

亚香棒虫草菌丝体金属硫蛋白的提纯及性质

张琪¹ 程显好^{2*} 郭文娟¹ 刘凤红² 王朝霞²

(1. 天津工业大学 天津 300387)

(2. 鲁东大学 菌物科学与技术研究院 山东 烟台 264025)

摘要:【目的】探讨锌离子诱导亚香棒虫草(*Cordyceps hawkesii*)菌丝体金属硫蛋白的产生及性质。【方法】亚香棒虫草菌丝体以 18 g/L Zn^{2+} 在 10 L 发酵罐中诱导培养 64 h 后收集菌丝体, 产率为每升发酵液收集 12.2 g 菌丝体(干重), 细胞破碎取上清液通过 2 次凝胶柱层析, 冷冻干燥得到亚香棒虫草菌丝体金属硫蛋白纯品。利用考马斯亮蓝法(Bradford 法)进行含量测定, 用银饱和和分析法结合原子吸收光谱(AAS)测定 MT 含量, 用 Ellman's 方法和火焰原子吸收法分别测得巯基含量和结合锌原子数, 用电喷雾质谱仪测得分子量, 全自动氨基酸分析仪测氨基酸组成。通过对羟基自由基、DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的清除率试验探讨亚香棒虫草金属硫蛋白的抗氧化活性。【结果】发酵终点金属硫蛋白产量为 15.3 mg/g 菌丝体湿重。金属硫蛋白的分子量为 7 680 Da, 每分子蛋白质含有 18 个巯基、结合 4 个 Zn 原子。氨基酸组成分析结果显示, 每分子蛋白质共含 60 个氨基酸, 其中含有 15 个半胱氨酸, 且含有组氨酸和芳香族氨基酸。亚香棒虫草金属硫蛋白的抗氧化活性稍强于谷胱甘肽, 弱于动物金属硫蛋白。【结论】亚香棒虫草在 Zn^{2+} 胁迫下能够大量合成金属硫蛋白, 且其金属硫蛋白的性质与哺乳动物金属硫蛋白有相似性。

关键词: 亚香棒虫草菌丝体, 金属硫蛋白, 锌诱导, 氨基酸组成, 抗氧化活性

Purification and characterization of metallothionein in *Cordyceps hawkesii* mycelia

ZHANG Qi¹ CHENG Xian-Hao^{2*} GUO Wen-Juan¹ LIU Feng-Hong² WANG Zhao-Xia²

(1. Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387, China)

(2. Institute of Fungi Science and Technology Research, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China)

Abstract: [Objective] To produce and characterize metallothionein in *Cordyceps hawkesii* mycelia under the zinc ion stress. [Methods] *C. hawkesii* achieved maximum mycelia of 12.2 g/L in a fermenter as Zn^{2+} up to 18 g/L. Pure *C. hawkesii* mycelia Zn-metallothionein was obtained with Sephadex G-50 and desalting Sephadex G-25 gel filtration, dried by freeze-drying. The methods of Bradford and silver saturation with atomic absorption spectrometry analysis were used to separately determine the protein content and MT content. The methods of Ellman's reagent colorimetry and atomic flame absorption spectrometry were used to determine the sulfhydryl content and the number

基金项目: 山东省自然科学基金联合专项项目(No. ZR2010CL005); 烟台市科技发展计划项目(No. 2011069)

*通讯作者: Tel: 86-535-6675148; ✉: chengxianhao@sohu.com

收稿日期: 2013-07-08; 接受日期: 2013-09-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-29

of zinc atoms, respectively. The molecular weight of *C. hawkesii* mycelia Zn-metallothionein was determined by electron spray mass spectrometry (ESMS). Automatic amino acid analyzer measured amino acid composition. The antioxidant activity was identified by scavenging capacity of hydroxyl radicals, DPPH radicals and superoxide anion radicals. **[Results]** The Zn-metallothionein reached 15.3 mg/g mycelium (wet weight) after 64 h of fermentation. The molecular weight of Zn-metallothionein was 7 680 Da. One molecule Zn-metallothionein contained 18 mercapto groups and combined 4 zinc atoms. Amino acid composition analysis shows that each molecule of the protein contained 60 molecules of amino acids, which contained 15 molecules of cysteine, and contained three molecules of histidine and one molecule of aromatic amino acid. The antioxidant activity was slightly stronger than glutathione and weaker than mammal metallothionein. **[Conclusion]** *C. hawkesii* can synthesize Zn-metallothionein under Zn^{2+} stress and the structure was similar to mammalian metallothioneins.

Keywords: *Cordyceps hawkesii* mycelia, Zn-metallothionein, Zinc induced, Amino acid composition, Antioxidant activity

金属硫蛋白(Metallothionein, 简称 MT)是广泛存在于动物、微生物、植物中的一种低分子量(一般为 2–8 kD)、高金属含量、富含半胱氨酸(20%–30%)、不含芳香族氨基酸, 不含或含极少量组氨酸的蛋白质^[1]。真核微生物中分离出的金属硫蛋白基本结构、性质与动物体内的金属硫蛋白类似, 只在半胱氨酸含量、结合金属的数量、氨基酸组成及蛋白质的结构域上略有差别, 故称之为类金属硫蛋白(Metallothionein like protein, 简称 MTL)^[2]。自 1957 年美国生物学家 Margoshes 和 Vallee^[3]发现金属硫蛋白到现在, 金属硫蛋白的药理学及生物学特性已得到广泛研究, 其具有抗氧化、清除自由基、重金属解毒、维持生物体内金属含量动态平衡、提高机体免疫、抗肿瘤等功能^[4]。现如今 MT 的主要来源是动物肝脏, 但其成本高、产量低、生产周期长等缺点使 MT 市场价极高, 严重影响其推广及应用。

本实验室前期工作中发现, 亚香棒虫草(*Cordyceps hawkesii*)菌丝体对锌有超富集能力^[5], 此外亚香棒虫草菌丝体具有来源广泛、发酵周期短、成本低等优点。所以本研究将以深层液态发酵亚香棒虫草菌丝体为研究对象, 研究这种新的材料来源是否能够产生金属硫蛋白, 对 MT 的提取分离过程进行简化, 并进行初步性质鉴定, 以期工业化大量生产 MT 提供合理的开发依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

亚香棒虫草菌株(*Cordyceps hawkesii*), 购于中国林业微生物菌种保藏管理中心, 编号 CFCC 5967。保藏于 PDA 培养基。对于所购菌株进行简单的形态鉴定发现, 其生长茂盛, 在固体培养基上菌落呈白色棉花团絮状, 菌丝排列比较密集; 分生孢子聚集成团, 近椭圆形, 其呈现出的基本形态符合虫草属菌株的基本特征。

1.2 培养基

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 25, 酵母浸粉 5, 蛋白胨 6, 磷酸二氢钾 1, 硫酸镁 1, pH 6.0–7.0。

1.3 液体种子的制备

将保藏菌种接入试管斜面培养基中, 25 °C 培养 8 d, 置于 4 °C 保存。置 200 mL 液体培养基于 500 mL 锥形瓶中, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 每瓶液体培养基中接一块活化好的约 5 mm³ 大小的菌种, 25 °C、150 r/min 摇床中培养 3 d。

1.4 硫酸锌诱导亚香棒虫草菌丝体金属硫蛋白最适浓度的筛选

液体培养基中添加 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Zn^{2+} 的质量浓度设置在 0–20 g/L 范围内, 梯度为 1 g/L, 共设 1 个空白对照组和 20 个实验组, 每组 5 个平行实验。置 200 mL 液体培养基于 500 mL 锥形瓶中,

于 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 接入 5 mL 种子液, 于 25 °C、150 r/min 摇床中培养 8 d。过滤后, 将菌丝体用清水洗 3 次, 分别测其菌丝体的产量、菌丝体中锌含量和菌丝体中 MT 含量。

1.5 亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 发酵罐放大培养
仪器设备: 10 L 发酵罐(SY-3005B, 上海世远生物设备工程有限公司)。

发酵条件^[6]: 装液量 6 L/10 L, 接种量 3%, Zn^{2+} 的质量浓度: 18 g/L, 通气量 0.5 m³/h, 发酵搅拌转速 250 r/min, 发酵温度 26 °C, pH 6.5, 发酵时间 88 h。

1.6 亚香棒虫草菌丝体金属硫蛋白的提纯

将富集锌的亚香棒虫草菌丝体经抽滤除去液体培养基, 用无菌水洗涤 3–4 次, 抽干得到菌丝体; 取研钵研磨后的菌丝体于烧杯中, 加入相当于试样质量 4 倍体积的 1 mol/L NaOH 溶液, 充分搅拌 10 min。煮沸 10 min 破碎细胞且变性除杂蛋白, 冰块迅速制冷, 中和至中性, 于 4 °C、5 000 r/min 离心 20 min。取上清液于 80 °C 水浴中热变性除杂蛋白质 5–10 min, 冷却, 4 °C、10 000 r/min 离心 25 min, 取上清液–20 °C 贮存。

取 35 mL 上清液上样于预先充分平衡好的 Sephadex G-50 ($\phi 5$ cm \times 40 cm) 柱进行分离, 以纯水作洗脱剂进行洗脱, 流速 1.6 mL/min, 每 10 min 收集 1 管。对洗脱液进行紫外(254 nm)和锌信号检测, 收集含锌的蛋白组分, 用旋转蒸发器短时间低温浓缩后真空冷冻干燥, 得到 MT 粗品。用超纯水溶解冻干粉, 上样于预先充分平衡好的脱盐柱 Sephadex G-25 ($\phi 2.5$ cm \times 50 cm), 以超纯水为洗脱剂, 流速 0.8 mL/min, 每 10 min 收集 1 管, 脱盐纯化 2 次, 收集有效锌结合蛋白组分, 真空冷冻干燥得到纯度较高的 MT。

1.7 金属硫蛋白的分析和鉴定

1.7.1 MT 的紫外吸收光谱特征图: 取 1 mg MT 于 500 mL 无菌水中, 在 pH 分别为 8.0 和 2.0 条件下, 210–320 nm 紫外区进行连续扫描, 间隔为 0.5 nm。得到该蛋白组分的紫外吸收光谱特征图。

1.7.2 Zn-MT 的定量测定^[7]: 利用银饱和分析法结合原子吸收光谱(原子吸收分光光度仪 AA800 型, 美国 PE 公司)检测菌丝体中 MT 的含量。利用公式: $\text{MT} (\mu\text{g}/\text{mg 菌丝体}) = (C_{\text{Ag}^+} - C_{\text{BKG}}) \times 3.55 \times V_{\text{T}} / m$ 计算出菌丝体中 MT 的含量。其中, C_{Ag^+} 为最终上清液中 Ag^+ 的质量浓度, C_{BKG} 为不加样品液空白样品最终上清液的读数; V_{T} 为最终总体积; m 为得到样品液所用菌丝体的质量。

1.7.3 蛋白质含量测定^[8]: 利用考马斯亮蓝法(Bradford 法)测定样品中蛋白质的含量。

1.7.4 锌含量测定^[9]: 利用火焰原子吸收法测定样品中 Zn 含量。

1.7.5 巯基含量测定^[10]: 利用简化的 DTNB 法测定巯基含量。

1.7.6 金属硫蛋白分子量测定^[11]: 利用电喷雾质谱仪(Quattro, 英国质谱公司)测定分子量。将金属硫蛋白干粉溶于含 0.1% 乙酸的甲酸溶剂中, 配成 10 mg/L 的待测液。将浓度为 10 mg/L 的待测金属硫蛋白流动注射进样(FIA), 电喷雾离子化正离子方式(ESI+), 毛细管电压 3 850 V, 锥电压 60 V, 干燥气温度 130 °C, 干燥气流速 417 L/h, 雾化气流速 70 L/h, 采集质量范围 0–16 000 (m/z)。由仪器软件计算出分子量。

1.7.7 氨基酸组成测定: 准确称量两份 200 μg 金属硫蛋白冻干粉, 一份中先加入 0.08 mL 过甲酸, –10 °C 充分反应 4 h, 取出后冻干抽去过甲酸, 加蒸馏水再冻干。此份过甲酸氧化的样品和另一份未用过甲酸氧化样品, 各加入 0.8 mL 6 mol/L 恒沸 HCl 溶液于水解管中, 于 110 °C 真空状态下水解 24 h, 启封后加 2 mL 质量浓度为 0.02 mol/L NaOH 静置 4 h, 用 0.1 mol/L 的 HCl 溶液中和后, 用 0.02 mol/L HCl 稀释于 250 mL 容量瓶中, 上机(日立 835-50 型氨基酸自动分析仪)分析氨基酸组成。氨基酸标准和水解样品用茚三酮显色, 在 570 nm 和 440 nm 双波长下测定。过甲酸氧化法用于测得半胱氨酸含量。

1.8 抗氧化性试验

1.8.1 羟自由基的清除率: 按文献[12]方法测定。

1.8.2 DPPH 自由基的清除率: 按文献[13]方法测定。

1.8.3 超氧阴离子自由基的清除率: 按文献[14]方法测定。

2 结果与分析

2.1 亚香棒虫草菌丝体 MT 诱导条件的选择

培养基中加入不同浓度的 Zn^{2+} 后, 亚香棒虫草菌丝体中 Zn 含量、MT 含量和菌丝体产量的变化见图 1。在 0–18 g/L 范围内, 亚香棒虫草菌丝体内富集 Zn 的量与合成 MT 的量正相关, 二者与菌丝体产量呈负相关关系。细胞受到重金属胁迫是菌丝体产量降低的原因之一。由于菌丝体细胞具有自我解毒机制, 因此在重金属胁迫下仍可正常新陈代谢, MT 就是代谢产物之一。在 Zn^{2+} 浓度为 18 g/L 时, 亚香棒虫草菌丝体内合成 MT 的量最大, 经计

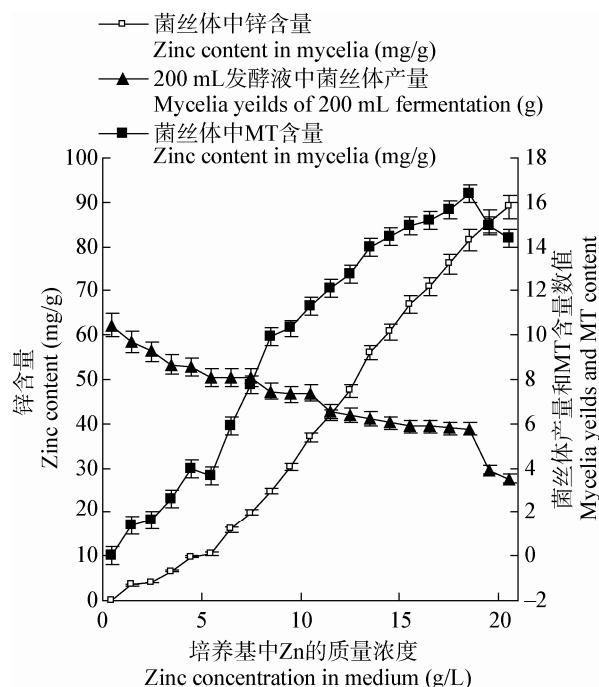


图 1 不同 Zn^{2+} 浓度下亚香棒虫草菌丝体中锌含量、MT 含量和 200 mL 发酵液中菌丝体产量

Figure 1 Zinc and MT contents in *Cordyceps hawkesii* mycelia and mycelia yields of 200 mL fermentation of different zinc concentration

算得 200 mL 发酵液可产生 96 mg MT, 可见此浓度下 MT 总产量较高。当 Zn^{2+} 浓度大于 18 g/L 时, 菌丝体产量锐减, MT 总产量明显下降。出于不同 Zn^{2+} 浓度下发酵液中 MT 总产量的考虑, 确定在发酵罐扩大培养亚香棒虫草菌丝体时, Zn^{2+} 浓度为 18 g/L。

2.2 10 L 发酵罐放大培养亚香棒虫草菌丝体过程发酵终点的确定

在 10 L 发酵罐培养条件下, 亚香棒虫草菌丝体生物量及 MT 随培养时间的变化规律, 见图 2。前 16 h 为调整期, 16–48 h 为对数生长期, 48–64 h 为稳定期, 64 h 以后进入衰亡期。培养至 56 h 时, 菌丝体生物量达到 10.378 6 g/L, 菌丝体内 MT 的含量为 16.365 mg/g 菌丝体湿重, 计算得 MT 总产量为 169.8 mg, 而在 64 h 时生物量高达 12.164 g/L, 菌丝体内 MT 的含量却降低至 15.335 mg/g 菌丝体湿重, 计算得 MT 的总产量为 186.5 mg。从 MT 总产量方面考虑, 确定 10 L 发酵罐扩大培养亚香棒发酵终点为 64 h。

2.3 亚香棒虫草菌丝体金属硫蛋白的纯化

2.3.1 Zn-MT 紫外吸收特征光谱测定: 本研究中的亚香棒虫草菌丝体锌结合蛋白质组分, 在 pH 为 8.0 和 2.0 条件下的紫外吸收光谱特征如图 3 所示。

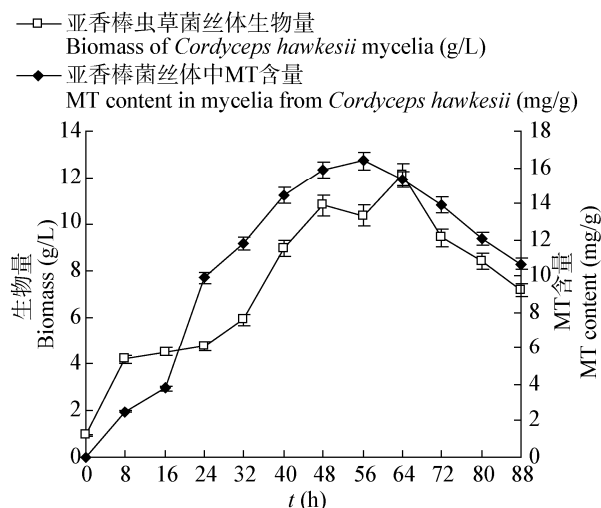


图 2 发酵过程中亚香棒虫草菌丝体生物量与 MT 含量
Figure 2 Mycelia biomass and MT contents of *Cordyceps hawkesii* mycelia in the fermentation process

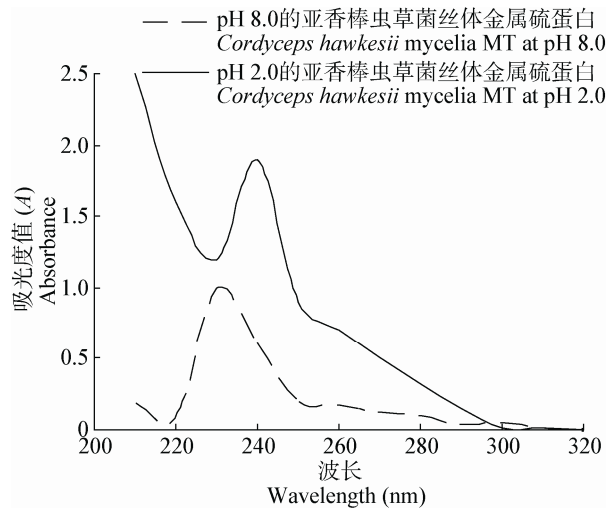


图3 金属硫蛋白紫外扫描光谱图

Figure 3 Ultraviolet absorption spectra of Zn-MT

这种锌结合蛋白在 210–300 nm 范围内出现明显的肩峰。当 pH 2.0 时,蛋白质在 280 nm 处的吸收比在 240–260 nm 范围的吸收少很多;而当 pH 8.0 时此吸收峰仍有部分吸收峰,说明亚香棒虫草菌丝体中的锌结合蛋白含少量芳香族氨基酸,此亚香棒虫草菌丝体金属硫蛋白的光谱特征,与锌结合的兔肝标准金属硫蛋白(Zn-MT)略有不同。在酸性条件下 MT 分子上结合的金属可脱去,去金属的硫蛋白在低 pH 值时较稳定。Zn-MT 在 pH 为 3.5–4.5 时有 50% 的金属离子发生解离,脱金属后的硫蛋白在 190 nm 处有一明显的肽键吸收峰。而在碱性环境下硫蛋白分子之间发生二硫交联,形成稳定的大分子聚合物,使其在 254 nm 附近的吸光度不明显^[15]。可据此对不同种类的 MT 进行分离鉴定。通过对比纯化的亚香棒虫草菌丝体锌结合蛋白组分与标准 Zn-MT 的反相色谱图,可发现二者的脱金属蛋白色谱图相似。参照现有的研究报道,同时鉴于亚香棒虫草菌丝体诱导产生的锌结合蛋白质与哺乳动物提取的 MT 光谱特征具有一定的相似性,基本确定此虫草结合蛋白为本研究所想得到的锌结合硫蛋白(Zn-MT)。

2.3.2 亚香棒虫草菌丝体金属硫蛋白的纯化:经锌诱导的亚香棒虫草菌丝体蛋白质粗提取液用凝胶层析柱 Sephadex G-50 分离的结果如图 4 所示。

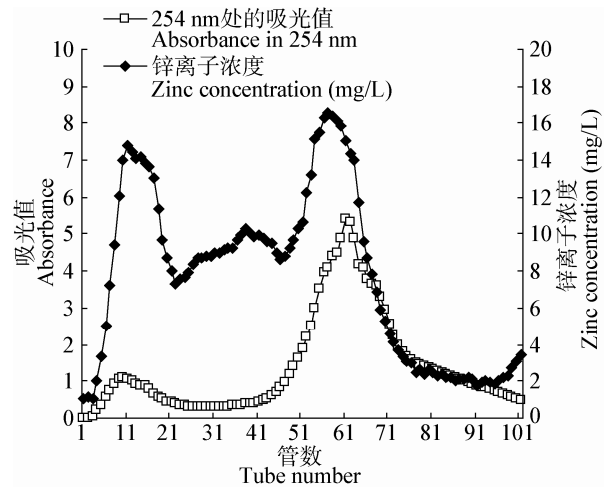


图4 亚香棒虫草菌丝体粗提取液经 G-50 凝胶层析分离的色谱图

Figure 4 Chromatogram of crude protein extract of *Cordyceps hawkesii* mycelia by Sephadex G-50 gel filtration column separation

图 4 第 13 管处有一个较强的紫外吸收峰,对应的锌信号偏低,由其外观都呈淡黄色,可能是分子量较大的色素组分;而图 4 第 61 管处又出现一个强的紫外吸收峰,其对应的锌信号都很强,且由于该峰的洗脱位置与标准兔肝金属硫蛋白的位置基本一致,可推测该峰为本研究所需提取的锌结合硫蛋白组分,收集第二个洗脱峰的有效洗脱液,真空冷冻干燥得到纯度为 55% 以上的呈淡黄色略带腥味金属硫蛋白粗品。超纯水溶解冻干粉,经 Sephadex G-25 层析柱脱盐,收集洗脱峰的有效洗脱液进行真空冷冻干燥,这样可得到纯度为 85% 以上的雪白色无气味的金属硫蛋白精品。

2.4 亚香棒虫草菌丝体金属硫蛋白的性质鉴定

2.4.1 金属硫蛋白性质测定:由图 5 电喷雾质谱的测定结果得到亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 分子量为 7 680 Da。纯化的亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 中含 Zn 量为 34.1 g/g MT, 巯基含量为 2.384 mol/g MT, 由此推算出每分子 Zn-MT 中含 4 个锌原子和 18 个巯基。因半胱氨酸和甲硫氨酸中均含有巯基,由以下氨基酸组成测定结果不难看出所测得的巯基数目与半胱氨酸和甲硫氨酸的总数目相符。

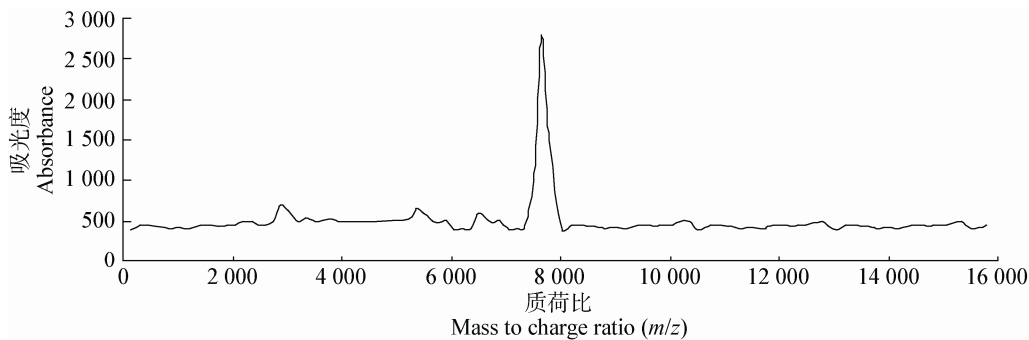


图 5 电喷雾质谱测定分子量
Figure 5 ESMS spectrum of *m/z*

2.4.2 氨基酸组成分析：由氨基酸组成测定显示(表 1)，亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 总数趋近于 60 个氨基酸。其中疏水性氨基酸，如：Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr，共有 15 个，占 25%；半胱氨酸 15 个，占 25%；含有 3 个组氨酸和 1 个酪氨酸等芳香族氨基酸，占 6.7%。而典型的哺乳动物 MT (以

小鼠肝脏 MT- 为例) 每分子含有 18 个半胱氨酸，占 28%，且能结合 7 个锌原子，疏水氨基酸占 22.7%，不含任何芳香族氨基酸或组氨酸^[16]。说明亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 与哺乳动物 Zn-MT 在分子组成具有一定的相似性和差异性。

2.5 亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 的抗氧化性试验

2.5.1 亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 对羟基自由基的清除作用：羟基自由基($\cdot\text{OH}$)具有极高的氧化电位，是目前自然界中所知活性氧自由基中仅次于氟的氧化剂，是对生物体毒性最强、危害最大的一种自由基。大量研究证明，金属硫蛋白和谷胱甘肽对羟基自由基的清除能力很强。以谷胱甘肽清除羟基自由基的能力与亚香棒虫草菌丝体金属硫蛋白清除羟基自由基能力作比较。由图 6 可知，Zn-MT 清除羟基自由基的能力随着 MT 浓度的增加呈增长趋势，且其半数清除率浓度(IC_{50})为 81.14 mg/L，谷胱甘肽的 IC_{50} 为 61.05 mg/L。半数清除率浓度 IC_{50} 大小与其自由基清除能力成反比，即 IC_{50} 越小，表明该种物质清除能力越强。亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 清除羟基自由基的能力弱于谷胱甘肽。

2.5.2 亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 对 DPPH 自由基的清除作用：DPPH 自由基是一种紫黑色的稳定的醇溶性自由基，于 517 nm 波长处有强吸收。通过在 517 nm 处的吸光值来反映自由基被清除的程度，清除自由基的能力越强，其抗氧化活性越高。亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 清除 DPPH 自由基的能力与谷胱甘肽作比较。由图 7 可看出，Zn-MT 对

表 1 亚香棒虫草金属硫蛋白的氨基酸组成 Table 1 Amino acid composition of Zn-MT from <i>Cordyceps hawkesii</i>			
氨基酸 Amino acid	含量 Relative molar quantities (%)	残基数 Probable number of residues	邻近整数 Nearest integer
半胱氨酸 Cys	26.645 3	15.4	15
天冬氨酸 Asp/Asn	6.552 2	3.7	4
苏氨酸 Thr	5.261 7	3.1	3
丝氨酸 Ser	4.883 3	3.3	3
谷氨酸 Glu	10.498 7	4.9	5
脯氨酸 Pro	2.954 5	1.6	2
甘氨酸 Gly/Gln	5.976 6	5.5	6
丙氨酸 Ala	6.498 2	5.1	5
缬氨酸 Val	0.029 7	0	0
甲硫氨酸 Met	2.993 1	2.6	3
异亮氨酸 Ile	4.319 7	2.9	3
亮氨酸 Leu	7.403 6	3.9	4
苯丙氨酸 Phe	0.046 6	0	0
组氨酸 His	6.781 9	3.0	3
赖氨酸 Lys	5.504 9	2.8	3
精氨酸 Arg	0.737 2	0.4	0
酪氨酸 Tyr	2.515 9	1.3	1
总量 Total	99.603 1	59.5	60

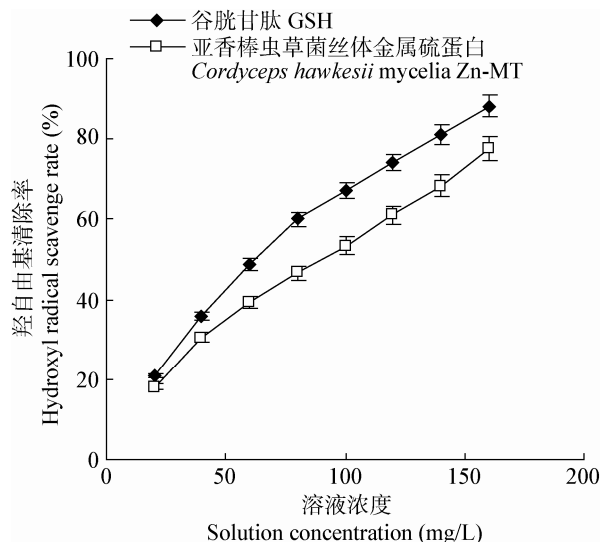


图6 亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 清除羟基自由基的能力
Figure 6 The ability of eliminating hydroxyl radical of *Cordyceps hawkesii* mycelia Zn-MT

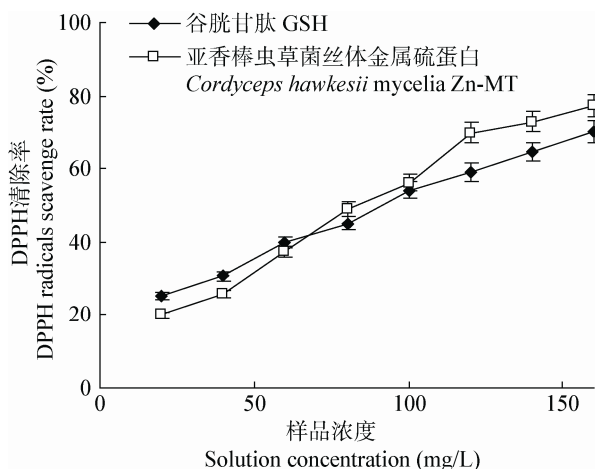


图7 亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 清除 DPPH 自由基的能力
Figure 7 The ability of eliminating DPPH radical of *Cordyceps hawkesii* mycelia Zn-MT

DPPH 自由基的清除能力与其浓度成正比。且亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 和谷胱甘肽的 IC_{50} 分别为 80.37 mg/L 和 82.22 mg/L。按半数清除率浓度看亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 清除 DPPH 自由基的能力稍强于谷胱甘肽。

2.5.3 亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 对超氧阴离子自由基的清除作用: 超氧阴离子自由基具有强氧化性, 是机体内生命代谢产生的寿命很长的自由基。

本实验利用邻苯三酚在碱性环境下发生自氧化反应测定 Zn-MT 对反应体系中产生的超氧阴离子自由基的清除作用。以谷胱甘肽清除超氧阴离子自由基的能力作为比较实验。如图 8 所示, 亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 对超氧阴离子自由基的清除能力随着亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 浓度的增加而增强。其中亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 和谷胱甘肽的半数清除率 IC_{50} 分别为 82.22 mg/L 和 83.53 mg/L。由此可见亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 对超氧阴离子自由基的清除能力稍强于谷胱甘肽。

2.5.4 小结: 谷胱甘肽是一种还原性很强的内源性自由基清除剂, 所以采用谷胱甘肽来做对照实验, 比较本研究中的亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 的抗氧化活性。现已有研究证明典型动物金属硫蛋白抗氧化活性很强, 其清除超氧阴离子自由基的能力约为 GSH 的 25 倍^[1]。而本研究中的虫草菌丝体 MT 的抗氧化能力稍强于谷胱甘肽, 这说明在抗氧化活性方面, 亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 虽强, 但仍弱于典型的动物金属硫蛋白活性。

3 讨论

氨基酸组成分析表明, 亚香棒虫草菌丝体 MT 与典型的哺乳动物 MT (以小鼠肝脏 MT- 为例) 既

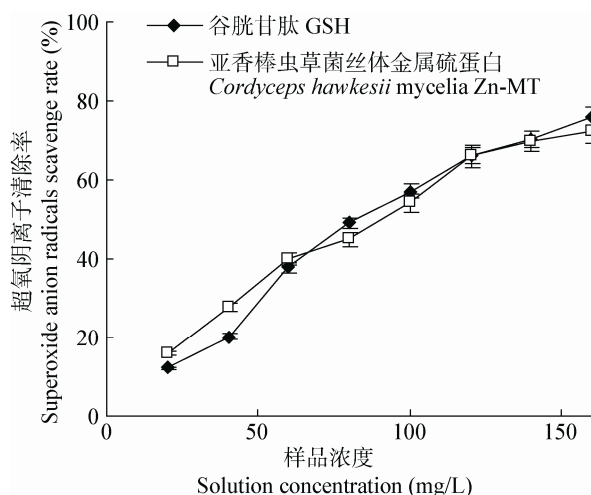


图8 亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 清除超氧阴离子的能力
Figure 8 The ability of eliminating superoxide anion radical of *Cordyceps hawkesii* mycelia Zn-MT

具有一定的相似性,又存在明显的差异;而从氨基酸组成和结合金属原子的量来看与酵母菌 MT^[17]类似。不同生物体内的 MT 结构普遍有差异性。亚香棒虫草菌丝体 Zn-MT 半胱氨酸含量较高,但含有少量芳香族氨基酸和组氨酸,金属结合能力弱于哺乳动物 MT。研究证明典型的动物金属硫蛋白清除自由基的能力远远强于谷胱甘肽,但本研究中的亚香棒虫草菌丝体 MT 清除自由基的能力只是稍强于谷胱甘肽而已。以上说明亚香棒虫草菌丝体 MT 相对于哺乳动物 MT 来说,是一种进化上功能趋同于动物 MT,高级结构上相似于动物 MT^[18]的虫草金属结合蛋白,是亚香棒虫草菌丝体能够耐受环境中金属污染的重要原因之一。

目前虫草菌丝体金属硫蛋白研究很少,本研究提供了一种有效的、简化的金属硫蛋白提纯方法;对亚香棒虫草菌丝体 MT 进行初步性质鉴定,确定一种新的能够生产金属硫蛋白的材料与方法。对于虫草菌丝体金属硫蛋白高级分子结构以及金属与巯基的络合常数的测定有待进一步研究。

到目前为止,金属硫蛋白的商业化生产和研究性提纯主要依据动物肝脏或植物提取工艺,这些工艺具有操作复杂、成本高、生产周期长、产率低等缺点,极大地影响了金属硫蛋白的研究和应用。本文以亚香棒虫草菌株为材料,采用液态深层发酵并用 ZnSO₄ 胁迫其菌丝体合成金属硫蛋白,发酵终点时产率为 15.335 mg/g (菌丝体湿重),相较于传统的提纯方法,其生产周期缩短、工艺简化、产率提高、成本降低。

亚香棒虫草菌丝体金属硫蛋白的产量受环境中锌离子浓度的影响变化显著,亚香棒虫草菌丝体对金属离子有明显的富集作用,由此可以判断亚香棒虫草菌丝体耐受环境中金属污染的一种原因之一是金属诱导其产生大量金属硫蛋白,把有害金属以游离离子的形式转化为无害的蛋白结合形式。鉴于亚香棒虫草菌丝体在大规模发酵培养上的优越性,其金属硫蛋白会有在工业化生产的潜力。

参 考 文 献

- [1] Thornalley PJ, Vařák M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1985, 827(1): 36-44.
- [2] Kojima Y. Definitions and nomenclature of metallothionein[J]. *Methods in Enzymology*, 1991, 205: 8-10.
- [3] Margoshes M, Vallee BL. A cadmium protein from equine kidney cortex[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1957, 79(17): 4813-4814.
- [4] 成玉梁,姚卫蓉. 产金属硫蛋白(Cu-MT)酿酒酵母诱导条件优化[J]. *中国酿造*, 2008(18): 12-13.
- [5] 于德洋. 亚香棒虫草的培养特性及对锌锰的抗性和富集机制[D]. 烟台: 鲁东大学硕士学位论文, 2012: 4,20.
- [6] 傅岚,黄红英,陈作红. 古尼虫草液体深层发酵条件的研究[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2004, 27(2): 71-74.
- [7] 张保林,盛湘蓉,刘兴军,等. 金属硫蛋白测定方法—银饱和分析法[J]. *药物生物技术*, 1996, 3(1): 31-33.
- [8] 张志涛,刘金生,许强,等. Bradford 法测定牛奶中蛋白质含量[J]. *食品与机械*, 2011, 27(5): 1003-5788.
- [9] 刘鸣. 火焰原子吸收法测定清洁水中痕量铜铅镉—高效富集[J]. *环境科学与技术*, 2006, 29(B08): 54-55.
- [10] Vallee BL. Introduction to metallothionein[J]. *Methods in Enzymology*, 1991, 205: 3-7.
- [11] 孔毅,吴梧桐,吴如金. 蛋白质分子量测定方法比较研究[J]. *分析仪器*, 2003, 2(1): 44-46.
- [12] 沈晗,金志刚,孙宝国,等. 酱渣多肽及其美拉德热反应产物的抗氧化性[J]. *北京工商大学学报: 自然科学版*, 2010, 28(2): 6-9.
- [13] 宋佳天. 大豆蛋白的水解及类蛋白反应对其抗氧化性的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2011.
- [14] 张文博. 富硒丹参次生代谢产物含量、指纹图谱和体外抗氧化活性研究[D]. 成都: 成都理工大学硕士学位论文, 2012.
- [15] Huang ZY, Zhang Q, Chen J, et al. Bioaccumulation of metals and induction of metallo-thioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium, mercury and lead[J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 2007, 21(2): 101-107.
- [16] 茹炳根,潘爱华,王正新,等. 小鼠肝脏金属硫蛋白 Metallothioneins 的分离纯化与鉴定[J]. *生物化学杂志*, 1991, 7(8): 285-290.
- [17] 李明春,李登文,胡国武,等. 酵母菌类金属硫蛋白的分离纯化及性质鉴定[J]. *菌物系统*, 2001, 20(2): 214-221.
- [18] Olafson RW. Electrochemical characterization of metallothionein metal-mercaptide complexes: application of cyclic voltammetry to investigation of metalloproteins[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1988, 253(1): 111-125.