

# 从酵母菌中分离纯化超氧化物歧化酶\*

谭天伟 马润宇 杨元忠

(北京化工大学生物化学工程系 北京 100029)

张博润

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

超氧化物歧化酶(SOD)由于具有消除氧自由基的功能,在医药、保健品中具有重要应用价值。我国目前SOD产品主要是从牲畜血液中提取<sup>[1]</sup>,这个方法所用原料有限,SOD质量不稳定。80年代后,美国和日本先后开发了用发酵法生产SOD,大大地降低了生产成本<sup>[2]</sup>。但由于SOD为胞内蛋白,因而发酵法产生SOD后提取工艺极为复杂,至少需要六步,一般经过细胞破碎、离心、盐析、透析、离子交换层析(2~3次)和凝胶层析等才能达到比活 $>3000\text{u}/\text{mg}^{[3-4]}$ 。由于细胞破碎主要为机械法(如球磨和超声波法),胞内所有蛋白都释放出来,SOD比活只有 $10\sim 30\text{u}/\text{mg}$ ,因而后续SOD纯化步骤很多,导致最终SOD收率只有30%左右。Grunow开发了冻融法破碎细胞及疏水色谱纯化工艺,将分离工艺简化到五步<sup>[5]</sup>,SOD收率达到68%,比活为 $3000\text{u}/\text{mg}$ 。但冻融法破碎细胞由于需要超低温设备,很难放大。而且疏水色谱在放大中也难于操作。本文研究了一种酵母SOD分离纯化新工艺。

## 1 材料和方法

### 1.1 原料

异丙醇和丙酮为北京化工厂产品,化学纯。聚丙烯腈(PAN)中空纤维膜(截断分子量分别为2.0万、4.0万)由清华大学化工系提供。PAN中空纤维膜(截断分子量为6.0万)为中国科学院生态环境研究中心产品。酵母膏和蛋白胨为中国科学院微生物研究所生产。

### 1.2 SOD发酵菌种及培养条件

酵母SOD菌种及诱变后高产菌ZDF-48均由中国科学院微生物研究所提供<sup>[6]</sup>。15L发酵罐培养条件:白糖6%,酵母膏1%,蛋白胨1%,自然pH,通气量 $0.12\text{vvm}$ ,搅拌速度 $50\text{r}/\text{min}$ ,发酵时间24h。

### 1.3 SOD活性及总蛋白的含量分析

SOD活性分析采用改进的微量邻苯三酚自氧化法<sup>[7]</sup>。总蛋白含量用Bradford法测定<sup>[8]</sup>,以牛血清蛋白为标准蛋白。

### 1.4 SOD释放和纯化工艺

用异丙醇浸泡离心收集的湿菌体,异丙醇:湿菌体 $=9:1(\text{V}/\text{W})$ ,浸泡120min,抽滤除去溶剂,加入3倍体积 $50\text{mmol}/\text{L}$ 磷酸钾缓冲液( $\text{pH}7.0$ ),搅拌120min,离心除去菌体便可得到SOD释放液,用PAN中空纤维膜(截断分子量6.0万)将SOD释放液浓缩1倍,用 $2\text{mol}/\text{L}$  HCl调节pH到5.0,加入0.8倍丙酮,搅拌均匀后,离心( $3000\text{r}/\text{min}$ )除去沉淀蛋白,在上清液中继续加入0.3倍丙酮(丙酮二次沉淀),离心收集沉淀便可得到SOD纯化产品。

\* 本项目获得国家教委回国人员科研资助金的部分资助。

本文于1995年10月27日收到。

2 结果

2.1 胞内 SOD 释放条件

不同醇类有机溶剂浸泡酵母菌，可以释放胞内 SOD，如图 1 所示。

当不加溶剂时，酵母菌有一定自溶，但用异丙醇处理酵母后，SOD 释放活性由 125u /ml 增高到 260u /ml。异丙醇浓度和时间对 SOD 释放也有很大影响，如用 70%、80% 和 90% 异丙醇浸泡细胞 120min，每毫升的 SOD 释放量分别为 250u、280u 和 320u，而比活分别为 458u /mg、321u /mg 和 270u /mg，即异丙醇浓度越高，处理时间越长，SOD 释放量越大，同时胞内杂蛋白释放也越多。用异丙醇处理后，过滤除去溶剂，抽提缓冲液 pH 对 SOD 释放和纯化也有影响。当 pH=7.0 时，释放 SOD 比活最高，继续增加 pH 时，由于杂蛋白释放量增加，导致 SOD 比活下降。若以超声波法处理酵母 1.5h 时，上清液 SOD 以活性 100% 计，其 SOD 比活只有 10u /mg，用异丙醇处理后，SOD 释放率可达 91%，比活提高了 28 倍。若用异丙醇处理诱变高产菌 ZDF-48，SOD 比活可以提高到 500u /mg，释放率为 89%，下面的纯化工艺以诱变高产菌为发酵菌种。

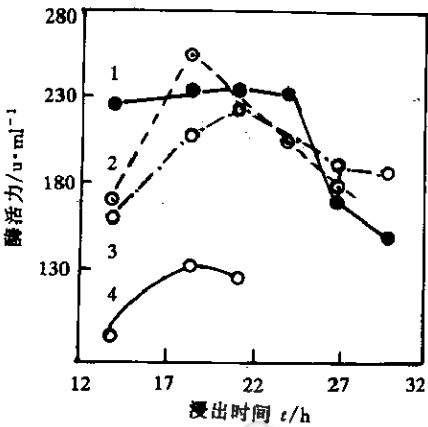


图 1 不同醇类溶剂对酵母 SOD 释放的影响  
(溶剂浓度 80%，浸泡时间 90min)  
1. 甲醇；2. 异丙醇；3. 乙醇；4. 无溶剂。

2.2 中空纤维超滤浓缩 SOD 释放液

用 PAN 中空纤维膜浓缩 SOD 释放液，以减少后续过程丙酮的用量，降低纯化成本。三种截断分子量的 PAN 膜的超滤结果如表 1 所示。

表 1 PAN 中空纤维膜浓缩 SOD 释放液 1 倍时的结果

| PAN 截断分子量                     | 2.0 万 | 4.0 万 | 6.0 万 |
|-------------------------------|-------|-------|-------|
| 纯水透水量( L / m² · h)            | 38.5  | 108.5 | 120.0 |
| 酶液透水量( L / m² · h)            | 7.0   | 10.0  | 45.5  |
| SOD 截留率( %)                   | 90    | 89    | 89    |
| 蛋白浓度( mg · ml <sup>-1</sup> ) | 0.771 | 0.755 | 0.740 |

\* AP=0.1MPa，流量 10L /h，初始蛋白浓度 0.39mg /ml。

由表 1 可知，SOD 和其它释放杂蛋白分子量 >6.0 万，根据电泳结果 SOD 亚基分子量为 17 000，若酵母 SOD 为二聚体，则分子量为 34 000，和牛血 SOD 分子量相近<sup>[1]</sup>，但根据超滤结果，酵母 SOD 可能为四聚体，此时 SOD 分子量为 6.8 万，和一般 Cu /Zn-SOD 分子量 65 000 接近<sup>[9]</sup>。当用 6.0 万 PAN 膜进行超滤，浓缩倍数为 1 倍时，SOD 收率为 90%。

2.3 SOD 分级沉淀

当 pH 为 7.0 时，丙酮沉淀 SOD 曲线如图 2 所示，当加入 1.5 倍丙酮，SOD 收率只有 65%，比活只有 1500u /mg。酵母 SOD 等电点在 4.0 左右。在 pH5.0 时 SOD 沉淀不多，而杂蛋白沉淀很多，即大多

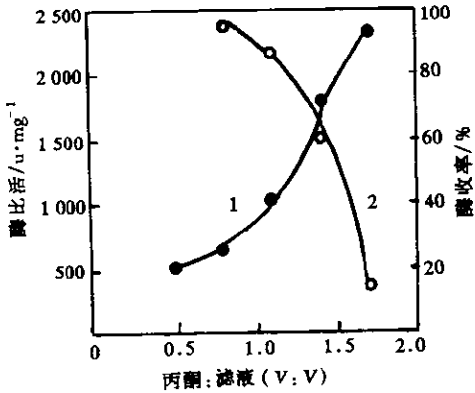


图2 丙酮沉淀分离纯化 SOD  
(释放溶液浓缩 1 倍, pH7.0)

1. 上清液 SOD 比活; 2. 上清液 SOD 收率。

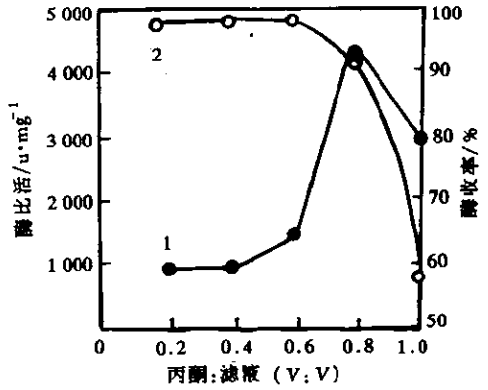


图3 丙酮对 SOD 分离纯化的影响  
(SOD 释放液浓缩 1 倍, pH5.0)

1. 上清液 SOD 比活; 2. 上清液 SOD 收率。

数杂蛋白等电点在 pH4.0 ~ pH5.0。因而采用降低 pH 到 5.0 来改善丙酮沉淀效果, 其结果如图 3 所示。

由图 3 可知, 只需加入 0.8 倍丙酮, 上清液 SOD 比活可达 3967u /mg, 收率为 74%, 继续加入 0.3 倍丙酮, SOD 全部沉淀, 离心可得到 SOD 纯化产品。150g 诱变 SOD 高产酵母菌体(约 8L 发酵液) 经过整个纯化工艺后, 结果如表 2 所示。

表 2 SOD 纯化结果(150g 菌体)

| 分离步骤      | 体积或重量 | 酶活 /u                  | 总蛋白 /mg | 比活 /u · mg <sup>-1</sup> | 收率 /% | 纯化倍数 |
|-----------|-------|------------------------|---------|--------------------------|-------|------|
| 菌体        | 150g  | 1.86 × 10 <sup>9</sup> | 9000.0  | 20                       | 100   | 1    |
| 异丙醇释放     | 450ml | 1.66 × 10 <sup>9</sup> | 374.0   | 455                      | 89    | 22   |
| 超滤浓缩      | 225ml | 1.50 × 10 <sup>9</sup> | 337.0   | 445                      | 81    | 22   |
| 0.8 倍丙酮沉淀 | 380ml | 1.39 × 10 <sup>9</sup> | 35.0    | 3967                     | 74    | 198  |
| 丙酮二次沉淀    | 137ml | 1.23 × 10 <sup>9</sup> | 31.7    | 3891                     | 66    | 194  |

由表 2 可知, 整个纯化工艺只需 4 步, 便可达到 SOD 比活 3891u /mg, SOD 总收率为 66%。

### 3 讨论

利用异丙醇浸泡酵母选择性释放 SOD, 其释放率达 89%, 纯化 20 倍以上。醇类溶剂处理法和传统的细胞破碎法(如机械法及超声波法)相比, 具有以下优点: ① 不需要任何复杂设备, 如冷却或高压设备; ② 菌体分离容易, 由于其没有整体破碎细胞; 在 3000 r /min 下离心后上清液浊度(600nm 比色)比机械法破碎的上清液浊度低 2 倍; ③ 可以选择性释放, 达到纯化目标蛋白; ④ 成本较低, 浸泡菌体所用的异丙醇可以再用一次, 当循环使用二次后, 用过的异丙醇可回收再次使用。利用 pH 调节显著提高丙酮除去杂蛋白和纯化 SOD 的效率。新纯化工艺步骤少, 操作简单, SOD 总收率为 66%, 比活达 3891u /mg。

## 参 考 文 献

- [1] 阎家麒, 朱建梅, 佳兴芬, 等. 中国医药工业杂志, 1992, 23(11): 481 ~ 483.
- [2] Mosanki T, Kazuhiro H. *Biotechnol Bioeng*. 1992, 39: 869 ~ 890.
- [3] Miyata K. Jap Pat, 1983, JP 589686 A.
- [4] Bianchi I. Eur Pat, 1984, EP 112 2990 A2.
- [5] Grunow M, Schopp W. *J Chromatography*, 1992, 590: 247 ~ 253.
- [6] 张博润, 黄 英, 田宇清, 等. 微生物学通报, 1994, 21(4): 210 ~ 213.
- [7] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 医药工业, 1988, 19(5): 217 ~ 219.
- [8] Bradford M. *Anal Biochemistry*, 1976, 72: 248 ~ 255.
- [9] 张博润, 谭华荣. 微生物学通报, 1992, 19(6): 352 ~ 357.

## PURIFICATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Tan Tianwei Ma Rongyu Yang Yuanzhong

(Department of Biochemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

Zhang Borun

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** A new and simple process to purify superoxide dismutase (SOD) from *S. cerevisiae* was studied. The SOD was released selectively by treatment of cells using isopropanol. The phosphate buffer extract containing the released SOD was concentrated with PAN hollow fiber ultrafiltration. The SOD was purified by a two-step acetone precipitation. The new process was simple and the cost of the process was inexpensive in compare with traditional procedures. The recovery and the specific activity of SOD was 66% and 3891u /mg, respectively.

**Key words** Superoxide dismutase, *Saccharomyces cerevisiae*, Purification