

N^+ 离子注入对三孢布拉氏霉菌抗氧化酶活性的影响

张宁 虞龙

(南京工业大学制药与生命科学学院 南京 210009)

摘要 本文研究了 N^+ 离子注入对三孢布拉氏霉菌 (*Blakeslea trispora* (-)) 细胞内过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、过氧化物酶 (Peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活性的影响, 以及对菌体清除超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 、羟基自由基 $\cdot OH$ 能力和菌体总抗氧化能力 (Total Antioxidative capacity, T-AOC) 的影响。结果表明, *B. trispora* (-) 经 N^+ 离子注入后 CAT 酶的活性均低于对照水平, POD 和 SOD 酶的活性以及清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的能力随着注入剂量的增加呈现先减后增的变化趋势, 而菌体总抗氧化能力在 N^+ 注量为 $6.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 处降到最低, 随后逐渐增加, 在 N^+ 注量为 $1.2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 处增至最大后逐渐下降。由此推测, 离子注入 *B. trispora* (-) 所诱导的总抗氧化能力的变化是导致 *B. trispora* (-) 注量-存活率曲线呈现“马鞍型”变化趋势的原因之一。

关键词 三孢布拉氏霉菌, 氮离子注入, 抗氧化酶, β -胡萝卜素

中图分类号 TQ922.9, Q933, TS261.15

β -胡萝卜素是一种优良的色素, 在人体和动物体内可以转化为维生素 A, 同时还有较强的抗氧化功能, 因此兼有较高的营养价值和药用价值。目前广泛应用于食品、药品、化妆品和保健行业^[1,2]。 β -胡萝卜素的生产方法有植物提取法、盐藻法和微生物发酵法。从品质、技术、生产、资源成本等角度分析, 利用三孢布拉氏霉 (*Blakeslea trispora*) 发酵生产 β -胡萝卜素是比较理想的产业化生产方法^[3,4]。本文研究 N^+ 离子注入三孢布拉氏霉后菌体存活率及体内抗氧化酶 (包括 CAT 酶、POD 酶、SOD 酶) 活性影响, 以及对菌体总抗氧化能力 T-AOC、清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 能力产生的变化, 探讨这些抗氧化酶在菌体抵抗离子注入伤害过程中的作用, 为研究 N^+ 离子束的诱导特点和作用机理以及进一步筛选 β -胡萝卜素高产菌株提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养条件

三孢布拉氏霉菌 (*Blakeslea trispora* (-)), 本实验室筛选保藏。该菌生长的固体培养基为玉米粉 30g、麦芽浸粉 10g、琼脂粉 15g, 蒸馏水 1000 mL、最佳培养温度 28℃、最适 pH=6.2~6.4。

1.2 低能离子注入与样品处理^[5, 6]

三孢布拉氏霉菌 (*Blakeslea trispora* (-)) 经固体培养基活化后, 孢子成熟, 用无菌水洗下新鲜孢子, 振荡, 使孢子充分分散, 制成一定浓度的孢子悬浮液。取 0.1 mL 孢子悬浮液均匀涂布于无菌培养皿上, 以无菌风吹至干燥后进行离子注入。注入能量为 10 keV, 注入量为 0 (对照)、 3.0×10^{15} 、 6.0×10^{15} 、 9.0×10^{15} 、 1.2×10^{16} 、 1.5×10^{16} 、 $1.8 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 。靶室真空度为 10^{-3} Pa , 以 5 s 脉冲式注入, 间隔 15 s。离子注入后, 取出平皿, 用 0.5 mL 无菌水洗脱, 涂布到固体培养基上, 28℃培养箱中培养至长出单菌落, 然后挑取单菌落再继续培养 48 h 用于酶的提取和活性测定。

取上述培养好的菌体约 0.25~0.3 g, 加入适量的石英砂 (20~40 目) 和约 1.5 mL 0℃的蒸馏水置于样品管中, 用 Mini-BeadBeater 珠磨式组织研磨器处理 3 min。研磨结束后, 将菌液于 4℃, 3000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液冷藏备用。

1.3 酶活性的测定

利用过氧化物酶 (POD) 催化过氧化氢反应的原理, 通过测定 420 nm 处吸光度的变化测得 POD 酶活。过氧化氢酶 (CAT) 测定采用钼酸氨法, 超

第一作者: 张宁, 女, 1978年7月出生, 2005年于南京工业大学获硕士学位, 目前为该校工业生物催化专业在读博士研究生

通讯联系人: 虞龙

收稿日期: 初稿 2007-10-10, 修回 2007-12-07

氧化物歧化酶(SOD)测定采用单胺氧化法,总抗氧化能力(T-AOC)测定采用 Fe^{3+} 还原法,通过模拟黄嘌呤与黄嘌呤氧化酶反应系统测定清除超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的能力,利用Fenton反应测定清除羟自由基 $\cdot\text{OH}$ 能力。以上酶活的测定均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒,检测原理及操作步骤按试剂盒说明书进行。酶活性用 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白表示。每个注量下的酶活均测定三次,根据平均酶活绘制酶活-注量关系线图。

2 结果与分析

2.1 N^+ 离子注入对*B.trispora(-)*存活率的影响

由图1可知,*B.trispora(-)*经 N^+ 离子注入处理后存活率的剂量效应明显。总体来看,离子注入*B.trispora(-)*后的注量-存活率曲线在注量低于 $6.0\times 10^{15}\text{cm}^{-2}$ 时存活率逐渐下降,而在注量为 $1.2\times 10^{16}\text{cm}^{-2}$ 时又升至最大后逐渐下降,呈现为“马鞍型”曲线。这被认为是离子注入诱变所特有的诱变效应的重要表现,与一般电离辐射造成的“指数型”剂量-效应曲线不同^[7]。

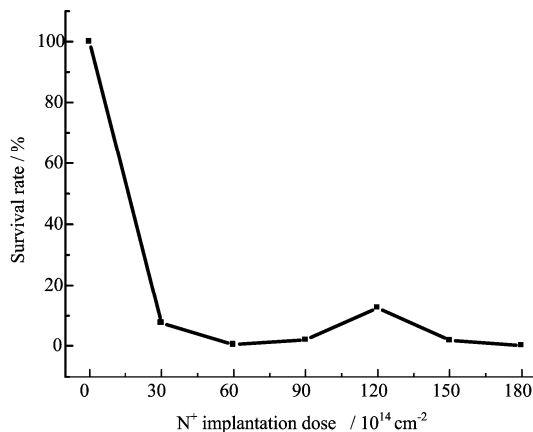


Fig. 1 Effect of N^+ ion implantation on survival rate of *B.trispora(-)*

2.2 N^+ 离子注入对*B.trispora(-)* POD和CAT酶活性的影响

由图2可知,在注入剂量较小的范围内,*B.trispora(-)* POD和CAT酶活性随着注量的增大逐渐下降,POD酶的活性在 N^+ 注量大于 $6.0\times 10^{15}\text{cm}^{-2}$ 后逐渐上升并在注量大于 $1.2\times 10^{16}\text{cm}^{-2}$ 后高于对照水平;而CAT酶在 N^+ 注量为 $1.2\times 10^{16}\text{cm}^{-2}$ 处稍有提升后逐渐下降,且经离子注入后其活性均低于对照水平。以上结果说明 N^+ 注入对POD和CAT酶诱导作用不同。

2.3 N^+ 离子注入对*B.trispora(-)* SOD酶活性的影响

从图3可以看出,*B.trispora(-)*中总SOD酶活性随着注入剂量的增加呈现先降低后增加的变化趋势,而菌体中CuZn-SOD酶的活性则随着注入量的增加呈现先下降后上升再下降的变化趋势。在注入量为 $6.0\times 10^{15}\text{cm}^{-2}$ 处总SOD酶和CuZn-SOD酶的活性均降到最低,在 $6.0\times 10^{15}\sim 1.2\times 10^{16}\text{cm}^{-2}$ 的范围内总SOD酶与CuZn-SOD酶的活性基本重合。

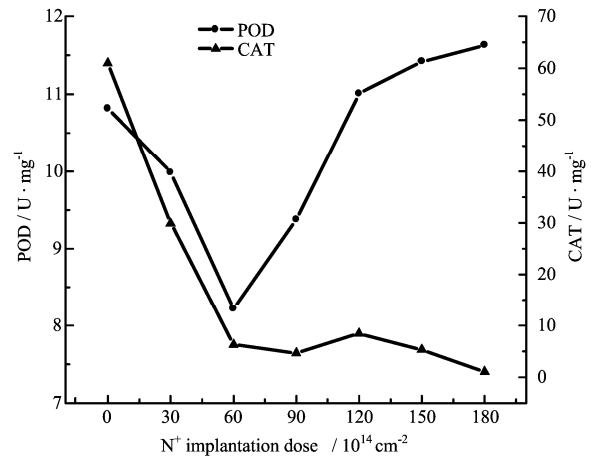


Fig. 2 Effects of N^+ ion implantation on POD and CAT activity of *B.trispora(-)*

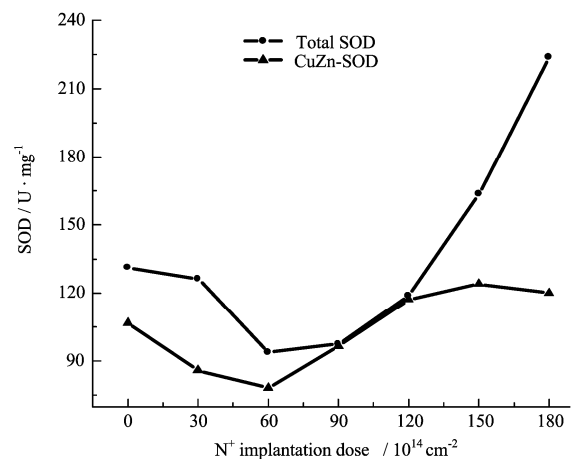


Fig. 3 Effects of N^+ ion implantation on total SOD and CuZn-SOD activity of *B.trispora(-)*

2.4 N^+ 离子注入对*B.trispora(-)*清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 能力的影响

由图4可知,*B.trispora(-)*清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的能力均随着注量的增加先下降后上升,在注量为

$6.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 处清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的能力降到最低, 这一点与 POD、CAT 及 SOD 酶的变化相同。在高注入量处清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的能力均显著提升并且高于对照。

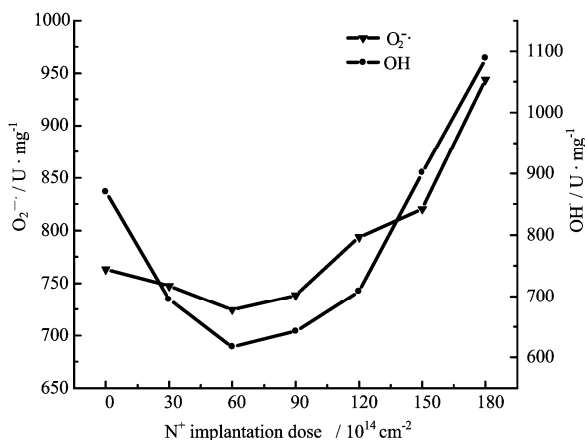


Fig. 4 Effects of N^+ ion implantation on $O_2^{\cdot-}$ and $OH \cdot$ activity of *B.trispora* (-)

2.5 N^+ 离子注入对*B.trispora*(-) T-AOC的影响

由图 5 可知, *B.trispora*(-)总抗氧化能力在注量为 $6.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 处降到最低, 随后逐渐增加, 在注量为 $1.2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 处增至最大并超过对照水平后又缓慢下降。与 *B.trispora*(-)注入量-存活率曲线一样都是在这两个注量处呈现先降后升再降的变化趋势。

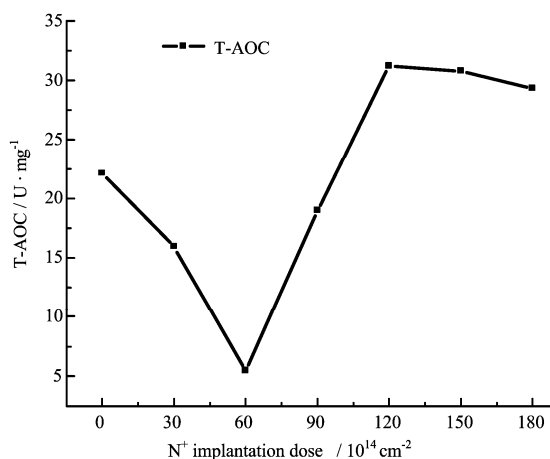


Fig. 5 Effect of N^+ ion implantation on T-AOC activity of *B.trispora* (-)

3 讨论

CAT 和 POD 是清除细胞内 H_2O_2 的酶, 它们在阻断自由基链式反应中起着关键作用, CAT 直接催

化 H_2O_2 分解, 而 POD 是通过催化 H_2O_2 分解其它底物以消耗 H_2O_2 [8]。由实验结果可以看出离子注入 *B.trispora*(-)后 POD 酶的活性在注入量大于 $6.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 后逐渐上升, 并在高注入量处高于对照水平; 而 CAT 酶经离子注入后其活性均低于对照水平。这说明 *B.trispora*(-)中 POD 是清除 H_2O_2 的主要酶, *B.trispora*(-) 中 POD 酶活的这种变化与一些生物体在受到 γ -rays 等逆境作用后的变化规律一致, 这被认为是生物体在受逆境作用时的一种适应性反应[9]。

SOD 酶通过降解 $O_2^{\cdot-}$ 起到保护机体的作用, 保护作用的强弱直接影响到 DNA 的损伤程度。由图 3 可知, 注入量大于 $6.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 的 N^+ 注入诱导了 *B.trispora*(-)中总 SOD 酶活性的提高。而菌体中 CuZn-SOD 活性在注入量为 $9.0 \times 10^{15} \sim 1.2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 范围内与总 SOD 酶活性基本重合, 说明注入量小于 $9.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 的 N^+ 注入诱导 Mn-SOD 活性逐渐降低, 而 CuZn-SOD 活性逐渐提高, 在注入量为 $9.0 \times 10^{15} \sim 1.2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 剂量范围内的 N^+ 使 Mn-SOD 酶基本失活, 此时 CuZn-SOD 可能是构成 *B.trispora*(-) 总 SOD 活性的主要部分。而注入量大于 $1.2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 的 N^+ 注入诱导的是 Mn-SOD 活性的大幅度提高, 这与有报道说 Mn-SOD 在生物体的抗辐射中比 CuZn-SOD 发挥着更大作用的结果相符[10]。

离子注入可引起生物体内多种生物大分子的电离, 从而产生大量的自由基, 其中对生物体伤害最大的是 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 。而 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 可以分别通过 Haber-Weiss 反应和 Fenton 反应生成毒害更强的 $\cdot OH$ 。但生物体内没有直接降解 $\cdot OH$ 的酶, 而是通过 SOD 降解 $O_2^{\cdot-}$ 的作用以及 CAT 降解 H_2O_2 的作用来保护机体, 因此菌体的抗氧化系统在抗辐射中起着十分重要的作用。由图 4 可知, *B.trispora*(-)清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 能力均随着注入量的增加先下降后提高, 研究发现经离子注入后 *B.trispora*(-) 在较高的注入量下, SOD 的活性和 CAT 的活性出现了不同的变化, 其中 SOD 的活力较 CAT 的活力有明显升高, 在细胞内缺乏 CAT 酶的情况下, 菌体对 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的抗性又都出现了增强, 这很可能是经过离子注入诱导了菌体内类胡萝卜素含量的提高, 而它作为一种非酶促自由基抑制剂对胞内的抗氧化过程起了主要作用。

此外值得一提的是, 从实验结果可以看出, 随着注入量的增加, *B.trispora*(-)总抗氧化能力 T-AOC 曲线在注量为 $6.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 处降到最低, 随后逐渐增加, 在注入量为 $1.2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ 处增至最大后又逐渐下降, 而 *B.trispora*(-)注入量-存活率曲线也同样

是在这两个注入量处呈现先降后升再降的变化趋势,由此我们推测,离子注入 *B.trispora*(-)所诱导的总抗氧化能力的变化是导致 *B.trispora*(-)注入量—存活率曲线呈现“马鞍型”变化趋势的原因之一,注量低于 $6.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 的 N^+ 离子注入诱导的 POD、CAT 和总 SOD 酶的活性以及菌体清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的能力降低,导致菌体存活率降低,而随着注入量的增加, *B.trispora*(-) POD、SOD 酶的活性以及清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的能力均有所增大,菌体总抗氧化能力也逐渐增大,所以菌体的存活率也有所增大,但随着注入量的继续增加,虽然此时菌体总抗氧化能力依然很强,但离子注入对细胞造成的直接损伤已无法修复,导致菌体的存活率再次下降。

总之,离子注入生物体是集能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷中和与交换于一体的联合作用过程,所以比单一能量的 γ -ray 等辐射对生物体的作用表现出更广泛的生物学效应^[11],其独特的“马鞍型”存活曲线是离子注入细胞后经物理、化学和生物的一系列过程后所产生的生物学效应的外部表现,而所测 T-AOC、POD、CAT 及 SOD 活性随注入量的变化,以及菌体清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的能力则是离子注入对其生命活动影响中诸多内因之一。

参考文献

- 1 Chem S J. 精细与专用化学品, 2003, **11**(8): 8-9
Chem S J. Fine Specialty Chem, 2003, **11** (8): 8-9
- 2 周利梅, 周光宏. 四川畜牧兽医, 2000, **27**(12): 29-32
ZHOU Lihai, ZHOU Guanghong. Sichuan Animal Veterinary Sciences, 2000, **27**(12): 29-32
- 3 Mehta B J. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, **42**: 836-838
- 4 范永仙, 许尧兴. 食品与发酵工业, 2003, **29**(7): 69-74
FAN Yongxian, XU Yaoxing. Food and Fermentation Industries. 2003, **29**(7): 69-74
- 5 虞龙, 余增亮. 高科技通讯, 2002, **8**(11): 41-46
YU Long, YU Zengliang. Chin High Tech Lett, 2002, **8**(11): 41-46
- 6 卞坡, 张艳锋, 吴健, 等. 郑州大学学报, 2001, **33**(1): 45-49
BIAN Po, ZHANG Yanfeng, WU Jian, et al. J Zhengzhou Univ, 2001, **33**(1): 45-49
- 7 宋道军, 姚建铭, 邵春林, 等. 核技术, 1999, **22**(3): 129-132
SONG Daojun, YAO Jianming, SHAO Chunlin, et al. Nucl Tech, 1999, **22**(3): 129-132
- 8 孙存普, 张建中, 段绍瑾. 自由基生物学导论. 合肥: 中国科技大学出版社, 1999, 66-84
SUN Cunpu, ZHANG Jianzhong, DUAN Shaojin. Introduction to free radical biology. Hefei: University of Science and Technology of China Press, 1999, 66-84
- 9 CHOU F I, TAN S T. J Bacteriol, 1990, **4**: 2029-2035
- 10 孙鹃, 陈媛, 周玫, 等. 生物化学与生物物理进展, 1997, **24**(1): 45-51
SUN Juan, CHEN Yuan, ZHOU Mei, et al. Progress Biochem Biophys, 1997, **24**(1): 45-51
- 11 宋道军, 余增亮. 生物物理学报, 1998, **14**(1): 185-188
SONG Daojun, YU Zengliang. Acta Biophysica Sinica, 1998, **14**(1): 185-188

Effects of N^+ ion implantation on antioxidase activities and β -carotene production in *Blakeslea trispora*

ZHANG Ning YU Long

(College of Life Science Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT *Blakeslea trispora*(-) was used as experimental model, and the effects of N^+ ions implantation on the activities of their catalase (CAT), peroxidase (POD), total antioxidase (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) and the function of scavenging free-radicals ($\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\cdot\text{OH}$) were investigated. The results show that CAT activities are lower than that of control groups. With the increasing of N^+ ion implantation POD, SOD activities and the function of scavenging $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\cdot\text{OH}$ decrease at the beginning, and increase lately. At the dose of $6.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ T-AOC activity is the lowest and at the dose of $1.2 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ its activity becomes the highest. It can be considered that the changes of T-AOC, POD, SOD CAT activities and cell scavenging $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\cdot\text{OH}$ activities have some relationship with the “saddle shape” survival rate curve in the ion implantation breeding.

KEYWORDS *Blakeslea trispora*, N^+ ion implantation, Antioxidase, β -carotene

CLC TQ922.9, Q933, TS261.1