

酵母SOD高产菌的选育及发酵条件的研究

周建琴 (江苏食品职业技术学院生物工程系, 江苏淮安223003)

摘要 利用25株酵母进行产SOD的筛选, 得到1株高产SOD菌株, 并通过单因素试验确定其适宜的培养基组成、pH值、发酵时间等条件。结果表明, 最适宜的碳源为麦芽糖; 氮源为蛋白胨; 碳氮比为6:1, 发酵时间为18 h, pH值为5.0。

关键词 超氧化物歧化酶; 酵母菌; 发酵条件

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)31-13494-02

Study on the Breeding and Fermentation Conditions of SOD High-producing Strain from Yeasts

ZHOU Jian qin (Department of Bioengineering, Jiangsu Food Science College, Huai'an, Jiangsu 223003)

Abstract Through screening SOD producing strains from 25 strains of yeasts, one SOD high producing strain was obtained. In single factor test, the suitable medium composition, pH value and fermentation time and so on were confirmed. The results showed that the optimum carbon source was maltose, the optimum nitrogen source was peptone, the optimum ratio of carbon to nitrogen was 6:1, the optimum fermentation time was 18 h and the optimum pH value was 5.0.

Key words Superoxide dismutase; Yeast; Fermentation conditions

超氧化物歧化酶(EC 1.15.1.1, Superoxide dismutase, SOD) 是一种广泛存在于好氧生物细胞内、专一性催化生物体内超氧阴离子自由基歧化反应生成过氧化氢和氧气的金属酶类^[1]。研究表明, SOD 主要应用于临床和日用化工方面, 发展潜力很大, 有广阔的应用前景^[2]。从微生物中提取SOD有很多优点, 因此很快被人们所接受。笔者从盛产酵母的葡萄园泥土中筛选出1株高产SOD活力的菌株, 并对其生长和发酵产酶条件进行研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种。葡萄园地筛选、分离、纯化获取酵母。

1.1.2 试剂。磷酸氢二钾、盐酸、邻苯三酚、磷酸二氢钾均为分析纯, 葡萄糖(中国医药(集团)上海化学试剂公司), 麦芽糖、果糖、琼脂、蛋白胨(国药集团化学试剂有限公司), 硫酸铵(南京化学试剂一厂)。

1.1.3 培养基。YEPD培养基: 酵母粉10.0 g, 蛋白胨20.0 g, 葡萄糖20.0 g, 琼脂20.0 g, 水1 000 ml; YEPD液体培养基: 酵母粉10.0 g, 蛋白胨20.0 g, 葡萄糖20.0 g, 水1 000 ml; 发酵培养基: 酵母粉5.0 g, 蛋白胨10.0 g, 葡萄糖40.0 g, ZnSO₄·7H₂O 0.5 g, CuSO₄·5H₂O 0.2 g, 水1 000 ml。

1.1.4 仪器。电热恒温培养箱; 立式压力蒸汽灭菌器; 低速离心机; UV-754型紫外可见分光光度计; 电子恒温水浴锅; 电子分析天平; 电热鼓风干燥箱。

1.2 方 法

1.2.1 高产SOD酵母的选育^[3]。在葡萄园地采集泥土样品, 取少量泥用无菌水进行溶解得泥土稀释液。取1 ml 稀释液均匀涂布在固体选择培养基上, 25℃ 培养2 d。挑取单菌落在固体分离纯化培养基中划线分离, 然后将培养皿中的单菌落转接到试管斜面中做为酵母菌菌种。取各菌株以相同量接种于YEPD液体培养基试管中(装样量5 ml), 28℃ 培养箱中静置24 h。再将装有增殖菌株的各试管内液体倒入装有60 ml 发酵培养基的三角瓶中, 用纱布封口, 30℃ 摇床培养15 h。测定各菌株的生物量和SOD酶活力。

1.2.2 生物量的测定^[4]。取发酵液在低速离心机中以3 000 r/min 离心10 min, 去除上清液, 加入2 ml 蒸馏水, 用玻璃棒搅拌, 使菌体充分溶解, 用医用注射器将该溶液转入10 ml 离心管中, 在高速离心机中以5 000 r/min 离心10 min, 去除上清液, 再洗涤1次, 在高速离心机中以5 000 r/min 离心10 min, 去除上清液。收集各种菌种细胞, 并称菌株菌体湿重。

1.2.3 SOD的提取。取1.0 g 湿菌体悬于3 ml 50 ml/L、pH值为8.3的磷酸缓冲液中, 用超声波破碎细胞, 于高速离心机中以6 000 r/min 离心15 min, 弃去沉淀, 取上清液, 得粗酶液用于酶活的测定。

1.2.4 SOD酶活的测定^[5-6]。采用邻苯三酚自氧化法测定SOD酶活。通过测定邻苯三酚的自氧化反应速度(OD_A)和SOD抑制下的邻苯三酚自氧化速度(OD_B), 便可计算出SOD酶活力。邻苯三酚自氧化反应速度测定。将紫外可见分光光度计波长调为420 nm, 预热30 min。按表1向试管中加入磷酸缓冲液、蒸馏水后摇匀, 25℃ 保温20 min, 加入邻苯三酚溶液后摇匀, 迅速倒入比色皿中放到分光光度计中进行吸光度测定, 出现第1个稳定数据时立即启动秒表计时, 每隔30 s 测定1次吸光值。SOD抑制下的邻苯三酚自氧化反应速度测定。方法与邻苯三酚自氧化反应速度的测定类似, 只是用0.1 ml SOD粗酶液代替0.1 ml 蒸馏水进行试验(表1), 在420 nm处每隔30 s 测定1次吸光值。

表1 测定SOD酶活的加样量

Table 1 Sample addition for the determination of SOD activity ml

处理 Treatment	磷酸缓冲液 Phosphate buffer	SOD粗酶液 Crude SOD	蒸馏水 Distilled water	邻苯三酚溶液 Pyrogallol solution	总体积 Total volume
1	4.5	-	4.2	0.3	9.0
2	4.5	0.1	4.1	0.3	9.0

在一定条件下, 1 ml 反应液中抑制邻苯三酚自氧化速度50%的酶量为1个酶活力单位。单位体积中的酶活(U/ml)计算公式:

$$\text{SOD酶活} = \frac{(\text{OD}_A - \text{OD}_B) / \text{OD}_A \times 100\%}{50\%} \times \text{反应液总体积} \times \frac{\text{酶样液稀释倍数}}{\text{酶样液体积}} \quad (1)$$

作者简介 周建琴(1974-), 女, 江苏靖江人, 硕士, 讲师, 从事生物工程方面的研究。

收稿日期 2008-08-19

$$\text{SOD 总量} = \text{SOD 酶活} \times \text{粗酶液总体积} \quad (2)$$

$$\text{SOD 酶比活力} = \text{SOD 总量} / \text{菌体湿重} \quad (3)$$

1.3 发酵条件

1.3.1 不同碳源对酵母菌株生物量及SOD影响。以蛋白胨及酵母膏为氮源,以葡萄糖、麦芽糖、可溶性淀粉、蔗糖为碳源。将各培养基进行分装,装液量为80/500(ml)三角瓶,按接种量5%接入液态种子后,25℃,220 r/min 摇床培养20 h。测定不同碳源下该酵母的生物量和SOD酶活力。每种碳源3次重复。

1.3.2 不同氮源对酵母 X8 菌株生物量及SOD影响。以葡萄糖为碳源,以硝酸铵、蛋白胨、草酸铵为氮源作培养基,将各培养基进行分装,装液量为80/500(ml)三角瓶装,按接种量5%接入液态种子,25℃,220 r/min 摇床培养20 h。测定不同氮源下该酵母的生物量和SOD酶活力。每种氮源3次重复。

1.3.3 不同碳氮比对酵母 X8 菌株生物量及SOD影响。以葡萄糖为碳源、蛋白胨和酵母浸出汁为氮源制作不同碳氮比(3:1,4:1,5:1,6:1,7:1,8:1)的液态培养基,将各培养基进行分装,方法同“1.2.2”。

1.3.4 pH值的确定。以试验选出的碳源、氮源及最佳的碳氮比配制发酵培养基,将培养基的pH值分别调为4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0进行试验。

1.3.5 发酵时间的确定。用试验优化结果配制发酵培养基,对菌种进行发酵,发酵时间分别控制为8、10、12、14、16、18、20、22、24 h。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的筛选 对从葡萄园泥中筛选得到的25株酵母进行试验,其中6株菌株酵母的生物量和SOD产量均较高(表2)。

表2 酵母菌种筛选结果

Table 2 The screening results of yeast strains

编号	生物量 g	SOD 总量 U	SOD 酶比活力 U/g
Serial number	Biomass	Total amount of SOD	SOD enzyme specific activity
X6	1.31	756.89	577.77
X8	1.55	968.56	624.87
X12	1.03	628.89	610.57
X13	1.08	421.32	390.11
X16	1.61	603.56	347.84
X21	1.35	653.28	483.91

由表2可知,在相同条件下各菌株的生物量和SOD均有差异。其中,X8菌株SOD总量最高,生物量及SOD酶比活力较高;X16菌株的生物量最大,但SOD总量及SOD酶比活力较低;X13菌株的生物量和SOD总量均较低,以SOD总量为主要因素,综合生物量、SOD酶比活力考虑,筛选出的X8为高产SOD酵母菌,再以X8为出发菌株进行发酵条件研究。

2.2 发酵条件的优化

2.2.1 碳源的确定。以不同碳源制作液态培养基,接种培养10 h后,分别测定酵母X8菌株的生物量、SOD总量和酶比活力(表3)。

由表3可知,以蔗糖为碳源时,X8菌株生物量最大;该X8菌株利用淀粉能力较差,生物量最小。以麦芽糖为碳源

时SOD总量和酶比活力均是最高,经比较,选择麦芽糖为该菌株产SOD的最佳碳源。

表3 碳源对酵母 X8 菌株生物量和SOD影响

Table 3 Effects of carbon sources on the biomass and SOD of strain X8 from yeasts

碳源	生物量 g	SOD 总量 U	SOD 酶比活力 U/g
Carbon sources	Biomass	Total amount of SOD	SOD enzyme specific activity
蔗糖 Sucrose	2.08	690.45	331.95
淀粉 Starch	1.09	1210.23	1110.30
葡萄糖 Glucose	1.88	1130.23	601.19
麦芽糖 Maltose	1.27	1658.54	1305.94

2.2.2 氮源的确定。由表4可知,以蛋白胨为氮源的生物量、SOD总量和酶比活力均为最高,因此,选蛋白胨为最佳氮源。

表4 氮源对酵母 X8 菌株生物量和SOD影响

Table 4 Effects of nitrogen sources on the biomass and SOD of strain X8 from yeasts

氮源	生物量 g	SOD 总量 U	SOD 酶比活力 U/g
Nitrogen sources	Biomass	Total amount of SOD	SOD enzyme specific activity
蛋白胨 Peptone	1.22	435.56	357.01
硝酸铵 Ammonium nitrate	0.88	304.55	346.06
草酸铵 Ammonium oxalate	1.05	358.66	341.58

2.2.3 碳氮比的确定。由表5可知,在碳氮比为6:1时,该酵母的SOD最高,无论是SOD总量还是SOD酶比活力都达到最大值,虽然在碳氮比为4:1时该酵母的生物量最大,但SOD较低。以SOD总量为主要因素,综合生物量、SOD酶比活力比较,确定该酵母X8菌株产SOD的适宜碳氮比为6:1。

2.2.4 pH值的确定。由表6可知,pH值对酵母发酵的生物

表5 碳氮比对酵母 X8 菌株生物量和SOD影响

Table 5 Effects of the ratio of carbon to nitrogen on the biomass and SOD of strain X8 from yeasts

C/N	生物量 g	SOD 总量 U	SOD 酶比活力 U/g
C/N	Biomass	Total amount of SOD	SOD enzyme specific activity
3:1	1.22	435.56	358.69
4:1	1.37	435.58	318.31
5:1	1.25	450.89	360.71
6:1	1.30	556.45	428.04
7:1	1.20	468.44	390.37
8:1	1.19	438.35	368.37

表6 pH值对酵母发酵的生物量和SOD产量的影响

Table 6 Effects of pH value on the biomass and SOD yield of yeast fermentation

pH值	生物量 g	SOD 总量 U	SOD 酶比活力 U/g
pH value	Biomass	Total amount of SOD	SOD enzyme specific activity
4.0	1.85	1602.33	866.12
4.5	1.80	1586.45	881.36
5.0	1.95	1758.56	901.82
5.5	1.78	1554.65	873.39
6.0	1.71	1450.21	848.07
6.5	1.68	1140.22	678.70
7.0	1.66	1032.21	621.81

4 结语

目前,对于包涵体的形成和复性过程中发生聚集的机制尚不清楚,许多已建立的高效复性方法是在反复试验和优化的基础上建立的,且没有普遍性。但是,从大量个例中发现了一些规律,如聚集的发生是由链间的疏水相互作用介导、聚集,具有相对特异性、折叠中间体可能具有不同的作用等,并利用这些经验建立了一些重组蛋白质高效复性的方法,但如何将其迅速转变成生产力是一个亟待解决的问题。随着结构生物学、生物信息学、蛋白质工程学及相关新技术、新设备的发展和日臻完善,在不久的将来,预测和设计最佳复性方案将成为可能。这必将为科研、医疗和工业生产中重组蛋白的复性提供高效的手段和有效的途径。

参考文献

- [1] 万雪,王磊,宁官保.包涵体及其复性研究概况[J].畜牧兽医科技信息,2005(2):13-15.
- [2] HSCHER L,GERARD M,CHALUT C,et al. Cloning of the 62-kilodalton component of basic transcription factor BTF2[J]. Science,1992,257:1392-1395.
- [3] 吉清,何凤田.包涵体复性的研究进展[J].国外医学临床生物化学与检验学,2004,25(6):516-518.
- [4] GONG P S,LUO G M. Recent progress in renaturation of inclusion body[J]. China Biotechnology,2003,23(12):73-78.
- [5] HOFFMANN F,VAN DEN HEUVEL J,ZIDEK N. Miniaturizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale[J]. Enzyme Microb Technol,2004,34:235-241.
- [6] CARRIO M M,VILLAVARDE A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies[J]. J Biotechnol,2002,96:3-12.
- [7] CARRIO M M,VILLAVARDE A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies[J]. Biotechnology,2002,9(6):1-17.
- [8] 罗惠霞,李敏,王玉炯.包涵体蛋白复性的几种方法[J].生物技术通报,2007(5):96-98.
- [9] MICHELLE K,CHOW M,ABDULLAHA,et al. The Refold database: A tool for the optimization of protein expression and refolding[J]. Nucleic Acids Research,2006,34:207-212.
- [10] 朱希强,袁勤生.重组人EGSOD包涵体的稀释复性及重折叠后蛋白的纯化[J].中国生物制品学杂志,2005,18(3):252-255.
- [11] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学技术出版社,2002.
- [12] SHI Y,JIANG C,CHEN Q,et al. One-step on column affinity refolding purification and functional analysis of recombinant human VDAC1[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,303(2):475-482.
- [13] SCHLEGL R,IBERER G,MACHOLD C,et al. Continuous matrix-assisted refolding of proteins[J]. Chromatogr A,2003,1009:119-132.
- [14] LIU HS,CHANG C K. Chaperon solvent plug to enhance protein refolding in size exclusion chromatography[J]. Enzyme Microb Technol,2003,33:424-429.
- [15] ALTAMIRANO M M,GARCIA C,POSSANI L D,et al. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cr5[J]. Nature Biotechnology,1999,17:187-191.
- [16] MELISSA SVOPE WILIS,JAMES K HOGAN,PRAKASH PRABHAKAR,et al. Investigation of protein refolding using a fractional factorial screen: A study of reagent effects and interactions[J]. Protein Science,2005,14:1818-1826.
- [17] SMITH V R,WALKER J E. Purification and refolding of recombinant bovine oxoglutarate/nalate carrier by immobilized metal-ion affinity chromatography[J]. Protein Expression and Purification,2003,29(2):209-216.
- [18] 田兴旺,张小华.分子伴侣与蛋白质折叠的研究进展[J].陕西师范大学继续教育学报,2006,23(4):115-117.
- [19] 杨晓仪,林键,吴文言.重组蛋白包涵体的复性研究[J].生命科学研究,2004,8(2):100-105.

(上接第13495页)

量影响不大,但对SOD活性的影响很大,当pH值为5.0时生物量SOD总量和酶比活力均最大,因此最适宜的发酵pH值为5.0。

2.2.5 发酵时间的确定。从图1、2可以看出,菌株培养

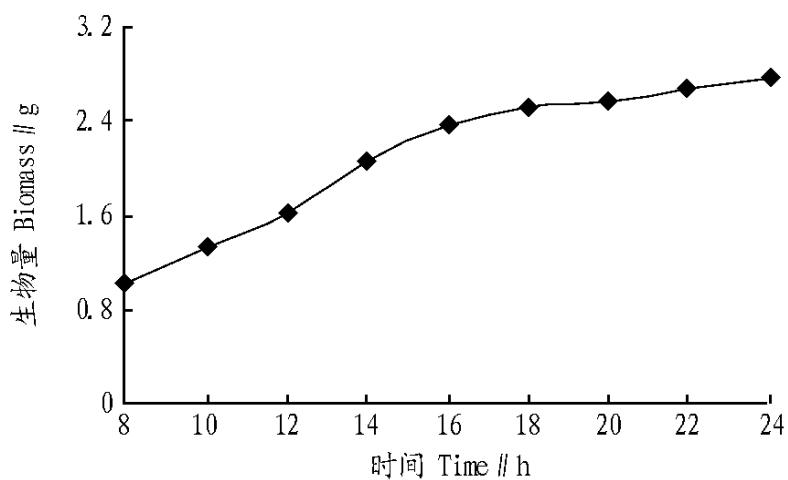


图1 X8菌株生长曲线

Fig.1 The growth curve of strain X8

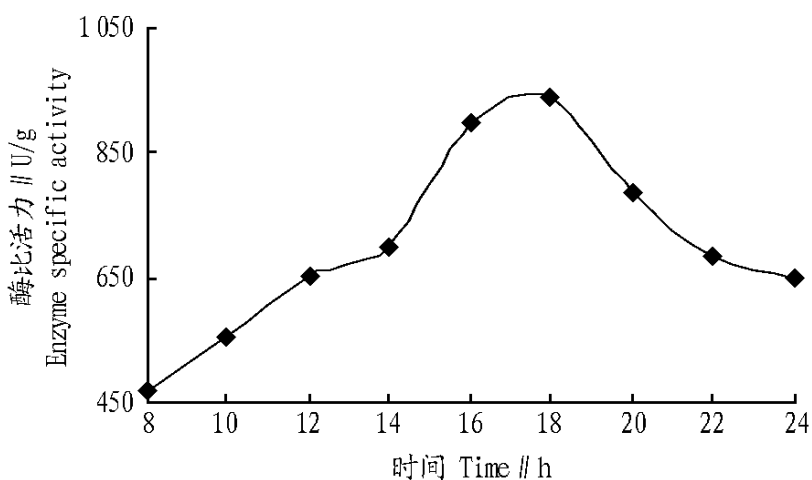


图2 发酵时间对X8菌株SOD的影响

Fig.2 Effects of fermentation time on SOD of strain X8

10 h后进入对数生长期,菌体内SOD酶比活力在对数生长期后期(约16~18 h)达到最高,此时进入对数生长末期,菌株生物量基本达到稳定,有增长,但很缓慢;SOD总量有增加但很缓慢,而SOD酶比活力在发酵18 h时达最大,随时间延长SOD酶比活力却在减少,表明SOD总量的增加是由于菌株的生物量缓慢增加所致,而不是SOD酶比活力在增加。以SOD总量为主要因素,综合生物量、SOD酶比活力考虑选定该酵母发酵时间为18 h。

3 结论

(1) 采用简单有效的试验方法,从葡萄园地中筛选出1株SOD产量较高的酵母X8菌株。

(2) 研究结果表明,不同碳源、氮源、pH值、碳氮比以及培养时间都与该菌株的生长和SOD产量有关。其中,最适碳源是麦芽糖,最适氮源是蛋白胨,最合适的碳氮比是6:1,最佳pH值为5.0,最适宜的发酵时间为18 h。

参考文献

- [1] 吴江,陈代杰.微生物中超氧化物歧化酶含量与分布[J].中国医药工业杂志,1997(3):495-498.
- [2] 李元杰.SOD治疗超氧化物阴离子自由基所引起的疾病及抗衰老的应用[J].中国药理学杂志,1989(7):397-401.
- [3] 王岁楼,张平之,张欣,等.高产SOD酵母菌的筛选及其发酵条件的研究[J].郑州粮食学院学报,1997(3):18-23.
- [4] 谭天伟,马润宇,杨元忠,等.从酵母菌中分离纯化超氧化物歧化酶[J].微生物学报,1997(1):69-71.
- [5] 李建武.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994:318-323.
- [6] 邓碧玉,袁勤生,李文杰.改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活力的方法[J].生物化学与生物物理进展,1991(18):163.