

# 柠康酸培养体系对 *A. pascens* DMDC12 的胁迫作用 与其 SOD 活性的提高

刘妮娜<sup>1</sup>, 方民<sup>2</sup>, 叶艳华<sup>1</sup>, 何冰芳<sup>1</sup>

(1. 南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

(2. 无锡市日用化工应用研究所, 江苏 无锡 214045)

**[摘要]** 研究报道了野生型高度耐盐节杆菌(*Arthrobacter pascens* DMDC12)经柠康酸体系培养后,导致胞内超氧化物歧化酶(SOD)大量表达.该菌的无细胞粗酶液 SDS-PAGE 表明,随着培养过程中碳源柠康酸的利用,亚基相对分子质量约为 25 000 处的蛋白产生了显著诱导,经 N-末端测序表明该蛋白为 SOD,无细胞粗酶液酶活可达 787 U/g 湿菌体.4 种不同培养体系对该菌 SOD 活性影响表明,常规的葡萄糖、酵母膏或柠檬酸作为碳源或能源时,菌体的 SOD 处于较低水平,发酵液 pH 呈碱性可对该菌 SOD 有一定促进作用.在柠康酸培养体系中,无细胞粗酶液 SOD 的比活为常规培养基培养后的 2.3~4.3 倍,表明除 pH 外尚存在其他因素比如某种中间代谢物对菌体产生的胁迫压力显著促进了 SOD 的表达.本研究首次报道微生物生长环境胁迫作用对菌体 SOD 活力的影响,相关结论对利用微生物生存胁迫手段促进菌体大量产生 SOD 具有重要的指导作用.

**[关键词]** 节杆菌,超氧化物歧化酶,环境胁迫,诱导

**[中图分类号]** Q 936 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)04-0069-04

## Stress of Media of Citroconic Acid on *A. pascens* DMDC12 and Increase of its SOD Activity

Liu Nina<sup>1</sup>, Fang Min<sup>2</sup>, Ye Yanhua<sup>1</sup>, He Bingfang<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Pharmaccutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

(2. Applied Institution of Commodity and Chemical Engineering, Wuxi 214045, China)

**Abstract:** A halophilic *Arthrobacter pascens* DMDC12 is cultured in media with citraconic acid as carbon resource. SDS-PAGE analysis of its cell-free extract shows that a protein of molecular weight 25 000 is obviously induced during the cell growth. This protein is identified as superoxide dimutase (SOD) by N-terminal amino acid analysis. The content of SOD reaches 787 U/g fresh cells. To determine the inductive factor of SOD, *A. pascens* DMDC12 is cultured in four kinds of media. The relative activity of SOD in cell-free extract are much lower when glucose or yeast extract is used as the main energy source. The SOD activity is significantly enhanced when cells are incubated in citraconate media. The activity is about 4.3 fold, 3.5 fold, and 2.3 fold of that incubated in the media with glucose, yeast extract and citric acid as energy source. The result suggests that the induction of SOD is caused not only by the pH shift, but also by some other factors in the media environment during cultivation. This report documents the first significant enhancement of SOD activity of *A. pascens* DMDC12 by the growth environmental stress. These results will contribute to breeding efficient SOD producing strain and improve SOD activity of microorganism using growth environmental stress.

**Key words:** halophilic *Arthrobacter*, superoxide dismutase, environmental stress, induction

收稿日期: 2006-04-20.

基金项目: 国家 973 项目资助项目(2004CB719600).

作者简介: 刘妮娜, 女, 1981—, 硕士研究生, 主要从事微生物理论与应用的学习与研究. E-mail: iamnina\_liu@163.com

通讯联系人: 何冰芳, 女, 1962—, 博士, 教授, 主要从事微生物理论与应用的教学与研究. E-mail: bingfanghe@njut.edu.cn

## 0 引言

SOD(Superoxide dismutase)即超氧化物歧化酶是生物体防御氧化损伤的一种十分重要的生物酶,已广泛应用于医药、化妆品及食品等领域<sup>[1]</sup>. SOD 来源广泛,有关动物、植物及微生物(尤其是酵母等真菌)中 SOD 的报道已有很多. 张博润<sup>[2]</sup>等采用常规筛选法从不同属种酵母中筛选到生物量和 SOD 含量较高的菌株,继而采用化学诱变等手段选育出一株 SOD 高达 1 350 U/g 湿菌体的 SOD 高产菌株. 郑铁曾<sup>[3]</sup>试用固体培养法筛选出 SOD 高产菌株 T-41,并将其纯化,终比活力达 4 685 U/mg. 屠幼英<sup>[4]</sup>等研究了嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)中的 SOD,并从中提取了 Mn 型 SOD,比活达 3 000 U/mg. 朱文杰<sup>[5]</sup>,李伟<sup>[6]</sup>从东方弧菌(*Vibrio orientalis*)和苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)中分离到了 Fe 型 SOD,纯化后比活分别达到 4 000 U/mg 和 700 U/mg,并对其性质进行了研究.

目前,国内市场上的 SOD 多数来源于动物血液,鉴于动物血液可能存在生物制品安全性等问题,同时微生物还具有易大规模培养等优势,因此高产 SOD 菌株选育具有重要的理论和实际意义<sup>[7]</sup>. 此外,SOD 是生物体中一种抗氧化应激酶,随着微生物生存环境的改变可能产生表达量的差异. 目前,仅有采用辐射、化学诱变等手段来提高 SOD 活力的研究;但未见有在生存环境胁迫情况下造成 SOD 活力显著差异的相关报道. 本文在研究一株耐盐杆杆菌 *A. pascens* DMDC12 在诱导产生马来酸水合酶的过程中,发现了柠檬酸培养基能有效促进 SOD 的产生,并深入探讨了一般生长条件与环境胁迫生存条件对 SOD 比活力的影响. 表明微生物在培养过程中,适当的环境胁迫能显著促进或诱导菌株 SOD 的活力.

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌种和培养方法

节杆菌(*A. pascens* DMDC12)由本研究室筛选并保存<sup>[8]</sup>.

平板培养基(g/L):柠檬酸 5,酵母提取物(YE)0.1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.015,  $\text{MgSO}_4$  0.5,琼脂 15, pH 7.5.

发酵培养基(g/L):YE 2.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.015,  $\text{MgSO}_4$  0.5, pH 7.2. 分别添加柠檬酸或葡萄糖或酵母提取物或柠檬酸至终浓度 5 g/L 为碳源或能源.

培养温度 30 ℃,转速 200 r/min.

### 1.2 使用试剂和仪器

柠檬酸为和光纯药公司(日本)产品,酵母提取物为 DIFCO(USA)产品,SOD 标准品由无锡日用化工应用研究所提供,其余生化试剂均为国产和进口分析纯. 细胞破碎仪为 Thermo spectronic(USA)产品.

### 1.3 无细胞粗酶液(Cell free extract)

发酵液离心,收集菌体,用 50 mmol/L pH 7.6 的磷酸缓冲液配成适当浓度的菌悬液. 压力破碎仪于 1 200 MPa 下破碎 3 次. 12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液即为粗酶液.

### 1.4 酶活力测定

参照袁勤生的微量邻苯三酚法<sup>[9]</sup>,以抑制 50 mmol/L 邻苯三酚自氧化速率 50% 时所需酶量定义为一个酶活力单位.

### 1.5 蛋白质含量测定

参照 Bradford 法<sup>[10]</sup>,以牛血清白蛋白为标准蛋白.

### 1.6 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

参照蔡武城的方法<sup>[11]</sup>进行. 标准蛋白相对分子质量分别为:磷酸酶 b—97 200,牛血清蛋白—66 409,卵清蛋白—44 287,碳酸酐酶—29 000,胰蛋白酶抑制剂—20 100,溶菌酶—14 300.

### 1.7 半干转移

参照郭尧君的方法<sup>[12]</sup>,菌体破碎后上清经 SDS-PAGE 电泳后,采用考马斯亮蓝 R-250 染色,将染色后的凝胶通过半干转移系统转到 PVDF 膜.

### 1.8 N-末端氨基酸序列测定

根据 PVDF 膜上的条带,剪下 25 000 处的相应条带进行 N-末端氨基酸序列测定,相关测定委托日本

筑波大学应用生化系测试中心完成.

2 结果与讨论

2.1 节杆菌(*A. pascens* DMDC12)的生长曲线与 SOD 的表达量

节杆菌为高效的 D-苹果酸生产菌.节杆菌在柠檬酸培养基中经诱导产生马来酸水合酶时的生长曲线呈现“二级生长”的趋势(见图 1),在发酵前期,培养基中酵母膏等易被该菌体所利用,pH 稳定.当酵母膏耗尽后菌体转为利用柠檬酸时,pH 呈现较明显的上升趋势,22 h 后 pH 缓慢上升.发酵各时间段取样细胞破碎后的上清液的 SDS-PAGE 图谱(见图 2)显示,亚基相对分子质量约 25 000 处的蛋白条带随着培养时间延长出现显著递增现象,表明该蛋白在培养过程中表达量明显增加,此时 SOD 比酶活可达 787 U/g 湿菌体.该活力远高于一般的原核生物,甚至高于一些真核生物的 SOD 活性.

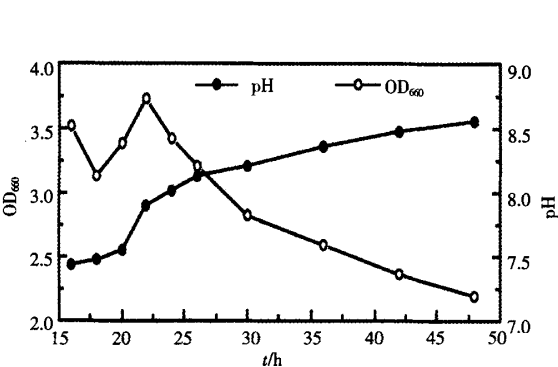


图 1 节杆菌 DMDC12 发酵生长曲线

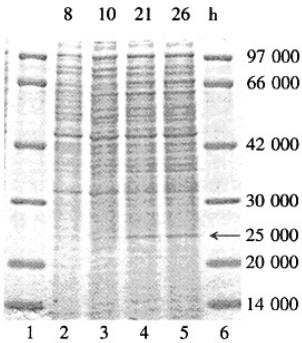


图 2 不同培养时间粗酶液的 SDS-PAGE 图谱

1,6: protein marker  
2,3,4,5: the cell harvested at 8,10,21,26 hour

2.2 亚基相对分子质量约 25 000 处蛋白的 N-末端氨基酸测序及序列比对

为进一步鉴定 25 000 万相对分子量处的蛋白条带,通过半干转移将电泳后的聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜,剪下 PVDF 膜处 25 000 相对分子质量蛋白条带进行 N-末端测序.测序结果显示,该蛋白 N-末端的前 20 个氨基酸为 TEYVLP ELSYDYAALEPKIS.将该序列输入 NCBI 并用 Blast 软件进行比对,发现 N-端 20 个氨基酸与报道的一株节杆菌来源的 SOD 酶的 N-末端完全相同且分子量大小相近,显示该条带蛋白为 SOD.同时表明,该节杆菌在柠檬酸体系的培养过程中由于某种因素显著促进了超氧化物歧化酶的表达.

2.3 不同培养体系对菌体 SOD 活性的影响

为了考察柠檬酸培养体系对促进节杆菌中 SOD 表达的可能因素,作者设计了 4 种培养体系.结果表明,不同培养体系中的菌体 SOD 活性高低存在较明显的差异(见表 1).

表 1 4 种发酵培养体系对节杆菌 SOD 活性的影响

Carbon source	Glucose			Yeast extract			Citric acid			Citraconic acid			
	OD <sub>660</sub>	pH	SOD (U/mg)	OD <sub>660</sub>	pH	SOD (U/mg)	OD <sub>660</sub>	pH	SOD (U/mg)	OD <sub>660</sub>	pH	SOD (U/mg)	
Time	10 h	3.43	6.92	33	3.17	7.42	34	1.90	7.72	44	1.79	7.49	42
	16 h	5.37	6.88	31	4.15	7.79	42	2.71	8.53	65	2.76	7.74	88
	21 h	5.09	7.06	35	4.23	8.03	43	2.22	9.18	61	2.74	8.43	151

The cells were grown on the fermentational media with different carbon source.

在葡萄糖培养体系中,整个过程中 SOD 表达量几乎不变;在酵母提取物为主要能源的培养过程中,SOD 表达略有增高,可能是与有机氮的增加有关;以柠檬酸为碳源的培养体系主要是考察发酵液 pH 的改变是否对 SOD 的表达产生显著影响.柠檬酸体系中培养菌体的 SOD 活性略高于葡萄糖和酵母提取物体系,而柠檬酸是三羧酸循环的中间体,其代谢方式应与葡萄糖有氧分解部分类似,酸性物质的利用使得培养过程中 pH 显著上升,SOD 活性呈小幅度增加,表明环境 pH 可能对菌体生长产生一定胁迫作用从而影响 SOD 的活性.柠檬酸体系的 SOD 酶活分别为葡萄糖、酵母膏或柠檬酸体系的 4.3 倍、3.5 倍和 2.3 倍,

而其 pH 变化幅度低于柠檬酸体系,说明在柠檬酸体系中除 pH 的影响外尚有其他因素显著促进了 SOD 的表达。

柠檬酸是马来酸水合酶的诱导剂,在柠檬酸的培养体系中,可产生高活力的马来酸水合酶<sup>[8]</sup>和 SOD。为了排除 SOD 与马来酸水合酶存在于相同启动子下的可能性,作者采用 SOD 活性氧诱导的方法:在以葡萄糖为碳源的体系中添加诱导剂 N - [ 2 - ( 2 - oxo - 1 - imidazolindinyl ) - ethyl ] - N - phenylurea ( EDU ),发现 SOD 活性被诱导出来,而马来酸水合酶活性仅为柠檬酸诱导时的 1/20 ( 实验结果见表 2 )。由此证明两者的基因并非存在于相同的启动子控制下,因此柠檬酸体系对 SOD 的诱导,可能是某种中间代谢物对菌体产生的胁迫压力所致。实际上,微生物在环境中承受着各种理化因素的影响,并逐渐形成各种保护机制,产生诸如 SOD 等应激酶<sup>[13]</sup>。但该体系中究竟是什么因素显著促进了 SOD 的诱导,还有待进一步研究。

表 2 不同诱导剂对马来酸水合酶和 SOD 的诱导作用

Carbon Source & inducer	Maleate hydratase/( U/mg)	SOD/( U/mg)
Glucose & EDU	0. 21	85
Citraconic acid	4. 212	147

3 结论

高度耐盐节杆菌 (*A. pascens* DMDC12) 是制备 D - 苹果酸的高产菌,菌体粗酶液的 SDS - PAGE 表明,该菌经柠檬酸体系培养后,相对分子量 25 000 处的蛋白产生了显著的诱导。该蛋白的 N - 末端测序和序列比对表明其为 SOD。采用相同浓度的柠檬酸、葡萄糖、酵母提取物及柠檬酸发酵体系,进一步研究柠檬酸培养体系诱导 SOD 的可能原因,发现不同的培养条件会显著影响 SOD 的活性。其中,发酵液 pH 升高对 SOD 有一定的促进。除了 pH 的影响外,可能还存在某种中间代谢物对菌体产生胁迫压力,激发了机体的应激保护机制,促使 SOD 更多的表达。该研究表明,在选育 SOD 高产菌的同时,微生物的生存环境的胁迫作用也能明显促进 SOD 的进一步表达。相关结论对微生物采用合适的生存胁迫手段有效提高 SOD 表达量具有重要的指导意义。

[参考文献]

[1] 王素芳,蒋琳兰. 微生物超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 药物生物技术,2002,9(6):378-380.  
[2] 张博润,田宇清,黄英,等. 酵母超氧化物歧化酶高产菌的选育[J]. 微生物学报,1994,34(4):279-284.  
[3] 郑铁曾,涂提坤. 产 SOD 微生物的筛选[J]. 天津微生物,1996,4(1):1-3.  
[4] 屠幼英,倪福弟,陆应钰. 从嗜热菌中提取 SOD 的研究[J]. 微生物学通报,1992,19(1):18-20.  
[5] 朱文杰,宋瑛,汪杰. 东方弧菌 SOD 的分离纯化和特性研究[J]. 华东师范大学学报:自然科学版,1995(1):90-95.  
[6] 李伟,夏立秋,王先酉. 苏云金杆菌超氧化物歧化酶的纯化和性质研究[J]. 武汉大学学报:自然科学版,2003,49(2):247-251.  
[7] 王岁楼,张平之. 微生物 SOD 的提纯,育种及分子生物学研究[J]. 微生物学杂志,1996,16(4):6-11.  
[8] He Bingfang, Toshiaki Nakajima-Kambe, Tetsuo Ozawa, et al. Production of D-malate and D-citramalate by *A. Pascens* DM-DC12 having stable citraconase[J]. Process Biochemistry, 2000, 36:407-414.  
[9] 邓碧玉,袁勤生,李文杰. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(2):163.  
[10] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye bineling[J]. Anal Biochemistry, 1976, 72:248-255.  
[11] 杨建雄. 生物化学与分子生物学实验技术教程[M]. 北京:科学出版社,2002:133-146.  
[12] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,1999:319-322.  
[13] Nicholas J, Wood J S. Catalase and superoxide dismutase activity in ammonia-oxidising bacteria[J]. FEMS, 2001, 38(4):53-58.

[责任编辑:孙德泉]