

SOD 活性对高温酵母菌株乙醇忍受性的影响

文 铁 桥

赵 学 慧

(湖北大学生命科学系 武汉 430062)

(华中农业大学食品科技系 武汉 430070)

摘要 研究了超氧化物歧化酶(SOD)活性与乙醇忍受性关系。结果表明,环境 pH 改变导致 SOD 构象及活性变化。酸性条件下,SOD 在 220nm 波长附近吸收峰紫移,酶活性减弱或丧失,热致死最高温度降低;中、碱性条件(pH7~9)下,220nm 波长附近吸收峰红移,酶活性及热致死温度未发生显著性改变。热休克和乙醇预处理 MnSOD、CuZnSOD 缺失菌株,不同程度提高细胞存活率,证实了 MnSOD 比 CuZnSOD 对菌株乙醇抗性起了更为重要的作用。

关键词 MnSOD, CuZnSOD, 高温酵母, 热休克, 乙醇忍受性

分类号 Q939.5

酿酒酵母产酒能力取决于菌株乙醇忍受性能,乙醇的存在(或发酵过程乙醇的产生)降低了菌株的最高生长温度,加速了菌体热致死效应^[1,2]。高温刺激菌体热休克蛋白的合成^[3],氧摄取量骤增,活性氧中间物积累^[4]。有研究表明,乙醇的毒害与氧自由基的形成有关^[5]。本文从不同类型的 SOD 在高温酵母抗逆性保护中所起的重要作用的研究,探讨了 CuZnSOD 和

MnSOD 对菌株耐温性能与乙醇忍受性的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株

K. luyeroomyces YTA6、YTA6 MnSOD⁻、YTA6 CuZnSOD⁻ 均为华中农业大学食品微生物研究室保藏菌株,最高生长温度 47℃。

1.2 菌体培养

菌体生长于 YPD 培养基, 30℃, 150r/min 至对数生长期, 3000r/min 离心收集菌体, 用于细胞预处理和细胞存活率测定, 酶的提取、制备与分析。

1.3 菌体预处理及活菌数测定

将培养至对数生长期菌体分别置于 48℃ 30min 和 10% 乙醇 30min 作预处理, 再置于 16% 乙醇中, 不同时间取样, 稀释涂平板, 30℃ 生长 2d, 生长的菌落数即为活菌数。

1.4 酶液制备及酶活测定

离心收集菌体, 用 0.05mol/L pH7.8 PB 洗二次, 在冰浴上超声破碎 8min, (4710 型, Cole-Parmer Instrument CO. USA), 13,000r/min, 4℃ 离心 20min, 即得粗酶液。酶活力测定按文献 [6] 进行。

1.5 SOD 纯化

取粗酶液加入 K_2HPO_4 离心去杂蛋白, 向上清液加 $(NH_4)_2SO_4$ 至 30% 饱和度, 离心得上清, 再加 $(NH_4)_2SO_4$ 至 60% 饱和度, 得蛋白沉淀, 用少量 0.05mol/L pH7.8 PB 溶解, Sephadex G-100 柱分离, LKB 柱层析系统扫描 (LKB2210 Recorder 2-channel), 选出蛋白高峰洗脱体积, 检测 SOD 活性, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 紫外可见记录光谱仪 (UV-Visible Recording Spectrophotometer UV-265 FW, Shimadzu) 于 190~400nm 波长扫描。

1.6 SOD 构象变化测定

采用紫外差示分光光度法^[7]测定 220nm 左

右不同 pH 条件下纯化的 SOD 肽基团吸收峰值变化, 结果由紫外可见记录光谱仪扫描记录。

1.7 蛋白含量的测定

采用紫外分光光度法, 以牛血清白蛋白作标准, 测定 OD_{280nm} 值, 标准曲线相关系数 $r = 0.9977$

2 结果与讨论

2.1 热休克和乙醇预处理对菌体活性的影响

对不同菌株分别进行热休克和乙醇预处理, 测定不同时间菌体存活率 (表 1), 与对照相比在致死乙醇浓度 (16%) 条件下经预处理后菌体细胞存活率均有极大提高。将 YTA₆ 置于 16% 乙醇溶液 60min, 对照组细胞存活率为 45.8%, 而经乙醇和热休克预处理后分别为 86.8% 和 64.7%。至 180min 时, 对照细胞存活率仅 8.4%, 而经乙醇和热休克预处理的细胞存活率分别为 84.7% 和 61.9%。可见, 乙醇和热休克预处理, 有利于细胞存活力的提高。

比照所试三种菌株, 不难看到 MnSOD 的缺失, 菌体对高浓度乙醇 (16%) 致死作用的忍受力最差。暴露于 16% 乙醇 180min, 细胞存活率仅为 2.0%, 而此时 YTA₆ 和 YTA₆CuZnSOD⁻ 分别为 8.4% 和 5.6%。值得注意的是, YTA₆ 和 YTA₆CuZnSOD⁻ 菌株通过乙醇和热休克预处理, 均能极大获得乙醇忍受性能, 细胞存活率均在 60% 以上, 至 180min 时, YTA₆ 细胞存活率 84.7% (乙醇预处理) 和 61.9% (热休克), YTA₆-

表1 预处理对菌体细胞存活率的影响

时间 (min)	菌株								
	YTA ₆			YTA ₆ MnSOD ⁻			YTA ₆ CuZnSOD ⁻		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
30	87.4	79.6	79.5	58.3	42.1	30.5	86.6	78.8	40.5
60	86.8	64.7	45.8	42.7	41.5	16.6	82.1	64.7	30.2
90	85.7	64.2	25.2	34.5	36.4	14.5	78.8	64.5	18.9
120	85.1	63.5	16.1	28.6	26.7	10.1	77.9	63.2	15.3
150	84.9	62.6	12.6	19.3	17.8	4.3	76.8	61.8	12.1
180	84.7	61.9	8.4	12.4	11.3	2.0	76.4	60.9	5.6

表中数据为细胞存活率, 按起始细胞数 100% 计算。1) 10% 乙醇预处理 30min 2) 48℃ 预处理 30min 3) 对照, 未作预处理。将所试菌株经预处理 (对照除外) 后, 置 16% 乙醇溶液不同时间 (min), 平皿计菌落数, 计细胞存活率。

表2 pH对SOD活性影响

pH	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
酶比活	23.1	34.4	60.3	71.8	72.2	72.4	72.2
(u/ mg蛋白)	(±0.095)	(±0.238)	(±0.235)	(±0.579)	(±0.242)	(±0.292)	(±0.326)
致死温度	50.3	51.7	60.0	74.3	77.3	77.7	77.0
(℃)	(±1.528)	(±3.055)	(±2.082)	(±2.517)	(±1.528)	(±1.528)	(±1.732)

CuZnSOD⁻细胞存活率 76.4%(乙醇预处理)和 60.9%(热休克), 而 YTA₆MnSOD⁻菌株则分别是 12.4%和 11.3%。由于 YTA₆MnSOD⁻的缺失, 即使通过预处理也并未明显增强菌株乙醇耐受性。显示了 MnSOD 对于菌株乙醇抗性起了极为重要的作用。

2.2 MnSOD 构象变化对酶活性的影响

YTA₆ CuZnSOD⁻粗酶液经硫酸铵沉淀、Sephadex G-100 分离和 PAGE 电泳纯化后置不同 pH 条件测定 SOD 构象变化(图 1)及相应酶活与热致死温度(表 2)。



图1 不同pH条件下SOD紫外扫描图谱
按最大吸收峰从低到高相应的pH值是3、4、5、6、7、8、9

图 1 表明, 在波长 220nm 附近, 不同 pH 条件对 SOD 分子构象的影响很大, pH 降低 (pH6→3) 最大吸收波长降低(紫移), pH 上升 (pH7→9), 最大吸收峰波长变大(红移)。更值得注意的是此种构象的改变在中、碱性范围 (pH7-9)内对酶活性及热致死温度的改变无显

著影响, 而在酸性范围 (pH3~6) 影响显著 (pH3-5, $p < 0.01$, pH6, $p < 0.05$) 表明了 pH 的改变对 SOD 构象变化与活性的影响(表 2)。从酵母菌乙醇发酵(弱酸性)和较高的致死温度综合考虑, 确定 pH6 作为下列 SOD 活性研究条件。
2.3 预处理对 CuZnSOD 和 MnSOD 活性的影响

对菌株 YTA₆MnSOD⁻作热休克和乙醇预处理, 测定 CuZnSOD 活性, 两者均使酶活增强, 且为极显著水平 ($p < 0.01$)。对菌株 YTA₆-CuZnSOD⁻进行同样的热休克和乙醇预处理, 结果表明乙醇预处理 (EP) 后, MnSOD 活性平均增加 0.8u / mg 蛋白, 提高幅度均达极显著水平 ($p < 0.01$); 温度预处理 (HP) 60min, 酶活提高极显著。

2.4 CuZnSOD 和 MnSOD 与菌株乙醇耐受性的关系

综合分析了 CuZnSOD、MnSOD 与菌株乙

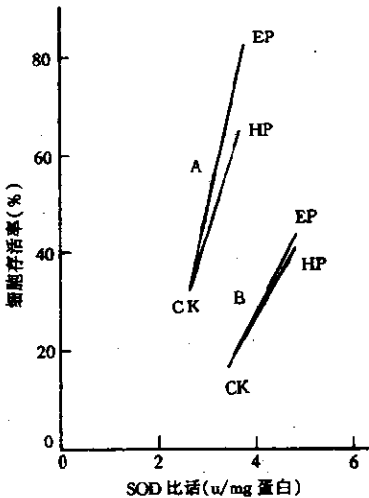


图2 SOD活性与菌株乙醇耐受性的关系
图中数据为菌株经预处理后 (HP: 热休克、EP: 乙醇预处理) 置16%乙醇 60min测得SOD比活和细胞存活率。A: MnSOD
B: CuZnSOD

醇忍受性的关系(图 2)。经预处理后 CuZnSOD 活性都有增加,由对照的 3.5u / mg 蛋白增至 4.7u / mg 蛋白(热休克 HP)和 4.8u / mg 蛋白(乙醇预处理 EP)。同时细胞存活率也有增加,由对照的 16.6% 分别增至 41.5%(净增 24.9%)和 42.7%(净增 26.1%)。这说明菌体 CuZnSOD 活性增加,有利于细胞存活率提高。

然而,从 MnSOD 活性变化对细胞存活率的影响不难看到无论是乙醇预处理(EP),还是热休克(HP)均比 CuZnSOD 酶活性对菌体存活率的影响大得多。乙醇预处理(EP)细胞存活率由对照的 30.2% 增至 90.1%(净增 59.9%),热休克增至 64.7%(净增 34.5%)。可见 MnSOD 活性的表达对细胞乙醇抗性的获得起了较为重要的作用。

参 考 文 献

[1] Leao C, Van Uden N. *Biotechnol Bioeng*, 1982, 24:

1581~1584.

[2] Loureiro V, van Uden N. *Biotechnol Bioeng*, 1982, 24: 1881~1885.

[3] Lindquist S, Craig EA. *Annu Rev Genet*, 1988, 22: 631~677.

[4] Fridovich I. In *Oxygen and Living Processes* (Gi-ber D, Ed.), 1981, 250~272, Spring Verlag, New York / Heidelberg / Berlin.

[5] Nordmann R, Ribier C, Rouch H. In *Biomedical and Social Aspects of Alcohol and Alcoholism* (Kuriyama K, Takade A and Ishii H, Eds), 1988, 17~27, *Excerpta Medica*, Elsevier Science, Amsterdam.

[6] 王爱国,罗广华,邵从本等. *植物生理学报*, 1983, 9(1): 77~83.

[7] Geler B L, Winge D R. *Anal Biochem*, 1983, 128: 86~92.

THE RELATIONSHIP BETWEEN ALCOHOL TOLERANCE AND SOD ACTIVITY OF HIGH TEMPERATURE FERMENTATION STRAINS

Wen Tieqiao

(Department of Life Science Hubei University, Wuhan, 430062)

Zhao Xuehui

(Department of Food science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070)

Abstract On the basis of constructing high temperature fermentation strains, the relationship between alcohol resistance and superoxide dismutase activity was studied further. The result shows that conformation in SOD is changed in different pH solution. Acid solution makes absorption spectrum value of SOD around 220nm turned into more ultraviolet area and SOD activity is debased or lost, meanwhile the highest growth temperature of strain is decreased. By contraries, alkaline solution makes absorption spectrum value of SOD around 220nm increased, but enzymic activity and the highest growth temperture of strain do not be changed significantly. Alcohol tolerance has a direct bearing on the SOD activity. The result of alcohol resistance in MnSOD⁻ and CuZnSOD⁻ strain shows that MnSOD plays an important role in strain alcohol tolerance.

Key words MnSOD, CuZnSOD, Thermotolerant yeast, Heat shock, Alcohol tolerance