

# 少孢根霉 RT-3胞外产超氧化物歧化酶的研究

张羽航<sup>1,2</sup> 江汉湖<sup>2</sup> 董明盛<sup>2</sup> 姚汝华<sup>1</sup>

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)<sup>1</sup>

(南京农业大学食品科技学院 南京 210095)<sup>2</sup>

**摘要** 利用少孢根霉 RT-3行固态发酵,从培养物中可以直接抽提得到 SOD。固体发酵培养物发酵前后的酶活分析表明少孢根霉 RT-3可向胞外分泌 SOD。酶抽提液中含有 Cu、Zn 型和 Mn 型 SOD。对其初步纯化所得粗酶制剂比活力为 444.8u/mg。酶的紫外吸收峰在 258nm。酶在 60℃ 以下较稳定,活性稳定 pH 为 5.5~9.5。

**关键词** 超氧化物歧化酶,分泌,发酵,根霉

**分类号** Q939.9

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase 简称 SOD)是一种广泛存在于生物体内的含铜、锌或锰和铁的金属酶。它催化超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )转变为  $H_2O_2$  和  $O_2$  的歧化反应,从而消除体内多余的  $O_2^{\cdot-}$ ,解除  $O_2^{\cdot-}$  对生物体的毒性。SOD 在食品、化妆品和医药等方面的应用也日益广泛。目前有关的 SOD 的研究主要偏重于动植物细胞 SOD 的研究,有关微生物 SOD 的研究不多且集中于酵母菌和细菌。少孢根霉 RT-3 系一株分离自东方发酵食品—丹贝的根霉菌<sup>[1]</sup>。我们研究了少孢根霉 RT-3 固态发酵产 SOD 的特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

少孢根霉 RT-3 (*Rhizopus oligosporus* saito RT-3) 为南京农业大学食品微生物学科组筛选并鉴定。

### 1.2 培养基和培养方法<sup>[1]</sup>

#### 1.2.1 斜面培养基: PDA 培养基。

#### 1.2.2 液体培养基: 黄豆芽汁培养基。

1.2.3 固态发酵培养基: 精选大豆, 泡 16~18h, 去皮, 大豆子叶煮沸 30min, 沥尽水, 按湿重 1% 添加乳酸。

1.2.4 培养方法: 将液体培养基培养得到的少孢根霉 RT-3 菌丝捣碎后与一定量米粉混匀制成发酵剂。固态发酵培养基酸化基质后, 按一定比例接种发酵剂, 35℃ 培养一定时间。

### 1.3 酶液制备

发酵结束后按每克发酵培养物加 5ml 磷酸缓冲液, 用食品加工机搅打 1min, 10000r/min 冷冻离心 1min, 取上清液为粗酶液。

### 1.4 酶活测定

采用微量邻苯三酚自氧化法<sup>[2]</sup>。

### 1.5 电泳和 SOD 活性染色

采用不连续的垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。酶活性染色按罗广华和王爱国法进行<sup>[3]</sup>。

### 1.6 SOD 同工酶类型鉴定

定位测定法系将抑制剂处理过的酶进行凝胶电泳,并对活性染色带进行薄层扫描<sup>[4~5]</sup>。

**1.6.1  $H_2O_2$ 抑制:**  $H_2O_2$ 以 6m mol/L 加入样品中 25℃ 保温反应 90min。

**1.6.2 SDS 预处理:** 2%SDS 预处理样品。

## 1.7 凝胶电泳中 SOD 活性谱带的密度扫描

用岛津紫外—可见薄层扫描仪对 SOD 活性谱带进行密度扫描,波长为 560nm<sup>[6]</sup>。

**1.8 SOD 的部分分离纯化按 [6~7] 进行**

## 1.9 pH 对 SOD 的影响

将纯化后的 SOD 酶样品在不同 pH 值的缓冲液中 25℃ 保温 30min,再将 pH 调至 8.2,测定 SOD 活力。pH3~8 采用柠檬酸和柠檬酸钠缓冲液, pH9~11.5 采用碳酸钠和碳酸氢钠缓冲液<sup>[4]</sup>。

# 2 结果

## 2.1 固态发酵培养基发酵前后 SOD 酶活变化

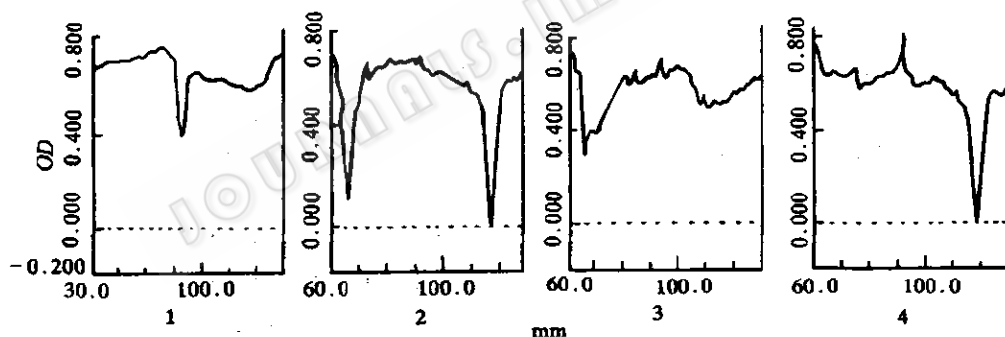


图1 SOD同工酶谱

1. 人 Cu, Zn-SOD; 2. 培养物 SOD 粗提液; 3.  $H_2O_2$  处理; 4. SDS 处理

人 Cu, Zn-SOD 标准品在 Rf 值 0.61 左右有一条活性主带。培养物粗提液也有一条主带, Rf 值为 0.58, 还有次级带存在。经  $H_2O_2$  处理后, 粗提液的 SOD 主带消失, 但是次级带仍然存在。在 SDS 预处理样品的扫描图谱中 SOD 主带保留, 但是次级带消失。主带与标准品 Cu, Zn-SOD 反应特性一致, 为 Cu, Zn 型。次级带的反应特性与标准品截然不同, 为 Mn 型。

所以 RT-3 固态发酵培养物的 SOD 抽提液含有 Cu, Zn 型和 Mn 型两种 SOD。

从固态发酵培养基发酵前后酶抽提液的垂直平板式聚丙烯酰胺凝胶电泳可知大豆 SOD 粗提液有 5~6 条同工酶活性谱带, 其中能较强抑制 NBT 光化还原的三条透明谱带紧靠在一起。当大豆脱皮后煮沸 30min 再做电泳, SOD 活性谱带消失, 说明大豆固态发酵培养基不含有 SOD。固态培养基经 RT-3 发酵后, SOD 活性谱带又重新出现, 说明发酵后的培养物中有 SOD 存在。值得注意的是该活性谱带与少孢根霉 RT-3 菌丝体 SOD 粗提液的活性谱带基本一致。

## 2.2 SOD 同工酶谱和鉴别试验结果

不同类型的 SOD 对  $H_2O_2$  和 SDS 二种试剂的反应特性不同: Cu, Zn-SOD 对  $H_2O_2$  敏感, 对 SDS 不敏感; Mn-SOD 对  $H_2O_2$  不敏感, 对 SDS 敏感。为了直观反应同工酶谱的特征及谱带变化, 我们采用岛津薄层扫描仪扫描胶板, 结果如图 1。

## 2.3 SOD 的部分分离纯化

为了研究和应用的目的, 我们需要对该酶有一个初步而广泛的了解, 所以对发酵所得 SOD 粗提液进行了部分分离纯化。具体结果见表 1。

从 80g 培养物中分离纯化得到 137.6mg SOD 粗酶, 酶比活力为 444.8u/mg。至今为止的文献一致表明 Cu, Zn-SOD 不受乙醇—氯仿破坏而乙醇—氯仿可使 Mn-SOD 失活, 因此可以认定该粗酶制剂主要由 Cu, Zn-SOD 组成。

表1 从培养物中提取SOD粗酶的各步纯化步骤

步 骤	总体积(ml)	总蛋白(mg)	总酶活(u)	酶比活力(u/ mg)	收率	纯化倍数
粗酶液	400	2346.8	120000	51.13	100	—
乙醇氨仿处理	700	800	90000	112.49	75	2.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 处理	190	255	73200	322.12	61	5.6
丙酮沉淀	20	142	62400	440.12	52	8.6
透析	32	137.6	61200	444.8	51	8.7

## 2.4 酶的吸收光谱

结果表明该酶的紫外光区吸收峰在 258nm 左右。据文献报道<sup>[6]</sup>, 几乎所有 Cu, Zn-SOD 紫外吸收光谱的共同特征是对 250~270nm 波长有不同程度的吸收, 而 Mn-SOD 的吸收峰在 280~282nm。本实验采用的 SOD 酶液虽然是部分纯化的粗酶制剂, 但其紫外吸收光谱显示在 280nm 处并无峰出现。这反应该酶已达到一定纯度。

## 2.5 酶的稳定性

**2.5.1 温度稳定性:** 不同温度下 (20℃~90℃, 分别间隔 10℃) 对粗酶液分别保温 20min。结果显示酶在 60℃ 以下是稳定的。70℃ 保温 20min 才明显失活, 这可能与 Cu, Zn-SOD 含有金属辅基有关<sup>[6]</sup>。我们还发现粗酶样品在 4℃ 以下保存三个月后, SOD 活力仍保留 86%。这反应 SOD 在 4℃ 下是比较稳定的。

**2.5.2 pH 的影响:** 试验结果表明该酶在 pH5.5~9.5 范围内保持稳定。由于测定方法受 pH 的影响很大, 所以稳定 pH 范围还有待于进一步的确认。SOD 对 pH 的稳定性归因于金属辅离子的存在。

## 3 讨论

至今文献中微生物 SOD 都属于胞内酶, 发酵生产该酶需破碎胞壁, 不仅使工作难度加大, 相当繁琐, 而且带来成本的提高等诸多问题。

少孢根霉 RT-3 系一株分离自传统东方发酵食品—丹贝的根霉菌。根霉是我国传统的酿酒菌种之一, 能产生淀粉酶、糖化酶等多种胞外酶。我们在从 RT-3 固态发酵培养物抽提 SOD 时使用食品加工机粉碎湿曲的目的是为了在最

短时间内得到最大的产率。曾浩洋等研究泰国根霉的细胞外酶时更使用了高达 10000r/min 的韦林氏搅切器<sup>[8]</sup>。结合对少孢根霉菌丝的破壁研究, 可以确定食品加工机无法打断少孢根霉的菌丝。

曾浩洋等的研究报告还指出泰国根霉以麸皮和脱脂黄豆做固态培养时具各种胞外水解酶活性<sup>[9]</sup>。因此可以初步推断少孢根霉 RT-3 固态发酵培养物中所含 SOD 为菌体向胞外分泌而来。白玉明等对真菌可溶性蛋白简易制备方法的研究也可以提供一定的证据<sup>[10]</sup>。

采用 RT-3 固态发酵方法只需胞外抽提即可获得 SOD, 工艺简化且大大降低了成本, 使大量生产 SOD 成为可能。将来, 我们可以把少孢根霉 RT-3 固态培养时向胞外分泌 SOD 这一特性运用于人 Cu, Zn-SOD 的重组生产。如果人 Cu, Zn-SOD 也能分泌到胞外的话, 将极大的促进 SOD 在食品、医药和保健品等领域的应用。

## 参 考 文 献

- [1] 江汉潮, 董明盛. 南京农业大学学报, 1992, 15(3): 97~101.
- [2] 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(2): 163.
- [3] 罗广华, 王爱国. 植物生理学报, 1983, 6: 44~45.
- [4] 吴国林, 魏锦城, 程光宇等. 南京师范大学学报, 1994, 17(2): 113~120.
- [5] 白玉明, 褚西宁, 口如琴等. 生物化学杂志, 1995, 11(3): 328~332.
- [6] 方允中, 李文杰. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989, 71~128.
- [7] 张博润, 黄英, 田宇清等. 微生物学通报, 1992, 19(6): 352~357.

- [8] 曾浩洋, 董启功. 中国农业化学会志, 1985, 23: 300~307.  
111~118.
- [10] 白玉明, 樊凌燕, 褚西宁. 微生物学通报, 1995, 22(3): 188~191.
- [9] 曾浩洋, 赖宗圣, 黄进发. 中国农业化学会志, 1985,

## STUDY ON SECRETION AND PRODUCTION OF SUPEROXIDE DISMUTASE OF *RHIZOPUS OLIGOSPORUS*

Zhang Yuhang<sup>1,2</sup> Jiang Hanhu<sup>2</sup> Dong Mingsheng<sup>2</sup> Yao Ruhua<sup>1</sup>

(College of Food and Bioengineering South China University of Technology, Guangzhou 510641)<sup>1</sup>

(College of Food Science and Technology Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)<sup>2</sup>

**Abstract** Superoxide Dismutase (SOD) could be extracted from solid fermenting culture of *Rhizopus oligosporus* RT-3. Crude extract of SOD from the culture contained Cu, Zn-SOD and Mn-SOD. Specific activity of crude enzyme preparation of SOD by preliminary purification was 444.8u/mg. Ultraviolet absorption peak of this enzyme was 258nm. Stable pH and temperature for enzyme are 60℃ and 5.5~9.5.

**Key words** Superoxide Dismutase, Secretion, Fermentation, *Rhizopus*