

高超氧化物歧化酶活性海洋红酵母的筛选

王洛洋, 纪政, 胡宗仁, 王璐思, 王晓兰, 关洪斌*

(山东大学威海分校海洋学院, 山东 威海 264209)

摘要: 为了提高海洋红酵母超氧化物歧化酶的活性, 寻找一种可以从众多菌株中定向筛选超氧化物歧化酶高产菌株的方法, 通过在培养基中添加百草枯并逐级提高、层层筛选, 筛选出了超氧化物歧化酶活性较高的菌株并研究了不同程度的氧化胁迫对海洋红酵母的生长状况、超氧化物歧化酶活性及虾青素质量分数的影响。结果表明: 在百草枯浓度为 0.075 mmol/L 的条件下, 可大大提高超氧化物歧化酶活性; 经逐步提高百草枯浓度所筛选的菌株超氧化物歧化酶比活性提高 35.2%; 而所筛菌株在含 0.075 mmol/L 的百草枯培养基中培养后, 超氧化物歧化酶比活性较初始菌株提高 103.7%, 差异显著 ($p < 0.05$)。这说明使用该方法可以达到筛选超氧化物歧化酶高产菌株的目的, 而在培养基中添加低浓度的百草枯同样可提高海洋红酵母的超氧化物歧化酶活性。

关键词: 海洋红酵母; 百草枯; 超氧化物歧化酶; 虾青素; 筛选

中图分类号: TQ 926 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)04-0433-05

Screening of *Rhodotorula marina* of High Superoxide Dismutase Activity

WANG Luo-yang, JI Zheng, HU Zong-ren, WANG Lu-si,
WANG Xiao-lan, GUAN Hong-bin

(College of Marine, Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China)

Abstract: To improve the superoxide dismutase activity of *Rhodotorula marina*, a screen method with paraquat as drug was introduced in this study. Though gradually increasing of paraquat content in medium, a strain with of high superoxide dismutase activity (increased by 35.2%) was screened. Based on this, the effect of different oxidative stress to the growth, superoxide dismutase activity and astaxanthin content was investigated. The results indicated that 0.075 mmol/L paraquat could improve the superoxide dismutase activity by 103.7% when compared with that of the control, ($p < 0.05$). This shows that this method can achieve the purpose of screening strain with high superoxide dismutase activity, and culturing with low concentrations of paraquat can also improve the superoxide dismutase activity of *Rhodotorula marina*.

Key words: *Rhodotorula marina*, paraquat, superoxide dismutase, astaxanthin, screening

自从生物选择了氧气, 新陈代谢大大加快, 进化提速, 但有氧代谢所产生的活性氧却也不可免的

会对机体造成伤害。为此, 生物体进化出了酶促和非酶促反应两套活性氧清除系统。超氧化物歧化

收稿日期: 2011-04-11

基金项目: 山东大学威海分校科研立项项目(A10026)。

*通信作者: 关洪斌(1961-), 男, 黑龙江依兰人, 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事逆境生理、基因表达、饵料诱食剂研究。

E-mail: guanhongbin@sdu.edu.cn

酶(SOD, Superoxide Dismutase)和虾青素(Astaxanthin)就分属于以上两套系统。超氧化物歧化酶(EC 1.15.1.1)是催化生物体中 $O_2^{\cdot-}$ 分解,保护细胞免受损伤的一类金属酶,广泛存在于需氧和耐氧生物体内^[1],在临床医药、食品、化妆品及农业、渔业等方面均有应用^[2]。而虾青素可有效淬灭单线态氧和清除自由基,其抗氧化能力是维生素E的100倍。红酵母属的一个显著特征就是可产虾青素。因而,对如何筛选高产虾青素的海洋红酵母的相关研究较多。同时,酵母菌作为单细胞真核微生物,细胞质内含真核生物特有的Cu, Zn-SOD,开发利用价值较大,因而酵母菌也被视为生产SOD的重点研究对象^[3]。但目前对酵母菌的虾青含量和SOD活性的综合研究较少,且各高产菌株的筛选多采取直接从自然界筛选后经诱变处理,逐株检测的方法。此法固然有效,但是工作量大,目的性不强,同时可能会是高产菌株因没有被检测到而流失。目前,尚没有有关定向筛选高产SOD活性菌株方法的报道。

一种ROS(活性氧)的预处理使机体不仅耐受了这种特定的ROS,还能全面的耐受其他多种ROS,于是全面提高各种抗氧化酶活性^[4]。Hassan等^[5]发现百草枯对*E. coli*(大肠杆菌)中Mn-SOD的表达有诱导作用。这是因为,百草枯(1,1-二甲基-4,4'-联吡啶鎓盐二氯化物)可在氧化还原反应中作为电子受体,在细胞内经呼吸链电子传递可产生氧自由基。而氧自由基的存在正好诱导了Mn-SOD的大量生成,从而使*E. coli*对百草枯的毒性具有抵御功能。但SOD对活性氧的清除能力是有限的,超过这个限度就会对机体产生伤害。据报道,Cu²⁺可使虾青素的合成降低而致使虾青素低产菌株因失去保护而被淘汰,因此可将Cu²⁺作为虾青素高产菌株的筛选剂^[6]。有鉴于此,作者通过研究不同百草枯浓度对海洋红酵母得虾青素质量分数、SOD活性等抗氧化性能指标及生物量的影响,旨在通过外加氧化胁迫淘汰抗氧化能力较低的菌株以期筛选得到抗氧化性能较高的菌株,并为相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 实验用海洋红酵母菌种购自大连健

洋生物科技有限公司。

1.1.2 培养基 酵母膏5g、蛋白胨10g、葡萄糖20g、陈海水1000mL、链霉素300U/mL,上述培养基中加20g琼脂制成固体培养基。

1.1.3 试剂 百草枯:四川西亚化工股份有限公司;邻苯三酚、丙酮、异丙醇、盐酸等:均为分析纯。

1.1.4 仪器 生化恒温培养箱、摇床、752型紫外可见分光光度计、SP-DJ系列净化工作台、电子分析天平等。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化与培养 挑取菌种于斜面上28℃活化三代后(每代24h),挑取两环培养物接种于装有40mL液体培养基的150mL锥形瓶中。28℃摇床扩培24h后,以体积分数10%的接种量转接至实验各组的液体培养基中,28℃、150r/min摇床培养3d。

1.2.2 菌体收集 将发酵培养基以3000r/min离心15min后弃上清液,再水洗两遍,每次以3000r/min离心10min,弃上清液,收集得湿菌体,低温烘干测干重。

1.2.3 SOD提取及酶活测定 SOD释放及酶活测定(微量邻苯三酚法)参照文献进行^[7]。

1.2.4 虾青素提取及质量分数测定 参照文献^[8]。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的百草枯对海洋红酵母生存的影响

在液体培养基中加入百草枯配成不同浓度梯度的培养基,培养50h后于600nm下测吸光度值,结果见图1。从图1可以看出:低浓度的百草枯不会对海洋红酵母的生存构成威胁,但百草枯浓度超过0.2mmol/L时,海洋红酵母的细胞密度迅速下降。这表明海洋红酵母的抗氧化能力存在一定的限度,超过该限度便不能生存。据报道,在0.4~1.0mmol/L的百草枯浓度下,大肠杆菌的细胞密度随浓度升高下降,超过1.2mmol/L时几乎不能生存^[9]。这说明原核与真核生物的抗氧化能力存在较大差异。同时也表明,通过控制百草枯的浓度可以淘汰掉大部分菌株,进而有可能筛选得到抗氧化性能优越的菌株。

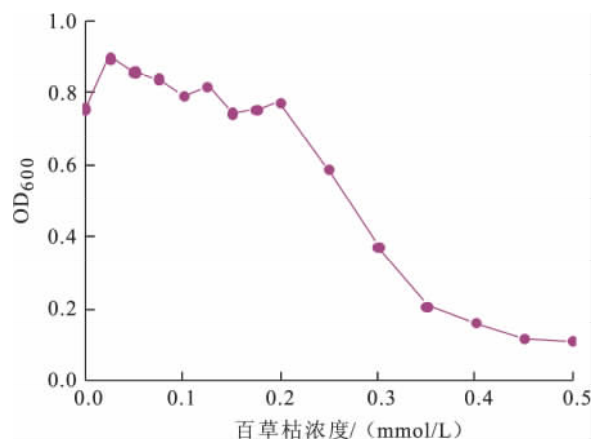


图1 百草枯对海洋红酵母生存的影响

Fig. 1 Effect of paraquat on the survival of *Rhodotorula marina*

2.2 不同百草枯浓度下海洋红酵母的生长曲线

选择了在百草枯浓度分别为 0、0.075、0.150 mmol/L 的条件下每 8 小时于 600 nm 处测吸光度值,绘制生长曲线,结果见图 2。由图 2 可知:在较低的浓度下,百草枯不仅不会对海洋红酵母的生长产生不良影响,反而可以加快其繁殖能力。相类似的是,有实验结果表明,低浓度的 $O_2^{\cdot-}$ 可刺激叙利亚地鼠胚胎成纤维细胞的分裂能力^[10]。因此,在实际生产中可以考虑有低浓度的氧胁迫加快生产菌株的分裂速度,缩短生产周期。

2.3 不同浓度的百草枯对海洋红酵母 SOD 活性及虾青素质量分数的影响

在不同的百草枯浓度下,培养 30 h 后于 600 nm 处测吸光度值;培养 72 h 后分别测其 SOD 活性及虾青素质量分数,结果见图 3、4。由图 3、4 可以

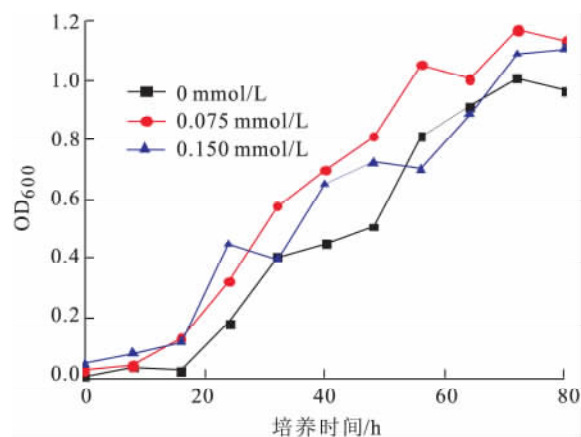


图2 不同百草枯浓度下海洋红酵母的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of *Rhodotorula marina* under different paraquat concentration

看出:SOD 酶活、虾青素质量分数以及海洋红酵母的生物量会随培养基中百草枯浓度的增加而波动。大约在百草枯浓度为 0.075 mmol/L 时,SOD 酶活以及海洋红酵母的生物量都较理想且虾青素质量分数此时也可以接受。这与 Bifeng Gao 等^[11]报道的 20 $\mu\text{mol/L}$ 的百草枯可显著提高转人类 SOD 基因的大肠杆菌 Mn-SOD 的合成相似,低浓度百草枯胁迫可以提高 SOD 比活。同时我们还发现,在培养 30 h 后,海洋红酵母的 $OD_{600\text{ nm}}$ 与 SOD 活性之间存在明显相关性,在百草枯浓度低于 0.075 mmol/L 时,其线性相关系数 $R^2 = 0.984$ 。在培养 30 h 后海洋红酵母的生长进入对数期,其 $OD_{600\text{ nm}}$ 值可反映其细胞分裂速度。因此,在 SOD 与细胞分裂间可能存在某种联系。

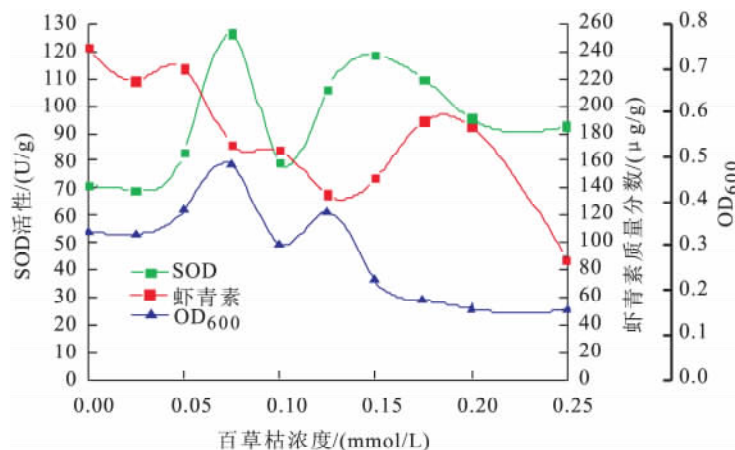


图3 不同浓度的百草枯对海洋红酵母抗氧化性能的影响

Fig. 3 Antioxidants of *Rhodotorula marina* under different concentration of paraquat

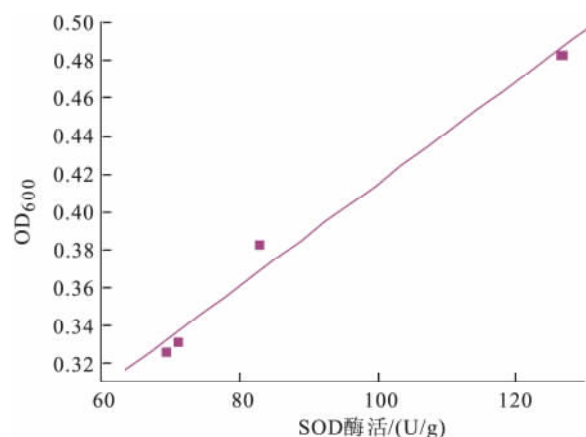


图4 SOD活性与生物量间的相关性

Fig. 4 Correlation between SOD and biomass

表1 百草枯处理对海洋红酵母抗氧化性能的影响

Tab. 1 Antioxidants of *Rhodotorula marina* treated with paraquat

菌株	生物量/ (g/L)	SOD 比活/ (U/g)	SOD 总量/ (U/L)	虾青素质量分数/ (μg/g)	虾青素产量/ (μg/L)
对照	4.55±0.05	61.80±6.10	579±69	250.50±14.09	1139.8±51.5
所筛菌株	3.00±0.38*	83.57±10.98	427±53	112.98±2.58*	336.3±44.5*
在含百草枯的培养基中 培养的所筛菌株	2.60±0.08**	126.87±13.90*	522±19	106.31±2.37**	274.5±53.5**

注: * 表示与对照组差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)。

采用 SPSS 进行显著性 t 检验,结果表明:所筛菌株在相同条件下(即不含百草枯)培养后与初始菌株相比其生物量、虾青素质量分数及产量均显著下降($p < 0.05$);而于 0.075 mmol/L 的百草枯浓度下培养的所筛菌株的生物量、虾青素质量分数及产量与对照相比下降均极显著($p < 0.01$)。将分离得到的菌株经两次转接后镜检,仍有大量细胞死亡,其中大多为未成熟的芽体。据此推测:出现生物量下降的原因可能是长期的氧化胁迫产生的大量自由基破坏了酵母遗传物质,使部分受损伤较严重的细胞不能正常分裂的结果;那么存活下来的很可能是经修复的突变细胞或本身抗氧化能力较强的细胞。所筛菌株的虾青素含量出现显著下降,表明经多次传代培养的所筛菌株细胞内可能仍维持一定的百草枯浓度并对正常的细胞代谢产生影响。但是,所筛选的海洋红酵母 SOD 比活与对照相比升高 35.2%,而于 0.075 mmol/L 的百草枯浓度下培养的所筛菌株 SOD 比活与对照相比升高 103.7%,差异显著($p < 0.05$)。可能是由于上述试验的各组

2.4 高抗氧化性菌株的筛选试验

鉴于以上结果,以 10% 接种体积分数依次转接至含有百草枯浓度为 0.25、0.30、0.35、0.40、0.45 mmol/L 的培养基中,每轮于 28 °C、150 r/min 摇床培养 30 h。此时于显微镜下镜检发现大部分酵母细胞已死亡,存活细胞的浓度较低。因而,作者直接以每平板 200 μL 的量将培养液进行涂布培养,挑选生长旺盛的单个菌落进行传代培养并保藏。以不加百草枯的培养基中培养初始菌株作对照,将所分离得到的菌株分别在不含百草枯和百草枯浓度为 0.075 mmol/L 的条件下进行试验,培养 72 h 后分别检测各组 SOD 活性及虾青素质量分数(每组 3 个平行,结果以 $M \pm SD$ 表示),结果见表 1。

菌株均来源于同一株初始海洋红酵母菌株,即种内变异较小,因而所筛菌株的 SOD 比活性虽有提高但差异不显著。也可能是由于所筛选出的菌株确与初始菌株存在较大差异,但表现出这种差异的条件是一定的氧化胁迫。抗氧化酶不仅直接受到其作用底物的诱导,还受到非作用底物的交叉诱导,如 $O_2^{\cdot-}$ 不仅使 SOD 活性上升,也使过氧化氢酶活性上升^[4]。这也是于 0.075 mmol/L 的百草枯浓度下培养的所筛菌株 SOD 比活与对照相比显著升高的可能原因。因而,较理想的获得高产 SOD 海洋红酵母的思路为:先采用常规的物理化学诱变方法进行诱变以增加初始菌株的变异度,再用逐级提高百草枯浓度的方法筛选出高 SOD 活性的变异菌株,最后施以微量的百草枯以诱导该性状的表现。

3 结 语

目前,诱变的方法很多,但如何从诱变处理的

菌株中选择出所需要的性状通常比较繁琐。本研究结果表明,相对较高的百草枯胁迫可以淘汰大部分的海洋红酵母而筛选出 SOD 活性较高的菌株;而相对较低的百草枯浓度(0.075 mmol/L)对海洋红酵母的生存无影响,但却可以提高 SOD 活性。

尽管百草枯是一种毒性较强的农药,但是由于所需量极少即可提高 SOD 活性,且其对鱼类等低毒;因而可以考虑将百草枯作为发酵条件研究,在提取 SOD 时去除百草枯即可或是考虑将酵母直接用于鱼类等的饵料。

参考文献(References):

- [1] 刘妮娜,姚忠,叶艳华,等.耐盐节杆菌 *Arthrobacter pascens* DMDC12 中 Mn-SOD 的纯化及性质[J].食品与生物技术学报,2008,27(1):103—108.
LIU Ni-na, YAO Zhong, YE Yan-hua, et al. Purification and characteristics of Mn-SOD from halophilic *Arthrobacter pascens* DMDC12[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27(1):103—108(in Chinese)
- [2] 袁勤生. SOD 在医药、食品和日化工业上的应用[J]. 中国生化药物杂志, 1994, 15(4):289.
YUAN Qin-sheng. Application of SOD in pharmaceuticals, daily chemical and foodstuff[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 1994, 15(4):289. (in Chinese)
- [3] 杨明琰,张晓琦,沈俭,等.微生物产超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(1):49—51.
YANG Ming-yan, ZHANG Xiao-qi, SHEN Jian, et al. Research progress in extrating superoxide dismutase from micro-organism [J]. *Journal of Microbiology*, 2004, 24(1):49—51. (in Chinese)
- [4] 郑荣梁,黄中洋. 自由基生物学(第三版)[M]. 北京:高等教育出版社, 2007, 6:60.
- [5] HOSNI M H, LAURA W S. Roles of manganese and iron in the regulation of the biosynthesis of manganese-superoxide dismutase in *Escherichia coli* [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 14(4):315—323.
- [6] 伊文刚,肖安风,李利君,等.用 Cu^{2+} 筛选筛选虾青素高产菌株的研究[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(6):66—69.
YI Wen-gang, XIAO An-feng, LI Li-jun, et al. Screening astaxanthin-high-yielding strains with Cu^{2+} [J]. *Journal of Microbiology*, 2008, 28(6):66—69. (in Chinese)
- [7] 袁勤生. 超氧化物歧化酶[M]. 上海:华东理工大学出版社, 2009, 5:373—374.
- [8] 许培雅,郑裕国,沈寅初. 分光光度法测定红发夫酵母中虾青素含量[J]. 浙江工业大学学报, 2001, 29(2):120—123.
XU Pei-ya, ZHENG Yu-guo, SHEN Yin-chu. Analysis of astaxanthin from phaffia rhodozymaby spectrophotometry[J]. *Journal of Zhejiang University of Technology*, 2001, 29(2):120—123(in Chinese)
- [9] GEORGE N G, KYRIAKI A, ELIAS E, et al. Drosophila Cu, Zn superoxide dismutase gene confers resistance to paraquat in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003(308):433—438.
- [10] LESKO S A, YANG S U, ZHENG R L, et al. Benzo(a)pyrene radicals and oxygen radical involvement in DNA damage, cellular toxicity and carcinogenesis[J]. *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*, 1982, 28:400—414.
- [11] BIFENG G, SONIA C. F, SWAPAN K. B, et al. A novel *Escherichia coli* vector for oxygen-inducible high level expression of foreign genes[J]. *Gene*, 1996, 176:269—272.