

用醇类从酵母菌中释放超氧化物歧化酶

谭天伟 杨元忠 马润宇

(北京化工大学化工系 北京 100029)

摘要 研究了一种用醇类有机溶剂处理法从酵母菌中选择性地释放超氧化物歧化酶(SOD)的方法。当采用异丙醇浓度为90%。浸泡120min,抽提缓冲液为50mmol/L磷酸盐缓冲液(pH7.0)时,抽提20h,SOD释放的活力为300u/ml,杂蛋白释放量最少,SOD比活达300u/mg。SOD释放率可达90%,和传统的超声波法和机械法相比,而比活提高了25倍。这种方法不需要任何复杂设备,操作简单,成本低廉,在释放SOD同时,可达到初步纯化SOD的效果。

关键词 胞内蛋白释放,超氧化物歧化酶,醇类溶剂

细胞破碎是胞内产物分离纯化的第一步。细胞破碎方法主要有机械破碎法(高压匀浆、球磨和超声波法等)和非机械破碎法(溶菌酶和化学渗透法)。机械破碎法已经应用于工业规模的细胞破碎⁽¹⁾。但由于其是整体细胞破碎,使体系粘度增加。菌体碎片分离困难。而且胞内所有蛋白及DNA、糖类全部释放,给后续的分纯化带来很多麻烦。溶菌酶法由于成本较高,而很难工业化⁽²⁾。用溶菌酶有选择性地部分释放产物最近已有研究⁽³⁾,但是否能够工业化还取决于酶的价格。近年来化学渗透法日益受到重视,该方法不需要整体破碎细胞,但目前的化学渗透法采用高浓度溶液(7mol/L盐酸胍)和昂贵的表面渗透剂(Triton X-100),使破碎成本增加,而且所用试剂本身也有一定的毒性,从而限制了它的应用⁽⁴⁾。Arnold⁽⁵⁾采用醇类有机溶剂溶解细胞膜表面类酯和糖蛋白从而测定胞内酶活性获得成功。本文利用醇类溶解膜表面物质的特点,研究了一种简单、廉价的胞内蛋白释放方法,用醇类从酵母菌中释放超氧化物歧化酶(SOD)。

1 材料和方法

1.1 SOD 发酵菌种及培养条件

高产SOD酵母菌株ZDF-48由中国科学院微生物研究所提供,摇瓶培养基(%):白糖6,酵母膏1,蛋白胨1,自然pH,温度28℃,发酵20~24h。

1.2 SOD 活性及总蛋白分析

SOD活性分析采用改进的联苯三酚自氧化法⁽⁶⁾。总蛋白分析为Bradford法⁽⁷⁾,以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.3 醇类处理酵母细胞及释放SOD

用70%~90%的醇类将酵母细胞浸泡60~120min后,抽滤除去有机溶剂,每克湿菌

本项目获得国家教委回国人员科研资助金,已申请国家发明专利,申请号94115495.5。
本文于1994年11月31日收到。

体加入 3mlK₂HPO₄/KH₂PO₄ 缓冲液 (50mmol/L, pH8.2)。搅伴 19~20h 后, 过滤除去菌体便可得到 SOD 释放液。

2 实验结果和讨论

2.1 醇类的浸泡条件

2.1.1 溶剂的影响: 不同醇类溶剂对酵母释放 SOD 的影响如图 1, 当不加溶剂时, 酵母菌有一定自溶, 但用异丙醇处理后, SOD 活性由自溶的 125u/ml 提高到 260u/ml, 以超声波破碎细胞 1.5h, 上清液活力按 100% 计, 用异丙醇处理后的 SOD 释放率可达 90%。

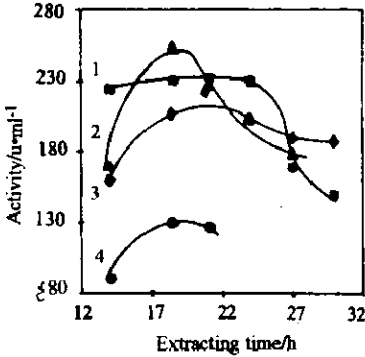


图 1 不同醇类溶剂对酵母释放 SOD 的影响

Fig. 1 Effect of alcoholic solvents on the release of SOD

Solvent con. 80%, Treating time: 90min,
1. Methanol, 2. Isopropanol, 3. Ethanol, 4. No solvent

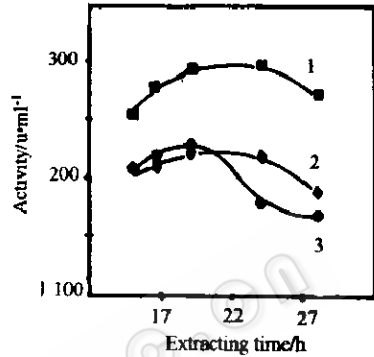


图 2 异丙醇浓度对释放 SOD 的影响

Fig. 2 Effect of isopropanol concentration on the release of SOD

Treating time: 90min
Conc. of solvent: 1. 90%, 2. 80%, 3. 70%

2.1.2 溶剂浓度的影响: 不同浓度异丙醇浸泡对 SOD 释放影响很大 (图 2), 溶剂浓度越高, SOD 释放越多, 但比活却有下降, 如用 70%、80%、90% 异丙醇处理 90min, 然后用磷酸盐缓冲液萃取 20h, 释放的 SOD 比活分别是 270、321 和 485u/mg。可能是醇类溶剂浓度越高, 膜表面溶解成份越多, 胞内蛋白更易于释放, 从而降低了 SOD 的比活, 但作为分离纯化的第一步, 释放率高较为合算, 因而选择 90% 异丙醇浸泡。

2.1.3 浸泡时间的影响: 异丙醇浸泡时间长对 SOD 释放有利 (图 3), 但浸泡时间 > 120min 时, 杂蛋白释放量较多, 因而选择浸泡时间为 120min。

2.2 抽提缓冲液对 SOD 释放的影响

2.2.1 缓冲液浓度及提取时间的影响: 经过实验, 选择磷酸盐缓冲液为抽提 SOD 缓冲液。缓冲液浓度对 SOD 释放的影响如图 4。当磷酸盐缓冲液浓度高时, SOD 释放率高, 但缓冲液浓度 > 50mmol/L, 影响已不明显, 因而选择 50mmol/L 磷酸盐缓冲液。抽提时间也应严格控制, 时间太长时, SOD 释放活性反而下降, 可能是胞内释放的蛋白酶水解了部分 SOD。

2.2.2 缓冲液 pH 的影响: 异丙醇的浓度为 90%, 缓冲液浓度为 50mmol/L, 处理 1~120min, 结果见图 5~6。pH7.0 对 SOD 释放最有利, 而且 SOD 的比活也最高 (可达 320u/mg), 控制合适的抽提时间 (18~20h), 释放率可达 90%。

2.3 溶剂处理法和其它细胞破碎方法的比较

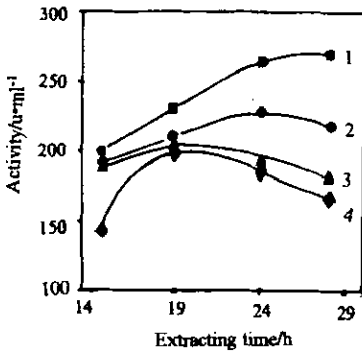


图3 异丙醇浸泡时间对SOD释放的影响

Fig. 3 Effect of isopropanol treating time on the release of SOD

Solvent conc: 90%, Buffer, pH6.0, Treating time (h);
1. 3, 2. 2, 3. 1.5, 4. 1

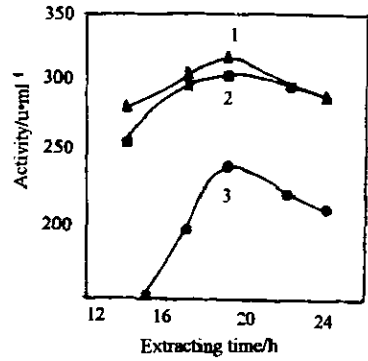


图4 缓冲溶液浓度对SOD释放的影响

Fig. 4 Effect of buffer concentration on the release of SOD

Solvent conc: 90%, Treating time: 120min, Buffer conc (mmol/L): 1. 100, 2. 50, 3. 20

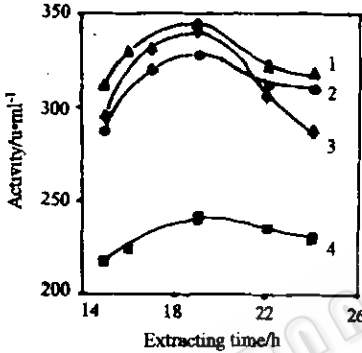


图5 缓冲溶液pH对SOD释放的影响

Fig. 5 Effect of buffer pH on the release of SOD

Cell (g): buffer (ml) = 1:3
pH: 1. 7, 2. 6, 3. 8, 4. 5

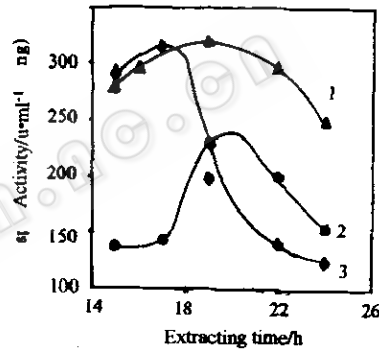


图6 缓冲液pH对SOD比活的影响

Fig. 6 Effect of buffer pH on the specific activity of SOD

Cell (g): buffer (ml) = 1:3
pH: 1. 6, 2. 7, 3. 8

超声波法和溶剂处理法比较结果如表

1, 用超声波(频率20kHz, 功率180W)处理酵母菌1.5h后, SOD释放达到最高水平(330u/ml), 但比活仅为8.1u/mg。而用溶剂法处理19h后, SOD释放活性为295u/ml, 比活226u/mg。即SOD释放率89%, 比活提高了28倍(相对8.1u/mg)。虽然其处理时间长一点, 但不需要任何复杂设备, 而且也没有因超声波造成的对人体有害因素, 同时还能纯化目标蛋白, 因而特别适用于实验室用胞内产物的提取。

表1 超声波法和溶剂处理法的比较

Table 1 Comparison of ultrasonic method and organic solvent treatment

Methods of treatment	Ultrasonic				Organic solvent	
Time/h	0.5	1	1.5	2	19	22
Activity/u · ml ⁻¹	280	310	330	331	295	280
Specific activity/u · mg ⁻¹	12.3	10.1	8.1	8.0	226	200

醇类处理法也可用于大规模胞内产物的提取, 和常用的高压匀浆法及球磨法相比, 具

有以下优点：①不需要复杂设备及冷却装置；②菌体分离容易，由于其没有整体破碎细胞；用本法处理后，在 3000r/min 离心，上清液浊度（600nm 比色）比用直接球珠研磨破碎液离心（3000r/min）后上清液浊度低 2 倍。③可以纯化目标蛋白，达到有选择地释放目标蛋白；④成本低。实验结果表明，浸泡所用醇类溶剂至少可循环使用 3 次，而且 90% 以上的溶剂都得到回收。用醇类处理细胞膜表面是一种简单、高效的酵母 SOD 释放方法。

致谢 本研究菌种由中国科学院微生物研究所张博润提供，特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Schutte H, Hummel W, Kula M R. *Anal Biochem*, 1985, **151**: 547~553.
- [2] Le Corre S, Andrews B A, Asenjo J A. *Enzyme Microb Technol*. 1985, **7**: 73~77.
- [3] Huang R B, Andrews B A, Asenjo J A. *Biotechnology and Bioengineering*. 1991, **38**: 977~985.
- [4] Hettwer D, Wang H. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, **33**: 886~895.
- [5] Arnold W N. *J Bacteriol*, 1972, **109**: 949~951.
- [6] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. *医药工业*, 1988, **19** (5): 217~219.
- [7] Bradford M. *Anal Biochemistry*, 1976, **72**: 248~255.

Selective Release of Superoxide Dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* by Alcoholic Solvent

Tan Tianwei Yang Yuanzhong Ma Runyu

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

Abstract A new and cheap approach in which the alcoholic solvents were used to release selectively superoxide dismutase (SOD) from *Saccharomyces cerevisiae*, was developed. The effects, which influenced the release of SOD, such as the alcoholic solvent type, concentration, treating time and the extractive buffer concentration, extractive time, pH were studied. When 90% isopropanol was used to treat the cells for 120 min and then 50mmol/L phosphate buffer (pH7.0) was added after removal of solvent by filtration, the SOD released was up to 300u/ml with specific activity 300u/mg. The recovery of SOD is 90%, comparing to traditional methods such as ultrasonic approach, while the specific activity of SOD increased 25 folds. The new approach does not require any complicated device and is a simple mild and inexpensive method of intracellular enzyme release, where the target enzyme SOD can be purified simultaneously.

Key words Release of intracellular protein, superoxide dismutase, alcoholic solvents