

活性酵母细胞衍生物的初步研究*

马超颖 戚薇 路福平 杜连祥

(天津科技大学食品科学与生物工程学院 天津 300222)

摘要: 活性酵母细胞衍生物 (Live Yeast Cell Derivative, 简称 LYCD) 是酵母细胞在人为控制的伤害条件下产生的具有促进细胞呼吸和修复作用的保护性物质。研究表明: LYCD 对细胞具有明显的促呼吸作用; 在过氧化氢的作用下, 应激反应发生 15min 时, 所制备的 LYCD 具有最强的促呼吸作用; 发生 30min 时, LYCD 中还原型谷胱甘肽 (GSH) 的含量最高。对比实验还表明: 在不同的应激条件下所制备的 LYCD, 具有相似的生物活性。

关键词: 活性酵母衍生物, 过氧化氢, 还原型谷胱甘肽

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 03-0026-04

PRELIMINARY STUDIES ON LIVE YEAST CELL DERIVATIVE

MA Chao-Ying QI Wei LU Fu-Ping DU Lian-Xiang

(College of Food Science and Bioengineering, Tianjin University
of Science and Technology, Tianjin 300222)

Abstract: Live Yeast Cell Derivative (LYCD) was based on a living cell's response to a controlled injury, which stimulated it to produce protective substance to increase cellular respiration and wound healing. The experiment suggested that LYCD had the ability to improve cellular respiration, and this ability became strongest after the cell was treated with H_2O_2 for 15min, while the quantity of reduced glutathione (GSH) in LYCD reached the highest at 30min. By contrast, almost the same biological activity of LYCD was observed under different stress conditions.

Key words: LYCD, Hydrogen peroxides, Glutathione

用紫外线、热、X-射线或化学损伤刺激酵母细胞, 细胞就会发生应激反应, 产生自我保护性物质, 活性酵母细胞衍生物 (LYCD)。最初的 LYCD 是利用紫外线照射酵母细胞后提取得到的, 后来人们利用低浓度的过氧化氢 (H_2O_2) 刺激酵母细胞, 其中制备了 LYCD。LYCD 由低分子量的多肽和各种应激蛋白组成, 还含有少量的氨基酸和维生素及矿物质, 它能提高胶原蛋白和弹性蛋白的形成, 增加皮肤对水分的吸收和对氧的利用, 具有镇痛和皮肤修复的作用, 是化妆品和制药工业中一种重要的生物添加剂^[1]。

GSH 是 LYCD 中的一种重要的成分, 是细胞内最重要的抗氧化剂^[2]。通过对 LYCD 中 GSH 含量的测定和分析, 将有助于深入研究酵母细胞的氧化应激反应机制。

1 材料与方法

1.1 菌种

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) TQ 22015 (LYCD 制备菌株), 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) TQ 22025 (促呼吸作用测定菌株)。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 20206025)

Project Grated by Chinese National Natural Science Fund (No. 20206025)

收稿日期: 2002-07-22, 修回日期: 2002-10-05

1.2 实验方法

1.2.1 LYCD的制备: 将酵母细胞培养到对数期,用0.2mmol/L的 H_2O_2 ,或者用286nm的紫外线处理酵母细胞,然后对酵母细胞破壁,提取制备LYCD^[3]。

1.2.2 酵母提取物(Yeast Extract, YE)的制备: 取未经应激处理的酵母细胞,依照与LYCD提取过程相同的方法制备YE。

1.2.3 LYCD促呼吸作用的测定: 将新鲜培养的酵母细胞制成一定浓度的菌悬液,然后加入LYCD,采用瓦勃氏呼吸法,测定反应中 CO_2 的释放量。

1.2.4 GSH含量的测定: 采用荧光光度法,激发波长为365nm,测定波长为425nm^[4,5]。

2 结果与讨论

2.1 LYCD促细胞呼吸作用的测定

LYCD是活性酵母细胞在人为控制的条件下经过伤害培养得到的活性物质,它最大的特点就是可以促进细胞的呼吸,加强细胞对氧的利用。本实验采用瓦勃氏呼吸法测定菌体培养物中 CO_2 的释放量,以此反映LYCD对细胞呼吸促进作用的大小。本实验采用0.2mmol/L的 H_2O_2 刺激对数期酵母细胞,测定了 H_2O_2 作用不同时间,所制备的LYCD的细胞呼吸促进作用(图1)。

从图1看出: H_2O_2 刺激10~60min,所得到的LYCD加入到酵母培养液后,其 CO_2 释放量在160.2~190.6 μL 之间,而加入未经 H_2O_2 刺激的YE,其 CO_2 释放量仅为130.2 μL 。说明经 H_2O_2 刺激所得到的LYCD具明显的促细胞呼吸作用。实验还发现, H_2O_2 刺激时间不同,所制得的LYCD的促呼吸作用也不同,在0~15min内,随着作用时间的延长,LYCD的促呼吸作用逐渐增加,到15min时达到最大值超过15min,随着作用时间的延长,LYCD的促呼吸作用逐渐下降,但仍高于未经 H_2O_2 处理的酵母提取物的促呼吸作用。说明酿酒酵母受 H_2O_2 刺激后,细胞在很短的时间内就合成了相应的应激产物,这些应激产物可以消除细胞内存在的自由基和活性氧类,增强细胞线粒体对氧的利用,起到了促进细胞呼吸和自我修复的作用。

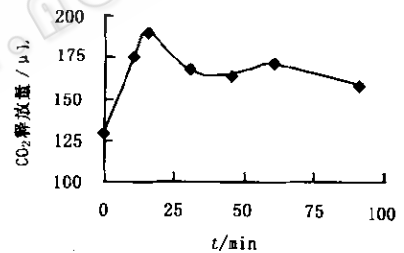


图1 LYCD促呼吸作用的研究

2.2 应激反应中LYCD中GSH含量的测定

2.2.1 标准曲线: 配制不同浓度的GSH标准溶液,以365nm为激发波长,425nm为测定波长,测定标准溶液的荧光强度。用GSH的浓度为横坐标,GSH的荧光吸收值为纵坐标,作标准曲线(图2)。得回归方程为: $y = 40.992x - 0.5752$, $r = 0.9976$ 。

从图2看出,在所测定的GSH浓度范围内,GSH的浓度与其荧光吸收值有良好的线性关系,可以作为计算样品中GSH含量的依据。

2.2.2 LYCD中GSH含量的分析: 用0.2mmol/L的 H_2O_2 刺激酵母细胞,制备LYCD,测定LYCD中GSH的含量(图3)。从图3看出,经 H_2O_2 处理,得到的LYCD中GSH含量高于未经 H_2O_2 处理的YE中GSH含量。 H_2O_2 刺激30min,LYCD中的GSH含量高达9.78 $\mu g/mL$,而YE中的GSH仅为6.83 $\mu g/mL$ 。说明在氧化应激的条件下,细胞合成了更

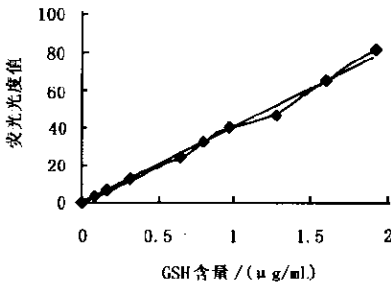


图2 GSH标准曲线

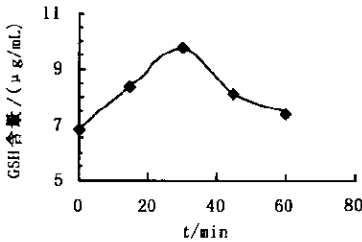


图3 H₂O₂处理不同时间LYCD中GSH的变化

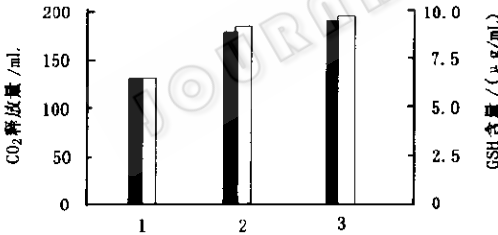


图4 H₂O₂与紫外刺激所得LYCD的比较
1 酵母提取物, 2 紫外处理, 3 H₂O₂处理
■ LYCD促呼吸作用, □ GSH含量

多具有抗氧活性的物质。另外,从图3还可看出,在0~30min内,随着H₂O₂作用时间的延长,菌体在应激反应中合成的GSH也不断增多,作用30min所产生的GSH的量最高,为9.78μg/mL。作用时间超过30min时,GSH的含量随着H₂O₂作用时间的延长而逐渐下降。因此,以0.2mmol/LH₂O₂刺激酵母细胞30min,细胞内GSH含量最高。

GSH是酵母细胞的一个重要的代谢产物,其主要的生物学功能是保护体内蛋白质的巯基,维持细胞内正常的氧化还原状态。在氧化应激的条件下,细胞为应付不良的外界环境,势必要合成更多抗氧活性成分,以抵御不良环境的刺激。我们的实验结果也验证了这一点。在H₂O₂的作用下,细胞可能通过加强合成GSH的两个重要的酶——谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽合成酶的转录和翻译,最终提高了细胞内GSH的含量,从而增强了对细胞的保护作用。

2.3 不同应激条件下制备的LYCD的比较

用紫外线和H₂O₂分别处理酵母细胞,制备LYCD,然后进行LYCD促呼吸作用和GSH含量的测定(图4)。从图4可以看出,用紫外照射和H₂O₂分别刺激酵母细胞,所得到的LYCD与未经处理的酵母细胞提取物相比,具有明显的促进细胞呼吸作用,其所含GSH的含量也显著高于后者。尽管刺激方法不同,两种方法制备的LYCD在促进细胞呼吸作用的大小和GSH的含量的高低上都非常接近。说明酵母细胞在

紫外线照射和H₂O₂作用的应激反应中,尽管在反应机制上可能有差异,但其反应产物却具有类似的生物活性作用。上述研究,对进一步分析和提纯LYCD中的主要的活性成分,以获得品质更为优良的生物活性物质,用于医药和化妆品工业具有重要的意义。

参考文献

[1] Geoffrey J. Brooks *Cosmet Toil*, 1995, 7 (110): 65~68.
 [2] 沈亚领, 李爽, 迟莉丽. *工业微生物*, 2000, 30 (6): 41~45.
 [3] Lods L, Scholz D, Johnson C, et al. *Cosmet Toil*, 2000, 12 (115): 71~74.
 [4] Lewis C, Mokrasch, Eric J. *Teschke Anal Biochem*, 1984, 140: 506~509.
 [5] 郭黎平, 刘国良, 张卓男, 等. *东北师范大学学报*, 2001, 33 (1): 34~38.