

有机溶剂二次沉淀法提取纯化酵母菌 超氧化物歧化酶的研究

杨明琰^{1,2}, 张晓琦², 沈 俭², 郭爱莲¹

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 陕西省微生物研究所, 陕西 西安 710043)

摘 要: 酿酒酵母 BUV094 经发酵培养后, 离心收集菌体, 将菌体用甲苯法破壁得到粗酶液, 粗酶液经调节 pH 除杂蛋白, 丙酮二次沉淀三步纯化工艺, 得到纯化的 SOD, 其比活为 1015U/mg, 收率为 65.2%。PAGE 电泳后的活性染色显示, 酵母超氧化物歧化酶具四条同工酶。该样品经 KCN, H₂O₂, 氯仿-乙醇抑制试验, 酶类型为 Cu/ZnSOD。

关键词: 酿酒酵母(*S. Cerevisiae*); SOD; 丙酮二次沉淀; 提取; 纯化

Study on Extraction and Purification of Superoxide Dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* by Two-steps Organic Solvent Precipitation

YANG Ming-yan^{1,2}, ZHANG Xiao-qi², SHEN Jian², GUO Ai-lian¹

(1. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. Microbiology Institute of Shaanxi, Xi'an 710043, China)

Abstract: After fermentation, *S. cerevisiae* BUV094 was purified by three procedures consisting of pH regulation and two-steps acetone precipitation. The purified SOD enzymatic specific activity recovery was 1015U/mg and yield 65.2%. The PAGE activity stain showed that *S. cerevisiae* SOD had four isoenzymes. The types identification showed that it was a kind of Cu/Zn SOD.

Key words: *S. cerevisiae*; SOD; two-steps acetone precipitation; extraction; purification

中图分类号: TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0159-03

超氧化物歧化酶(EC1.15.1.1), 简称 SOD, 是广泛存在于生物体的一种十分重要的金属酶, 它可以催化超氧阴离子的歧化反应产生分子氧和过氧化氢。超氧阴离子与人类及动植物的许多疾病的形成和发生有关, SOD 作为一种专一性的氧自由基清除剂, 可以防御超氧阴离子的毒性, 对机体具有保护作用, 因此 SOD 在医药, 食品和化妆品添加剂等方面有着广阔的应用前景^[1]。目前 SOD 产品主要从动物血液中提取, 但容易受原料来源, 安全性及质量不稳定等因素的影响。80 年代后期, 美国和日本先后开发了用发酵法生产 SOD, 大大降低了生产成本^[2]。但发酵法生产 SOD 后提取工艺较为复杂。本文采用有机溶剂二次沉淀法对酵母菌 SOD 进行分离纯化, 实验结果具有很大的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 酿酒酵母 BUV094 由本所保藏菌种经原生质体诱变而来。

1.1.2 培养基及培养条件

斜面培养基: 葡萄糖 2%, 7°Be 麦芽汁 5%, 蛋白胨 2%, 酵母膏 1%, 琼脂 2%(保藏菌种用)。

种子及摇床培养基: 葡萄糖 2%, 7°Be 麦芽汁 5%, 蛋白胨 2%, 酵母膏 1%。

培养条件: 28℃ 斜面培养 14h, 接种于种子培养基, 于 28℃, 220r/min 培养 14~16h 后转接于摇床培养基发酵培养 22h。

1.1.3 试剂

丙烯酰胺, 甲叉丙烯酰胺, 过硫酸铵为 Bebcos 电泳级产品; TEMED 为 Sigma 分装; NBT 为 Bebcos 产品;

收稿日期: 2004-03-17

基金项目: 陕西省科学院科技攻关项目(2002k-09)

作者简介: 杨明琰(1968-), 助研, 硕士研究生, 研究方向为应用微生物。

其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 SOD 粗酶的制备

1.2.1.1 甲苯法^[3]

每克酵母湿细胞加入 0.8g 甲苯, 35℃ 破壁 45min, 以 pH7.8 磷酸缓冲液(含 0.1mmol/L EDTA)提取 5h, 4000r/min 离心 20min, 收集上清液, 即为 SOD 粗酶液。

1.2.1.2 异丙醇法^[4]

每克酵母湿细胞加入 9g 异丙醇, 浸泡 120min, 除去溶剂, 加入 3 倍体积。

1.2.1.3 乙醇-氯仿法^[5]

每克湿酵母细胞加入 4ml 0.1mol/L 的 NaHCO₃ 溶液, 加 3ml 乙醇-氯仿(5:3, V/V 溶液, 搅拌 2h, 4000r/min 离心 25min, 收集上清液即为粗酶液。

1.2.2 SOD 的纯化方法

发酵液经 3000r/min 离心 15min, 收集菌体, 用甲苯法破壁得粗酶液。粗酶液经 50℃ 预热 30min, 除去热不稳定性杂蛋白; 用 2mol/L HCl 调节 pH 至 5.0, 4000r/min 离心 15min, 除去沉淀杂蛋白; 上清液中加入 0.6 倍冷丙酮(丙酮一次沉淀), 搅拌均匀, 4000r/min 离心 20min, 除去沉淀杂蛋白; 上清液中继续加入 0.6 倍的冷丙酮(丙酮二次沉淀), 离心收集沉淀, 便可得到纯化的 SOD 产品。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及活性染色^[6]。

1.2.4 酶类型鉴定^[6]

将提纯的样品经 5mmol/L H₂O₂, 5mmol/L KCN, 氯仿-乙醇处理 30min 测活。

1.2.5 SOD 酶活测定^[7]

采用终止剂改进的邻苯三酚自氧化法, 标准 SOD 由长沙生化制药厂提供。

1.2.6 蛋白质含量测定^[8]

采用福林酚法, 标准蛋白质采用牛血清蛋白。

2 结果与讨论

2.1 不同破壁方法提取 SOD 的结果(见表 1)

表 1 不同破壁方式提取 SOD 的结果

Table 1 Result of different cell breaking methods on SOD extraction

破壁方法	甲苯法	氯仿-乙醇法	异丙醇法
酶活(U/ml 粗酶液)	159.12	131.26	125.28
酶活(U/g 湿菌体)	795.6	918.82	501.12

由表 1 可以看出, 氯仿-乙醇破壁其酶活较其它两种方法高, 但其粗酶液的 pH 较高, 不利于后续提纯,

因此选择甲苯法破壁。

2.2.1 丙酮一次沉淀对 SOD 的分离纯化的影响(结果见图 1)

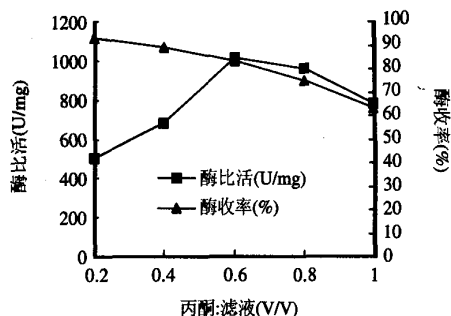


图 1 丙酮一次沉淀对 SOD 分离纯化的影响

Fig.1 Effect of the first step acetone precipitation on SOD purification

由图 1 可知, 加入 0.6 倍冷丙酮时, SOD 上清液的比活为 1026U/mg, 收率为 81.6%; 超过 0.6 倍冷丙酮时, SOD 的收率和比活均下降。

2.2.2 丙酮二次沉淀对 SOD 纯化的影响(见图 2)

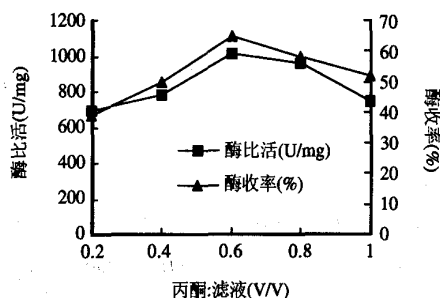


图 2 丙酮二次沉淀对 SOD 分离纯化的影响

Fig.2 Effects of the second step acetone precipitation on SOD purification

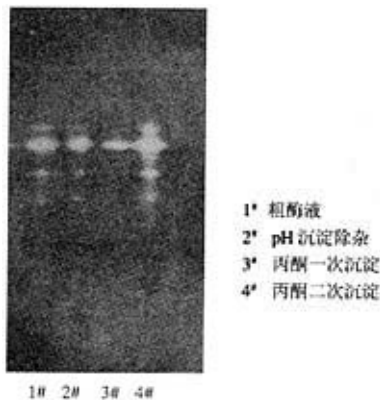


图 3 SOD 活性染色结果

Fig.3 Result of SOD activity dyeing

表2 SOD 分步纯化结果

分离步骤	总体积(ml)	总酶活(U)	总蛋白(mg)	比活(U/mg)	收率(%)	纯化倍数
粗酶	100	15408	291.26	52.9	100	1
调节 pH 沉淀	95	15254	97.2	157	99	2.97
丙酮一次沉淀	170	12573	12.25	1026	81.6	19.39
丙酮二次沉淀	12	10046	9.9	1015	65.2	19.18

由图2可知,继续加入0.6倍冷丙酮,沉淀SOD的比活和收率都达到最高。

2.2.3 SOD 分步纯化结果(见表2)

2.2.4 SOD 活性染色结果

分步纯化的SOD经活性染色,显示有4条谱带,说明酵母SOD具有4条同功酶。SOD活性染色非常敏感,4*因纯度较高,四条带有些花,界限不是很清楚,而3*是丙酮一次沉淀后的上清液,浓度较小,因此只显示出—条较清楚的带。

2.2.6 酶类型鉴定结果(见图4)

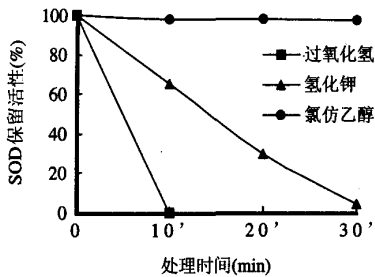


图4 酶类型鉴定结果

Fig.4 Result of types identification of SOD

由图4可知,样品SOD在H₂O₂作用下10min内急速失活,在KCN处理10min失活50%左右,氯仿-乙醇对该酶的活性基本无影响,因而鉴定该酶为Cu-ZnSOD。

2.3 讨论

2.3.1 酵母菌SOD为胞内酶,其破壁提酶的方式资料报导有超声波法,酶裂解法,细胞自溶法,甲苯法,乙醇-氯仿法和异丙醇法。超声波和酶解法虽然酶活较高,但对设备的要求和成本较高,自溶法酶活较低。

因而本文选择后三种方法进行破壁处理,综合实验结果,选择甲苯法作为破壁方法。

2.3.2 SOD发酵液中杂蛋白的等电点大约在pH5.0左右^[4],因此利用调节pH至5.0能显著提高二次沉淀法除杂和纯化SOD的效率。

2.3.3 丙酮分级沉淀宜在0℃左右进行,有利于保护酶的活性。

2.3.4 丙酮的残留可用2,4-二硝基苯肼法检测(显黄色沉淀),如有残留可透析或加热除去。

2.3.5 该工艺方法简单,成本较低,对设备要求低,具有较高的使用价值。

参考文献:

[1] 杨明琰,张晓琦,沈俭,等.微生物产超氧化物歧化酶的研究进展[J].微生物学杂志,2004,24(1): 49-51.
[2] Mosanlki T, kazuhiro H. Biotechnol Bioeng, 1992, 39: 869-890.
[3] 冯清平,张晓君.酵母菌中超氧化物歧化酶的研究[J].微生物学报,1995,35(4): 280-286.
[4] 谭天伟,马润宇,杨元忠,等.从酵母菌中提取纯化超氧化物歧化酶[J].微生物学报,1997,37(1): 68-71.
[5] 张博润,黄英,田宇清,等.酵母超氧化物歧化酶高产菌的选育[J].微生物学报,1994,34(4): 279-284.
[6] 罗广华,王爱国,付爱根.鉴别超氧化物歧化酶类型的定位染色法[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(4): 356-359.
[7] 静天玉,赵晓瑜.用终止剂改进超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法[J].生物化学与生物物理进展,1995,22(1): 84-86.
[8] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1983. 165-166.

信息

墨西哥发现酵母可延长苹果保质期

墨西哥科学家发现一种酵母,它能够抑制导致腐烂的细菌在苹果皮上生长,从而延长苹果的保质期。据悉新采摘的苹果面临的主要威胁来自青霉属苹果菌素,它可导致苹果腐烂,墨西哥科雷塔罗自治大学的科学家新发现一种酵母,可替代化学药品,控制细菌在苹果皮上繁殖,据从事这项研究的科学家桑切斯介绍,苹果只需在含有此类酵母的水中浸泡即可延长其保质期。科学家指出,这一发现可使苹果的冷藏中的损失减少80%。在冷藏过程中,通常每10个苹果中有3个会烂掉。