

一株耐高温 SOD 产生菌的筛选及酶学特性

王忠彦 黄英 胡永松 胡佩*

(四川大学生物工程系 成都 610064)

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase 简称 SOD)是生物体防御氧化损伤的金属酶。具有治疗炎症、抗辐射损伤、抗癌、抗衰老等广泛药用前景^[1]。另外在植物抗逆和生物固氮等方面也有重要作用^[2]。自 1969 年 McCord 和 Fridovich^[3]发现该酶以来,人们已从多种动植物和微生物中分离了此酶。SOD 的基因工程也取得了令人瞩目的成就^[4]。相对而言,动植物 Cu、Zn-SOD 的研究较活跃,而微生物 SOD,特别是 Fe-SOD 的研究较薄弱。本文报道耐高温 SOD 产生菌的筛选、鉴定结果,并对酶的稳定性和酶学特性作了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

本实验室保藏高温细菌 211-9、211-15、211-17、211-46、211-71、211-53、211-27 和 211-57 等十多株。

1.2 培养基^[5]

1.2.1 种子培养基: LB 培养基。

1.2.2 发酵培养基: 肉汤蛋白胨培养基。

1.2.3 生理生化反应培养基: 半固体肉汤蛋白胨培养基; 葡萄糖蛋白胨培养基(M.R, V.P 实验); 糖发酵培养基; 蛋白胨液体培养基; 淀粉水解培养基; 叠氮化钠葡萄糖肉汤培养基。

1.3 试剂

SOD(牛血), 为上海东风试剂厂产品; 溶菌酶, 链霉素硫酸盐为上海生化制品研究所产品; 邻苯三酚为国产分析纯; 蛋白酶 E 为美国 Sigma 公司产品。

1.4 H₂O₂抗性筛选

菌种培养至对数生长期加 H₂O₂至终浓度 0.1%~0.5%, 继续培养 2~3h, 取 0.1ml 直接涂平板计数。

1.5 菌种初步鉴定

主要采用 12 项生理生化特性与形态观察相结合的方法^[5,6]。

1.6 SOD 的提取

活化斜面菌种经二级种子培养后按 5% 接种至 2L 发酵罐, 55℃ 通气培养至稳定期, 放罐离心收集菌体。按 2ml / g 悬于磷酸钾缓冲液(0.05 mmol / L, pH7.8)中, 超声波破碎, 离心得上清液。室温下加入 2.5% 硫酸链霉素处理 30 min, 离心, 上清液经 50% 和 70% 硫酸铵分级沉淀, 将沉淀溶于少量 KAc 溶液中(2 mmol, pH5.5), 透析 2~3d 后得粗酶液^[7]。

* 四川师范大学进修教师。

本文于 1995 年 10 月 16 日收到。

1.7 SOD 活性测定

邻苯三酚法^[8]用终止剂改进^[9]。

1.8 蛋白质浓度的测定

参照 Bradford^[10]的方法。

2 结果和讨论

2.1 耐高温 SOD 产生菌的筛选

本实验室分离保藏的高温细菌 SOD 含量差异较大, 细胞生物量和耐温性能也有所不同。我们将所有菌株活化, 于 55℃ 液体培养, 选择生长良好的菌株进行 H_2O_2 抗性筛选。选得能抗 0.3% H_2O_2 的菌株三株, 即 211-9、211-17 和 211-15。摇瓶培养收集菌体超声波破碎后直接测上清液酶活。三株菌生物量相差不大, 但 SOD 含量不一。以 211-15 为最高, 且耐 H_2O_2 的能力也最强。这可以用菌体 SOD 含量越高越能抵抗过量的氧和 O_2 来解释。不少报道表明^[11, 12], SOD 缺陷的菌株一般不能在有 O_2 环境中生长。另外, 氧的应激与原核基因的表达调控有关^[13]。 H_2O_2 能刺激细菌中数种蛋白质的含量组成性升高。

挑取耐 0.4% H_2O_2 的 211-15 平板菌落, 摇瓶培养后测其细胞 SOD 含量, 发现酶活明显升高, 达 8774u / g 细胞, 比处理前提高约 12%。

取 SOD 含量为 8774u / g 细胞的上述 211 15 号单菌落, 作为筛选得到的耐高温 SOD 产生菌。

2.2 菌种鉴定

菌落为本白色, 不透明, 表面不规则皱折, 边沿呈裂叶状; 液体生长混浊, 静置成膜; 菌体为直杆或弯杆状, 宽 0.5~1 nm, 长 2~3 nm; 孢子次端生, 形状椭圆。该菌生长温度范围 20~70℃, 有运动性; 革兰氏反应阳性, M.R 反应阳性, V.P 反应和吲哚反应阴性, 能利用甘露醇和阿拉伯糖产酸而不能利用木糖产酸, 不能在 0.02% 叠氮化物和 7% NaCl 上生长, 能在 5% NaCl 上生长, 有过氧化氢酶没有苯丙氨酸脱氨酶; 能够水解淀粉。

根据各项指标的检测结果, 筛选得的 211-15 号菌株鉴定为嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)^[5, 6], 简称为: B.S 211-15。

2.3 菌体培养及 SOD 提取

2.3.1 菌体培养: 按方法所述接种 2L 罐后, 每隔 2h 取样测定 OD_{650} , 得生长曲线如图 1。该菌株进罐 6h 后进入稳定期, 持续 3h 左右, 10h 以后明显衰亡。稳定期生物量可达 6.0g / L 培养液。

在菌体培养过程中, 还发现该菌进入对数期后菌体变得易于絮凝, 取样静置片刻后该絮状物即沉于管底。镜检发现菌体生长成长丝状, 随着培养时间延长, 菌体丝状直径加粗, 有分枝, 稳定后期丝状逐渐断裂成长杆状, 衰亡期进一步断裂成较短杆状, 最后恢复短杆状形态并开始生芽孢 (图 2)。211-15 这种不寻常的生长型态, 使稳定期菌体极易沉降, 收集菌体方便。

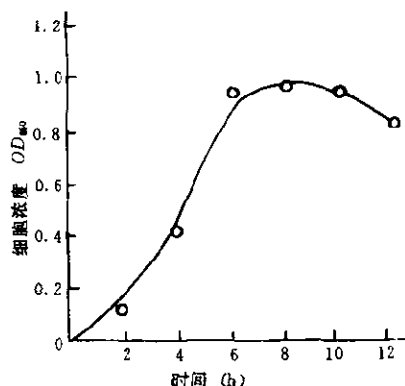


图 1 B.S211-15 的生长曲线

2.3.2 SOD 的提取: 收获稳定期 (8h) 新鲜细胞 10g, 悬浮于 20ml 缓冲液 (蔗糖 0.5mol, 氯化镁

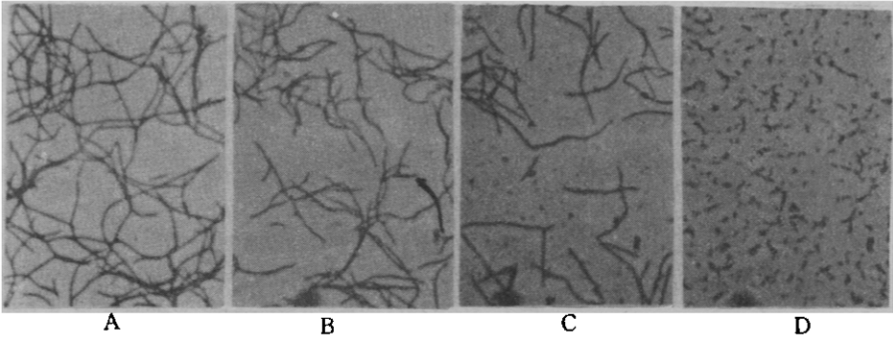


图2 B.S211-15的生长形态(放大 1000 倍)

A. 对数期; B. 稳定期; C. 衰亡期; D. 鉴定形态.

10mmol, pH7.5)中, 加溶菌酶(2mg / ml), 37℃温育 0.5~1h, 离心收集菌体后按方法中步骤提取 SOD, 结果见表 1. 提取结果每克菌体可得 6095u SOD, 比活性为 1793u / mg^[7].

表1 从10g B.S211-15中提取SOD结果

提取步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (u)	比活 (u/mg)	纯化倍数	收 率 (%)
超声波破碎	1274.7	88770	68.8	—	—
硫酸链霉素处理	1159.0	86028	74.2	1.1	98.1
50%硫酸铵沉淀	340.4	74545	219	3.2	85.0
75%硫酸铵沉淀	85.8	63124	736	10.7	72.0
透析	34.0	60951	1793	26.1	69.5

2.4 酶活特性

2.4.1 热稳定性: 提取酶液在 25℃~85℃温度范围内保温 15 min 后立即置于冰浴, 测残存 SOD 活力. 结果(图 3-A)表明温度低于 75℃酶活稳定, 85℃加热 15 min 仍保持 44% 的活性. 在 75℃保温不同时间, 测残存酶活, 结果如图 3-B, 75℃时该酶的半衰期为 27 min. 说明嗜热脂肪芽孢杆菌 B.S 211-15 所产生的 SOD 具有很好的热稳定性, 比报道的其它细菌高^[14].

2.4.2 耐酸碱性: 用巴比妥广泛缓冲液与酶液等量混合后(对照用测酶活的缓冲液等量混合), 25℃保

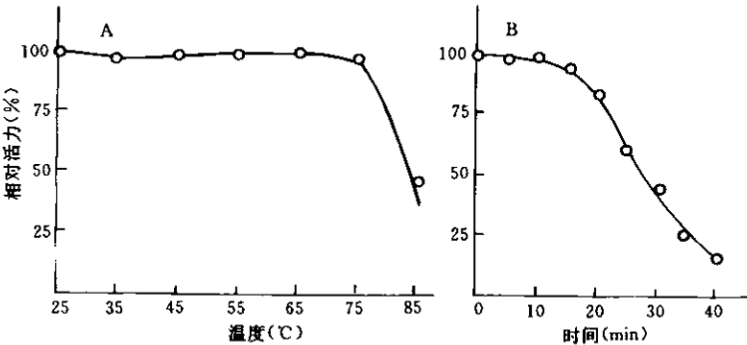


图3 温度对 SOD活性的影响

温 30 min, 测定酶活结果见图 4-A。在 pH4~10 的范围内酶活没有下降, 而且在 pH5~7 时, 酶活还高于对照。

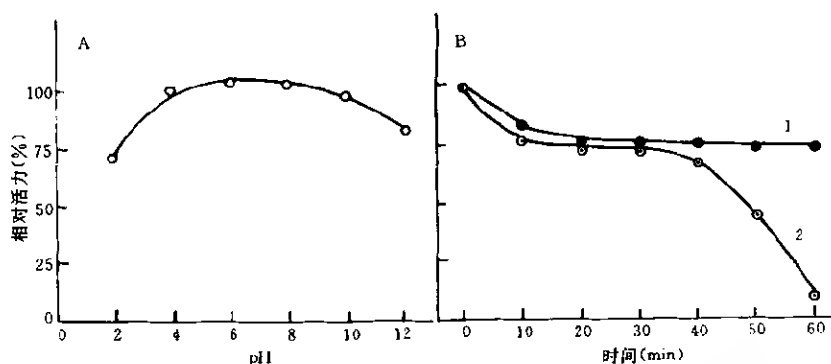


图4 pH(A)和蛋白酶(B)对酶活性的影响

1. 蛋白酶E 0.1mg/ml; 2. 蛋白酶E 1.0mg/ml.

2.4.3 对蛋白酶的耐受性: 酶液中加入蛋白酶E至终浓度 0.1 mg / ml 和 1 mg / ml, 37℃ 保温 0~60 min, 置冰浴, 测残存酶活, 得如图 4-B 曲线。蛋白酶E对 B.S 211-15 的 SOD 虽有明显的破坏作用, 但其作用并不因时间延长而迅速增加, 在 0.1 mg / ml 的蛋白酶E中, SOD 活力 1 小时内仍保存 75%, 当蛋白酶浓度为 1 mg / ml 时, SOD 活力在 35 min 内仍能保存 75%。

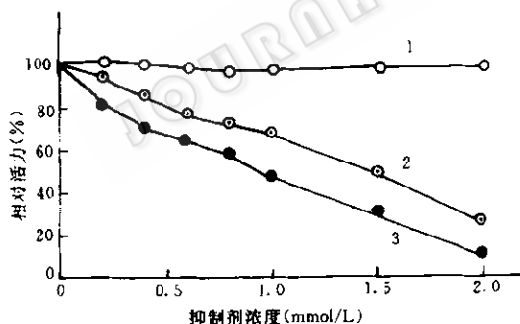


图5 抑制剂对酶活性的影响

1. KCN; 2. H₂O₂; 3. SDS.

2.4.4 抑制剂对酶活力的影响: 于测酶活缓冲液中分别加抑制剂 SDS、KCN 和 H₂O₂ 至终浓度 0~2 mmol, 测得三种抑制剂对酶活力的抑制效果如图 5。KCN 对酶活力无抑制作用。SDS、H₂O₂ 对酶活有明显的抑制作用。在 1 mmol 浓度时抑制效率分别为 52% 和 37%。Cu、Zn-SOD 受 KCN 和 H₂O₂ 抑制, 但不受 SDS 影响; Mn-SOD 与之相反; Fe-SOD 受 SDS 和 H₂O₂ 抑制, 但不受 KCN 影响^[1]。由此认为 B.S 211-15 的 SOD 为 Fe-SOD。

2.4.5 存放稳定性: 酶液分别在室温和 4℃ 贮存, 每周测活力一次, 两个月内酶活力都较稳定, 前一个月酶活还稍有上升。4℃ 的贮存效果比室温稍好。初步表明该酶是耐存放的。此项实验仍在继续进行。

综上所述, 本文筛选得到的 B.S 211-15 是一株产生 SOD 的优良菌株, 其产生的 Fe-SOD 具有多项稳定性。

参 考 文 献

- [1] 袁勤生, 王志友, 翁清清, 等. 中国药理学杂志, 1989, 24(7): 387~395.
- [2] Pappo A, Rigand J. *FEBS Letters*, 1986, 21: 187~189, 201.

- [3] McCord J M, Fridovich I. *J Biol chem*, 1969, **244**: 6049.
- [4] Brehm J K *et al.* *APPI Microbiol Biotechnol*, 1991, **36**: 358~363.
- [5] 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [6] 布坎南 R E, 吉本斯 N E, 等 (中国科学院微生物研究所译). 伯杰细菌鉴定手册(第八版). 北京: 科学出版社, 1984. 733~744.
- [7] 方允中, 李文杰. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989. 71~108.
- [8] 邓碧玉, 袁晴生, 李文杰, 等. 生物化学与生物物理进展, 1991, **18**(2): 163.
- [9] 静天玉, 赵晓瑜. 生物化学与生物物理进展, 1995, **22**(1): 84~86.
- [10] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248.
- [11] Chris B C. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**: 1539~1546.
- [12] Olivia B M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 4789~4793.
- [13] 陈 媛, 周 玫. 生命的化学, 1994, **14**(6): 3~5.
- [14] Lumsden J *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 1976, **438**: 380.

SCREENING OF THERMOPHILIC SUPEROXIDE DISMUTASE PRODUCING STRAIN AND SOME PROPERTIES OF THE ENZYME

Wang Zhongyan Huang Ying Hu Yongsong Hu Pei

(Department of Biotechnology, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract A thermophilic SOD producing strain was obtained from the bacteria preserved in our lab. Its content of SOD was 8774u / g fresh cells. The strain can tolerate 0.4% H_2O_2 and 70°C, and it has outstanding culture characteristics. It was identified as *Bacillus stearothermophilus*, called B.S 211-15. Crude SOD was extracted from B.S 211-15, the recovery of total activity was 69.5%, the specific activity was 1793u / mg protein. The enzyme showed fine heat stability, pH stability and good proteinase resistance. The SOD activity didn't decrease after being kept in room temperature for 2 months. The results of inhibition reactions indicated that this enzyme was Fe-SOD.

Key words Thermophilic bacteria, Superoxide dismutase (SOD), Screening, Identification