 的影响: 将 pH 值调为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0, 分别接种和培养 BY2 菌株后, 菌体的生长和 SOD 含量的结果(图 2)表明, 在 pH 4.0 和 4.5 时 SOD 含量较高, 而提高 pH 不利于 SOD 的形成; pH 的变化对 BY2 菌株生长的影响较小。

2.5 培养条件对 SOD 同工酶的调节

不同碳、氮源条件下培养的 BY2 菌株的 SOD 粗提液经 PAGE 凝胶电泳后, 活性染色的结果用双波长色谱扫描仪扫描, 结果见图 3。

由图 3 结果可以看出, BY2 菌株 SOD 经凝胶电泳活性染色后显示 3 条活性带, 不同破壁方法对 SOD 酶带略有影响。例如, 以氯仿-乙醇法破壁, 电泳带 P_2 峰尾侧有一个小峰, 而以甲苯法破壁时, 小峰出现在 P_3 峰的前侧。

不同的碳、氮源培养条件下电泳谱带 3 条峰的总面积和各峰的相对面积均有差异。图 3 的 A 中 b 与 a 相比总峰面积明显增加, 尤其是 P_2 和 P_3 峰增加较多, 而 P_1 峰变化不大; B 中 d 与 c 相比, 总峰面积也有增加, 且主要为 P_1 峰的增加, P_2 峰略有提高, P_3 峰则基本不变。总结其他碳氮源培养条件下的扫描结果可得出相同的结论。可以认为, 碳源主要通过影响电泳谱中 P_2 和 P_3 峰的 SOD 同工酶型的含量来调节细胞内 SOD 的含量, 而氮源则主要通过 P_1 峰的 SOD 酶型的量来调节细胞内 SOD 含量。这进一步说明了 BY2 菌株的 SOD 含量受碳源的影响大于氮源的原因, 同时也说明 SOD 3 种同工酶是受不同的调控方式调节的。

参 考 文 献

- [1] Weisiger R A, Fridovich I. *J Biol Chem.* 1973, 218: 3582—3592.
- [2] 袁勤生. 生化药物杂志, 1988, 44(2): 1—9.
- [3] 高卜渝, 李宗林, 李谐勋, 等. 生化药物杂志, 1988, 44(2): 32—34.
- [4] Gosein S A, Fridovich I. *Biochim Biophys Acta*, 1972, 289: 276—283.
- [5] Steinman H M. *J Biol Chem.* 1980, 255: 6758—6765.
- [6] Cass A E G, Allen O H, Villy H *et al.* *Carlsberg Res Commun.* 1978, 43(6): 439—450.
- [7] 张博润, 田宇清, 黄一英, 等. 微生物学报, 1994, 34(4): 279—284.
- [8] Polakis E S, Bartly W. *Biochem J.* 1965, 97: 284—297.
- [9] Foy J J, Bhattacharjee J K. *J Bacteriol.* 1977, 129: 978—982.
- [10] 贾盘兴, 蔡金科. 微生物遗传学实验技术. 北京: 科学出版社, 1992, 407.
- [11] Foy J J, Bhattacharjee J K. *J Bacteriol.* 1978, 136: 647—656.
- [12] Berger E, Slein M, Colowick S *et al.* *J Gen physiol.* 1946, 29: 379—391.
- [13] Beauchamp C, Fridovich I. *Anal Biochem.* 1971, 44: 276—287.
- [14] 江慧修. 微生物学报, 1989, 29(1): 33—38.
- [15] Archibald F S, Fridovich I. *J Bacteriol.* 1981, 146: 928—936.

STUDIES ON SUPEROXIDS DISMUTASE OF YEAST

Feng Qingping Zhang Xiaojun

(Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract A method of breaking cell with toluene has been used for the first time to extract SOD from yeast, and we have compared this method with other three methods, we found that SOD activity of crude extraction by this method were respectively 1.29, 1.08 and 2.01 times higher than the methods of treating with chloroform-ethanol, snailase and cell autolysis. As well as in 5 yeast strains, we discovered that the tolerance of yeast cell to O_2 closely related to their content of SOD. The varied culture conditions of one high SOD activity strain (*Saccharomyces carlsbergensis* BY2) were studied, the results showed the effects of those conditions on the content of SOD and SOD isoenzymes.

Key words Yeast, Superoxide dismutase (SOD), Nutrients, Culture conditions

JOURNALS.IM.AC.CN