第35卷 第1期
1996年 1月

中山大学学报(自然科学版)
ACTA SCIENTIARUM NATURALIUM
UNIVERSITATIS SUNYATSENI

Vol. 35 No. 1
Jan. 1996

酵母超氧化物歧化酶的研究

程明哲 周桢林 李 扬 石英扬

(中山大学生物化学系,广州 510275)

摘 要 从味精厂发酵废液培养的酵母中分离纯化超氧化物歧化酶(SOD)纯化倍数达100倍,比活11150 u/mg蛋白,电泳纯,回收率达80%;每公斤湿酵母菌体产超氧化物歧化酶酶活力达50万单位.此酶分子量为37200,等电点为5.6.

关键词 超氧化物歧化酶,羧甲基纤维素,连苯三酚自氧化

分类号 Q 55

超氧化物歧化物(简称SOD)广泛存在于需氧生物体内,催化超氧化物阴离子自由基($O_2^-\cdot$)或其质子化产物$OH_2\cdot$歧化为H_2O_2与O_2的极为重要的抗氧化酶.自1969年McCord和Fridovich[1]首次从牛的红细胞中发现并提取SOD以来,人们已建立了一整套的分离分析方法,对SOD的性质、应用及作用机理进行了一系列的研究,发现SOD是人体代谢所产生的有害物质超氧阴离子自由基的天然清洁剂,有抗炎、抗辐射、抗肿瘤和抗衰老的作用.对SOD的研究已成为当前一个极重要的课题.

SOD按金属辅基成份不同可分三类,第一类含Cu和Zn(简称Cu,Zn—SOD)主要存在于真核细胞的细胞浆中;第二类含Mn(Mn—SOD),存在于真核细胞的线粒体和原生细胞中;第三类含Fe(Fe—SOD),只存在原核细胞内.

SOD一般都从牛或猪红细胞中提取,鉴于动物血的来源困难,因此,我们进行了从酵母细胞中分离纯化SOD的研究,筛选了能在味精厂发酵废液中生长的高产SOD的酵母菌株,并建立了一个较简单的、低成本的可适用于扩大生产需要的SOD生产工艺,可解决发酵工厂的废液的环境污染问题,同时还能得到一系列的重要生化产品.国内外有关从微生物细胞提取SOD的生产工艺较复杂,成本高,也不适于扩大生产的需要[2].下面报导酵母SOD的分离纯化及某些性质的研究结果.

1 材料与方法

1.1 材料 发酵厂发酵废液:来自广州味精厂(pH 2~3);酵母菌株:假丝酵母I号为本实验室筛选.

1.2 试剂 CM—纤维素(CM_{32}):Whatman产品;其他试剂为国产分析纯或化学纯试剂.

收稿日期:1994-07-02 程明哲,男,59岁,副教授

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cn

1.3　方法

(1)SOD 酶活力测定. 连苯三酚自氧化法[3].

(2)蛋白质浓度测定. 考马斯亮蓝 G_{250} 比色法[4].

(3)凝胶电泳[5]. ①聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳. 胶浓度 7.5%,pH 8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液. ②SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳测酶蛋白的分子量. 胶浓度 10%,电极缓冲液为 0.1%SDS—0.1 mol/L,pH 7.2 磷酸缓冲液. 标准蛋白的分子量为:TMV 外壳蛋白(17500),碳酸酐酶(30000),肌动蛋白(43000),牛血清白蛋白(67000),磷酸化酶 B(94000). ③凝胶等电聚焦电泳测酶蛋白的等电点,胶浓度 10%,Ampholine pH 3～10,正极为 0.4% H_2SO_4,负极为 0.2 mol/L NaOH.

(4)酵母菌的培养. 味精厂发酵废液煮沸过滤,加入活化的菌种,30～32℃,振荡速率 180～200 次/min,培养 24 h,然后将种子瓶扩大 5 倍,按以上培养条件培养 36h.

(5)SOD 的分离纯化. ①酵母菌体的破壁. 离心收集酵母菌体,无离子水洗涤一次,用超声波或某些有机溶剂处理使其自溶破壁,离心得粗酶液. ②调 pH 除杂蛋白. 将粗酶液用醋酸调 pH 4.8,冰冷放置 2 h,离心除沉淀,得 SOD 酶液. ③丙酮沉淀及透析. 酶液在冷却下慢慢加入 1.5 倍体积的冷丙酮,离心得粗酶沉淀,吹干丙酮,沉淀溶于 pH 4.8 的 25 mmol/L 的醋酸缓冲液中,缓冲液在冰箱中透析过夜,离心得上清液. ④羧甲基纤维素柱层析. 羧甲基纤维素用 pH4.8 的 25 mmol/L 醋酸缓冲液平衡装柱,以上酶液上柱,用同样缓冲液洗涤至 OD_{280nm} 极低为止,然后用 pH 5.8 的一定浓度的洗脱缓冲液洗脱,控制流速,收集具高活性的 SOD 酶液.

2　结果与讨论

2.1　SOD 的分离纯化　酵母 SOD 经破壁、沉淀及上柱纯化过程总结如表 1.

表 1　酵母超氧化物歧化酶的纯化

Tab. 1 Purification of Superoxide Dismutase from yeast

步　骤	总活力/u	总蛋白/mg	比活/u·mg^{-1}	纯化倍数	回收率/(%)
菌体破壁	192640	1727.7	111.5	1	100
调 pH 后的上清液	179160	765.0	234.2	2.1	93
丙酮沉淀及透析	167640	181.1	925.5	8.3	87
CM—纤维素柱层析	154110	13.80	11150	100	80

从表 1 可看出,经几步纯化可得到高纯度的 SOD,比活达 11150 u/mg 蛋白,纯化 100 倍,回收率也相当高,达 80%. 上柱洗脱液的酶活相当集中. 将此洗脱酶液冷冻干燥,即得高纯度的 SOD 产品.

本提纯方法简单,上柱洗脱不需采用梯度洗脱而能得到酶活集中的高纯度产品,对扩大生产提供了极有利的条件.

2.2　SOD 的某些性质

(1)SOD 的紫外吸收峰. 纯化的酵母 SOD 溶液测得在 270 nm 处有一个吸收高峰. 据

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cn

文献报导,不同来源的 Cu,Zn—SOD 的最大紫外吸收峰为 258～269 nm,而 Mn－SOD 为 280 nm. 从图 1 的凝胶电泳图上看到,除了主要区带 Cu,Zn—SOD 外,另有一条很淡的区带,可能为微量的 Mn－SOD. 因此,测得的紫外吸收峰的波长稍高.

(2)凝胶电泳. 如图 1 所示,以聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定酶蛋白的纯度及其性质. 结果显示,纯化的酵母 SOD 在凝胶柱上显示清晰的一条主要区带,另外还有一条极淡的区带(A),可能是从酵母线粒体上释放出来的微量 Mn－SOD,待进一步证实.

B 为 SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱,以 5 种标准蛋白作对照(B_a),测得酵母 SOD 的亚基分子量为 18600,酵母 SOD 含两个相同的亚基,分离提纯的 SOD 分子量为 37200,与文献报导接近[6].

C 为酵母 SOD 的聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳,测得其等电点为 5.6,其中另有一条极淡的区带,可能为酵母的 Mn－SOD,测得等电点为 5.9.

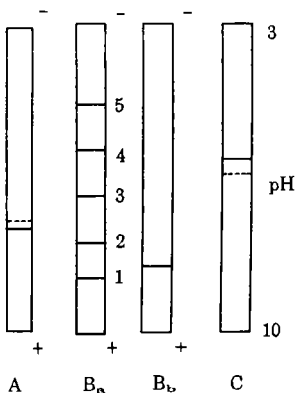

图 1 SOD 的凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoreses of superoxide dismutase

A 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳;
B SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳
B_a 标准蛋白;
B_b 酵母 Cu,Zn－SOD;
C 凝胶等电聚焦电泳(pH 3～10)

(3)酵母 SOD 对热的稳定性. 将纯化的 SOD 溶液分别在 50,55,60,70℃温度下保温 5 min,放置至室温,测得相对酶活力为 100%,82%,46%,0. 可见随温度上升,SOD 酶活力丧失增加,至 70℃时,酶活完全丧失,酵母 SOD 的耐热性不强.

(4)酵母 SOD 的稳定剂. 将纯化的 SOD 溶液加入不同的稳定剂,在 55℃下(水为室温)作用 5 min,放置室温,测酶活力,结果如表 2. 所用的各种稳定剂都有一定的作用,如果将几种稳定剂按一定比例混合,能使酶活不丧失,值得进一步研究.

表 2 SOD 的稳定剂

Tab. 2 Stabilizer of Superoxide Dismutase

稳定剂	水	NaCl	蔗糖	磷酸盐	甘露醇	乙醇	混合试剂
相对酶活力/(%)	100	66.7	75	86.6	62	72.4	100

(5)酵母 SOD 的抑制作用.

从表 3 可看出,H_2O_2 及 KCN 对酵母 SOD 有明显的抑制作用,证明我们所分离纯化的酵母 SOD 为 Cu,Zn－SOD,因为其他两种类型的 SOD(Mn－SOD 及 Fe－SOD)都对 KCN 不敏感,而 Fe－SOD 虽然对 H_2O_2 敏感,但它不存在于酵母细胞中.

表 3 SOD 的抑制剂

Tab. 3 Inhibitors of superoxide dismutase

抑制剂	H_2O_2	KCN	水
相对酶活/(%)	45.8	66.4	100

3 结 语

(1)本文所提出的分离纯化酵母 SOD 的工艺流程,方法简单,不需梯度洗脱,且酶活

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cn

也相当集中,可用于生产上的需要.

(2)用发酵厂的发酵废水培养酵母菌,不需再加进其他营养物质,因而大大降低成本,同时也解决环境污染问题.

(3)本法也适用于啤酒厂的废酵母泥的酵母 SOD 的分离纯化,但对废酵母泥需进行预处理.

(4)在本工艺流程中,还能得到某些重要的生化产品,如酵母谷胱甘肽,核酸,精蛋白及饲料等.

参 考 文 献

1 McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase. J Biol Chem, 1969. 244:6094

2 高卜渝.酵母超氧化物歧化酶的初步研究.生化药物杂志,1988,2:32～34

3 谢卫华.连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进.医药工业,1988,19:5,217

4 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. Anal Biochem, 1976, 72:248～254

5 张龙翔.生化实验方法和技术.北京:人民教育出版社,1982,94～118

6 Stephen A G. The purification and properties of superoxide dismutase from saccharomyces cerevisive. Biochem Biophys Acta, 1972, 289:276～283

Studies of Superoxide Dismutase from Yeast

Cheng Mingzhe *　*Zhou Zhenlin*　*Li Yang*　*Shi Yingyang*

Abstract Superoxide dismutase from yeast was purification and characterized. The enzyme was purified to 100 fold by extraction, percipitation with actone and CM－Cellulose Column chromatography. Specific activity was 11150u/mg protein, electrophoretic purity, recovery was 80%. One kg of yeast cells posseses a total activity of superoxide Dismutase 500000 units. Its molecular weight was 37200, isoelectric point was 5. 6. The method is well suited for scale preperations.

Keywords superoxide dismutase, CM - Cellulose, autoxidation of pyrogallol

* Department of Biochemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cn