

嗜热烟曲霉 SOD 的性质表征及对毕赤酵母菌耐受性的影响

崔保宇¹, 卢海强¹, 王玉印¹, 刘琼², 田洪涛¹, 谷新晰^{1*}

¹河北农业大学食品科技学院 河北保定 071001

²北京盛拓达生物技术有限公司 北京 100193)

摘要 基于毕赤酵母的密码子偏好性及高效表达规律,对嗜热烟曲霉来源的超氧化物歧化酶 *afSOD* 基因进行优化,使 GC 含量由 59% 降至 41%,CAI 值由 0.69 优化为 0.96,优化前、后基因序列一致性为 73.8%。经测定,重组菌株诱导 72 h,酶活力可达 213.78 U/mL。该重组酶 AfSOD 在 pH 8.0 和 40 °C 条件下,具有最高催化活力,在中性环境和 40~50 °C 稳定。金属离子 Cu²⁺ 对该酶活性的促进作用尤为显著,5 mmol/L 的 Cu²⁺ 酶活提高 80%,而 Fe²⁺ 则表现出明显的抑制效应。重组酶 AfSOD 对 DPPH 和羟自由基具有明显的清除作用,分别达到 (97.65±1.46)% 和 (89.48±2.53)%。此外,重组酶 AfSOD 的高效表达可显著增强酵母菌株对温度、渗透压、盐、乙酸和乙醇的耐受性。本研究不仅为超氧化物歧化酶高效制备提供了一定的技术支持,也为增强酵母菌生产耐受性提供理论参考。

关键词 超氧化物歧化酶; 密码子优化; 高效表达; 酶学性质; 耐受性

文章编号 1009-7848(2025)01-0051-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.005

超氧化物歧化酶(SOD, EC 1.15.1.1)是一类可将超氧阴离子(O₂⁻)转化为 O₂ 和 H₂O₂ 的金属酶,依据辅助金属因子的不同^[1],可分为铜/锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)、锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)、铁超氧化物歧化酶(Fe-SOD)和镍超氧化物歧化酶(Ni-SOD)。该酶能够有效保护细胞免受自由基的侵害^[2],在食品、药品及化妆品产业中有巨大的应用前景^[3-4]。在过去 40 年里,SOD 相关研究受到科学界和工业界的关注。SOD 研究早期,主要从动物(如猪、鸡和牛的血清和肝脏)中提取获得,也有一部分从蔬菜、种子、水果和谷物等植物^[5-6]中获取。然而,较低的提取量和效率成为制约 SOD 商业化利用的瓶颈,故而研究人员将 SOD 的研究重点转向微生物发酵产生 SOD。多细胞真核生物,如藻类和丝状真菌,具有强烈的呼吸作用和丰富的菌丝体,是产生 SOD 的合适来源。目前,约有 400 多种蛋白在毕赤酵母中实现成功表达。毕赤酵母菌是使用最广泛的真核宿主菌,被用于诸多外源蛋白的表达。采用毕赤酵母系统进行嗜热 SOD 的异源表达,已成为最具潜力的制备策略。

普通 SOD 的热稳定性较差,即使在室温下也不能长期保存。热稳定性是决定 SOD 可否商用的最重要的特性。工业化生产过程中的热稳定酶可以降低污染的风险和外部冷却成本。对嗜热微生物源的耐热 SOD 的研究成为重点。虽已从嗜热古菌和嗜热细菌中分离出许多耐热性 SOD,但嗜热真菌 SOD 的应用很少。到目前为止,已在嗜热链球菌^[7]、嗜热无氧芽孢杆菌^[8]、嗜热芽孢杆菌(*Bacillus sp.* SCSIO 15121)^[9]等中实现高效异源表达超氧化物歧化酶,并且在高温环境下,都表现出较强的热稳定性。烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)是一种嗜热真菌,被证明可以生产多种嗜热酶,如单宁酶^[10]、葡萄糖苷酶^[11]和纤维素酶^[12]等,而该菌中的 SOD 未实现高效表达及酶学性质的表征^[13]。

此外,在发酵过程中,因工艺操作或产物积累等因素,毕赤酵母细胞可能会受到来自发酵介质^[14]、产物、温度^[15]等多种环境胁迫,并引起细胞内氧化应激。这些环境压力不仅减少了代谢产物,甚至抑制了细胞的生长,进而直接影响发酵产量和经济效益。本研究通过对嗜热烟曲霉的超氧化物歧化酶基因进行密码子优化,实现毕赤酵母中的高效表达及酶学性质的表征,并探究在环境胁迫下 SOD 对毕赤酵母菌耐受性的影响,为超氧化物歧化酶的高效制备提供一定的理论参考。

收稿日期: 2024-01-17

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31901631)

第一作者: 崔保宇,男,硕士

通信作者: 谷新晰 E-mail: helloguxinxi@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

毕赤酵母 GS115 由本实验室保存; 氨基青霉素、质粒提取试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 蛋白 Marker, 河北瑞帕特生物科技有限公司; 总超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(WST-1法), 南京建成生物工程研究所; 酵母浸粉、蛋白胨、YNB, 北京博奥拓达科技有限公司; 其它试剂为国产分析纯级。YPD培养基(1 L): 酵母粉 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g。BMGY/BMMY培养基(1 L): YNB 13.4 g, 生物素 0.0004 g, 甘油 10 g(或甲醇 5 mL), 酵母粉 10 g, 蛋白胨 20 g, pH 6.0 磷酸钾缓冲液 100 mL, 蒸馏水定容至 1 L。

1.2 仪器与设备

iMark 酶标仪, 美国伯乐公司; JY-600D 电泳仪、JY02G 凝胶成像仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; 9700 型 PCR 扩增仪, 美国 ABI 公司; Gene Pulser Xcell 电转化仪, 美国伯乐公司; 离心机 Mikro 120, 德国 Hettich 公司。

1.3 方法

1.3.1 *afSOD* 基因的优化、合成及生物信息学分析 以毕赤酵母 GS115 为表达宿主, 采用 JAVA Condon AdaptionTool (<http://www.jcat.de/>) 对烟曲霉超氧化物歧化酶基因(XM_748622.1)进行密码子优化, 由金斯瑞生物科技有限公司合成, 构建 pMDTM19T-*AfSOD* 质粒。

利用 BLAST 工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列一致性分析。利用 MEGA 5.0 软件进行系统发育树分析。使用 ExPASy (<http://web.expasy.org>) 计算超氧化物歧化酶分子质量和等电点。利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 进行超氧化物歧化酶的同源建模。利用 ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 进行多序列比对。使用 The ConSurf Server (<https://consurf.tau.ac.il/>) 软件进化三维结构的保守性分析, 并结合 Pymol 软件进行结果可视化。

1.3.2 重组载体的构建及转化 质粒 pMDTM19T-*AfSOD* 和 pPIC9k 分别进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切处理, 并进行连接构建重组表达质粒 pPIC9K-*afSOD*, 阳性转化子由上海生工测序。将阳性质粒

进行限制性内切酶 *Bgl* II 处理, 经琼脂糖电泳分离后, 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒完成线性质粒的回收。参照毕赤酵母表达手册, 将线性质粒电转化至毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 涂布于 MD 平板上培养至形成单菌落。挑取单菌接种至含 4 mL BMGY 培养基的试管中, 30 °C 摇床培养, 48 h 后离心收集菌体(6 000 r/min, 10 min)。随后重新注入 4 mL BMMY 培养基诱导 48 h, 离心收集菌液(8 000 r/min, 10 min), 参照 WST-1 试剂盒说明书进行 SOD 活性的测定, 筛选获得阳性转化子。

1.3.3 诱导表达及活性电泳测定 将阳性转化子接种至 10 mL YPD 培养基中, 培养至 OD_{600nm} 达到 1.2 左右, 再将其接种于 200 mL BMGY 培养基的锥形瓶中, 在 30 °C 摇床培养 48 h 后, 收集菌体并转接至 100 mL BMMY 培养基培养 72 h。离心收取上清, 即为粗酶液, 4 °C 保存备用。超氧化物歧化酶的活性电泳参照 Daldoul 等^[16]方法进行。

1.3.4 重组酶 *AfSOD* 的酶学性质分析 温度对重组酶 *AfSOD* 酶活性的影响: 在 20, 30, 40, 50, 60, 70 °C 条件下对重组 *AfSOD* 活力进行测定, 设定酶活力最高值为 100%, 测定重组酶的最适反应温度; 将重组 *AfSOD* 在 40, 50, 60 °C 下分别处理 5, 10, 20, 30, 60 min, 以未处理的酶液酶活力计为 100%, 分析重组酶 *AfSOD* 的热稳定性。

pH 对重组酶 *AfSOD* 酶活性的影响: 参考标准酶活力测定方法, 在不同 pH 值(pH 2~12)条件下, 测定重组 *AfSOD* 的活力, 酶活力最高值为 100%, 测定重组酶的最适 pH 值。将重组 *AfSOD* 分别在 pH 2~12 的缓冲液中孵育 1 h, 参考标准酶活力测定方法测定酶活力, 设定未处理酶液活力为 100%, 分析重组酶 *AfSOD* 的 pH 稳定性。

1.3.5 金属离子对重组酶 *AfSOD* 活性的影响 在反应体系中添加不同金属离子(1 mmol/L 或 5 mmol/L), 按照标准方法测定酶活力, 以未添加金属离子的酶液样品为对照组, 酶活力计为 100%。

1.3.6 重组菌耐受性评价

1.3.6.1 酵母休止细胞梯度生长法 挑取酵母单菌落, 接种于 10 mL YPD 液体培养基中, 30 °C 摇床振荡培养 12 h。3 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 无菌水洗涤 2 次后, 重悬于 1 mL 无菌水中, 30 °C 培养箱放置 6 h, 制备酵母休止细胞^[17]。调节菌液

起始浓度为 $OD_{600nm}=1.0$, 采用三点接种法按等边三角形的 3 个顶点接种于各测试平板, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温倒置培养 2 d。观察比较菌落生长情况并拍照, 以转 pPIC 9k 空载体酵母作为对照组。

1.3.6.2 高温耐受性测定 各梯度设置参考刘兴艳等^[18]的方法并稍作修改。将测试平板在 $37, 42, 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温胁迫条件下培养, 检测菌株的生长状况, 以比较其高温胁迫耐受性。

1.3.6.3 高渗透压耐受性测定 在含 $0.3, 0.5, 1\text{ mol/L}$ KCl 的高渗透压胁迫条件下培养, 检测菌株的生长状况, 以比较其渗透压耐受性。

1.3.6.4 盐胁迫耐受性测定 在含 $0.3, 0.5, 1\text{ mol/L}$ NaCl 的高盐胁迫条件下培养, 检测菌株的生长状况, 以比较其盐耐受性。

1.3.6.5 乙酸毒性耐受性测定 在含 $30, 40, 50\text{ mmol/L}$ 乙酸的胁迫条件下培养, 检测菌株的生长状况, 以比较其乙酸耐受性。

1.3.6.6 乙醇毒性耐受性测定 在含 $3\%\text{vol}, 4\%\text{vol}, 5\%\text{vol}$ 乙醇的胁迫条件下培养, 检测菌株的生长状况, 以比较其乙醇耐受性。

1.3.7 抗氧化作用

1.3.7.1 DPPH 自由基清除率 参照文献^[19]的方法并稍作修改, 计算 DPPH 自由基清除率。

1.3.7.2 羟自由基清除率 参照文献^[20]的方法并稍作修改, 计算羟自由基清除率。

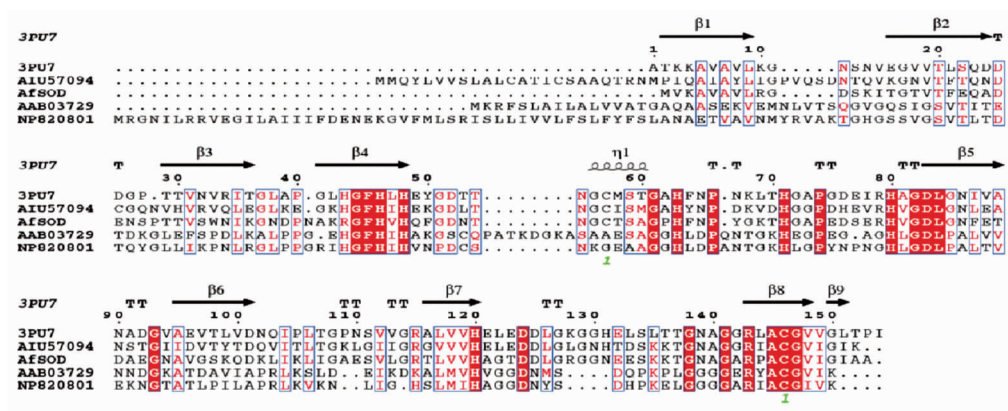
1.3.8 数据分析与统计 利用 Excel 2016 和 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析, 数据结果采用“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 超氧化物歧化酶 *afSOD* 基因分析

烟曲霉来源的超氧化物歧化酶 AfSOD (XM_748622.1) 基因由 477 bp 碱基组成, 存在 23 个毕赤酵母稀有密码子, 共包含 7 处连续的稀有密码子。依据毕赤酵母密码子使用的偏好性, 优化该基因后, 稀有密码子全部被替换, 优化前、后基因序列的一致性为 73.8%, GC 含量由此前的 59.91% 降低至 41.83%, CAI (Codon adaptation index) 值由 0.69 提升至 0.96, 更接近于理想值 1^[21], 有利于超氧化物歧化酶 *afSOD* 基因在毕赤酵母中的表达。

经与已报到的超氧化物歧化酶的序列比对可知 (图 1a), 超氧化物歧化酶 AfSOD 与大肠杆菌 (*E. coli* K-12) 来源的 SodC2 (AAB03729)^[22] 的氨基酸一致性为 21.1%, 与黑腹果蝇 (*D. melanogaster*) 来源的 SOD3 (AIU57094)^[23] 的氨基酸一致性为 38.8%, 与贝氏柯克斯体 (*C. burnetii* RSA 493) 来源的 SodC (NP820801)^[24] 的氨基酸一致性为 19.2%, 与番茄中的 SOD (3PU7)^[25] 的氨基酸一致性为 53.2%, 由四类超氧化物歧化酶的进化树结果 (图 1c) 可知, 本试验中超氧化物歧化酶 AfSOD 属于 Cu/Zn-SOD 酶类。使用 SWIS-SMODEL 软件对重组酶 AfSOD 进行同源模型分析 (图 1b) 发现, 重组酶 AfSOD 结构由 8 个 β 折叠形成的 β 桶和 1 个无规则卷曲组成, 具有典型 β 桶结构特征^[26], 其中 His47、His49、His64 和 His121 为 Cu^{2+} 结合位点, 二硫键 Cys58-Cys147。



(a)

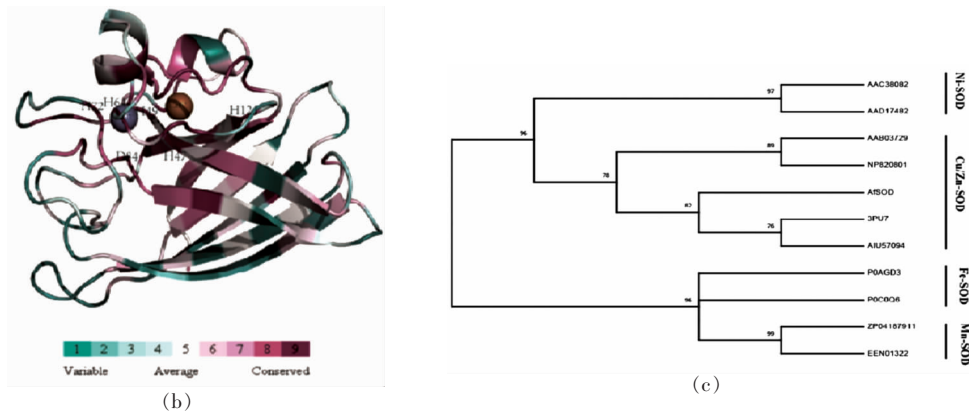


图1 重组酶 AfSOD 序列比对、三维结构及系统发育树分析

Fig.1 Multiple sequence, 3D structural alignments and phylogenetic tree analysis of AfSOD

2.2 重组菌株构建及诱导表达检测

表达质粒经双酶切处理后(图 2a),电泳图中出现目的大小条带(477 bp+1 954 bp),表明基因 *afSOD* 已插入 pPIC9K 质粒,成功获得表达载体 pPIC9K-*afSOD*。重组酶 AfSOD 活性电泳分析,染色过程为在 2.45 mmol/L 的氮蓝四唑中黑暗环境浸泡 30 min,在 28 mmol/L 四甲基乙二胺、 2.8×10^{-2} mmol/L 核黄素、 1×10^{-2} mmol/L 氢氧化钾混合溶液中黑暗环境浸泡 15 min,最后在 0.1 mmol/L 的四甲基乙二酸二钠中光照浸泡 30 min,结果如图 2b 所示,在有氧环境中核黄素被还原,还原状态的核黄素被氧化产生超氧阴离子,超氧阴离子可将氮蓝四唑还原为蓝色的甲脞,而 SOD 可以清除超氧阴离子从而抑制蓝色甲脞的产生,因此没有超氧化物歧化酶的位置为蓝色背景,发白位置出现清晰透明的 SOD 活性染色条带,证明重组蛋白具有 SOD 活性。

2.3 重组 AfSOD 酶学性质分析

重组菌株诱导表达后,测定发酵上清 SOD 的酶活力为 213.78 U/mL。由图 3a 可知,在 0~60 °C 范围内,重组酶 AfSOD 均表现出一定的酶活力,其最适反应温度为 40 °C。在 20~50 °C 之间,该酶能维持 60% 以上酶活力。在低温条件下,该酶表现出较好的活力,在 20 °C 和 10 °C 时,能够表现出 60% 和 23% 左右的酶活力,而当反应温度升至 60 °C 时,其酶活力迅速消失。重组酶 AfSOD 的热稳定性结果表明(图 3b),在 40 °C 条件下处理 1 h,酶

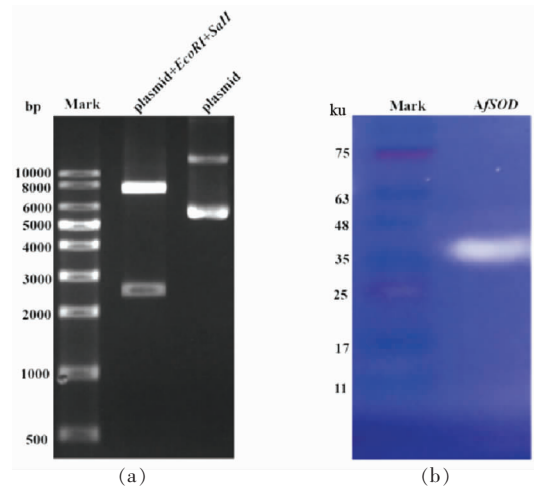


图2 重组 AfSOD 表达载体的构建及活性电泳

Fig.2 The construction process of recombinant expression vectors and native PAGE of AfSOD

活力基本维持稳定,没有酶活力的损失。在 50 °C 条件下,随着处理时间的延长,酶活力逐渐降低,尤其在处理时间超过 20 min 后,酶活力急剧下降。在 60 °C 孵育条件下,重组酶 AfSOD 活力损失较为明显。

pH 值对酶活性的影响如图 3c 所示,pH 值对该酶活力影响较大。在 pH 4.0~12.0 范围内,重组酶 AfSOD 表现出一定的酶活力,该酶最适 pH 值为 8.0。经对重组酶 AfSOD 的 pH 稳定性研究发现(图 3d),在 pH 5.0~11.0 范围内,重组酶 AfSOD 能维持 70% 以上的酶活力。当 pH 值低于 5.0 时,该重组酶不稳定,酶活力损失较大。

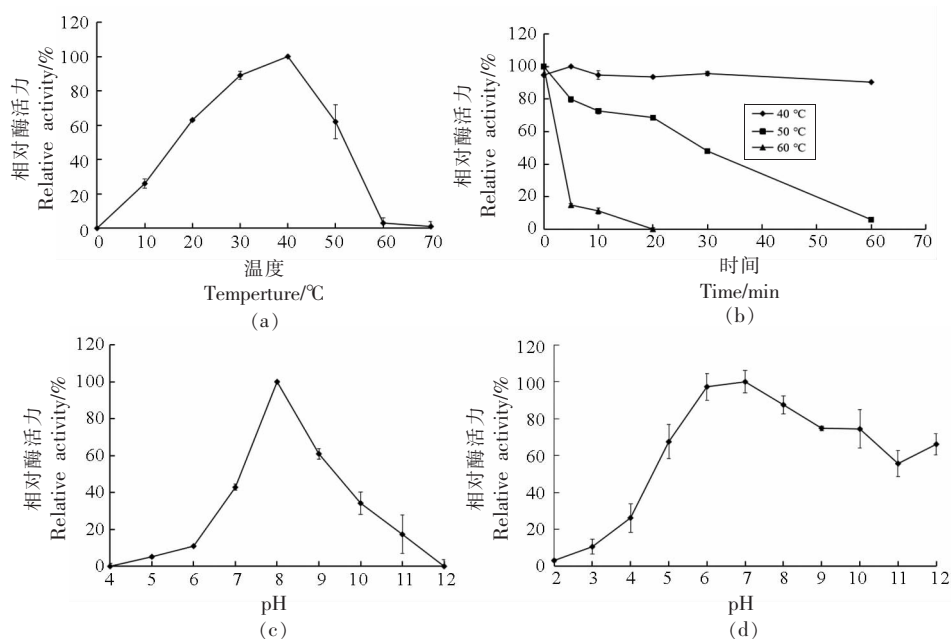


图 3 重组酶 AfSOD 的酶学性质分析

Fig.3 Enzymatic properties of recombinant AfSOD

2.4 金属离子对重组超氧化物歧化酶 AfSOD 活性的影响

金属离子对重组酶 AfSOD 酶活性的影响结果见表 1, 多种金属离子对重组酶 AfSOD 的酶活力表现出不同程度的促进作用, 其中 Cu^{2+} 的酶活力促进最为显著, Cu^{2+} 在低浓度 (1 mmol/L) 和高浓度 (5 mmol/L) 都表现出了较强的酶活力促进效果, 分别提高了 30% 和 80% 的酶活力, 这很可能与 Cu^{2+} 作为 SOD 的辅助因子有关。除此之外, Ca^{2+} 也具有明显的促进效应, 然而并未与其浓度成正比相关。在低离子浓度 (1 mmol/L) 下, Fe^{3+} 和 Cd^{2+} 同样表现出明显的促进效应, 分别可使重组酶 AfSOD 酶活力提高 28% 和 23%; 而当金属离子浓度提高至 5 mmol/L 时, Fe^{3+} 和 Cd^{2+} 对重组酶 AfSOD 酶活力的促进能力降低。 Mn^{2+} 、 Na^+ 和 Zn^{2+} 对重组酶 AfSOD 的活性影响不大。 Fe^{2+} 表现出比较强的抑制作用, 1 mmol/L 的 Fe^{2+} 可以使 AfSOD 活性降低至原有活性的 58%, 5 mmol/L 的 Fe^{2+} 可以使重组酶 AfSOD 完全失去活性。

2.5 重组菌耐受性分析

酵母菌具有耐高温性, 不仅可以增强在高温条件下的活性菌量, 也可直接减少维持发酵温度的费用, 减少生产成本。在温度耐受性 (图 4a) 试

表 1 金属离子对重组酶 AfSOD 相对活力 (%) 的影响

Table 1 Effect of metal ions on residual activity (%) of recombinant AfSOD

金属离子	相对活性	相对活性
	(1 mmol/L)	(5 mmol/L)
CK	100 ± 4	100 ± 1
Cu^{2+}	130 ± 2	180 ± 3
Zn^{2+}	108 ± 4	105 ± 1
Mn^{2+}	94 ± 1	92 ± 3
Fe^{3+}	128 ± 3	112 ± 2
Cd^{2+}	123 ± 3	102 ± 4
Fe^{2+}	58 ± 1	0 ± 0
Na^+	100 ± 3	102 ± 2
Ca^{2+}	110 ± 4	110 ± 2

验中, 重组菌和对照组在 30 °C 时都可以正常生长, 随着温度升高生长都开始受到抑制, 在 42 °C 和 45 °C 时, 对照组生长完全停止, 而重组菌仍可生长。

工业生产中高密度发酵具有设备利用率高、节约能源的优点, 然而其必然会引起高渗透压的问题, 对菌体的生长也将带来严重的负面影响; 另外, 高浓度的 NaCl 也会引起酵母细胞的氧化应激反应, 抑制菌体的生长。在渗透压 (图 4b) 和盐 (图

4c)耐受性试验中,重组酵母较对照组而言表现出更强的耐受性。对照组对高浓度的 KCl 和 NaCl 特别敏感,在 0.3 mol/L 和 0.5 mol/L 的浓度下表现出生长受到抑制的现象,在 1 mol/L 浓度下生长基本完全停止。与此相反,重组的酵母细胞生长并未明显受到影响,甚至在 1 mol/L 的浓度下也可很好的生长。

乙醇作为酵母发酵的重要产物,当发酵液中的乙醇积累到一定浓度时,将会对酵母细胞产生严重的毒害作用,同时抑制酶活性,导致细胞活性

和发酵力下降;而在预处理纤维素或代谢途径中产生的乙酸也会抑制酵母细胞的生长,对其产生毒害作用。在乙酸(图 4d)和乙醇(图 4e)的毒性耐受试验中,重组菌也表现出更强的耐受性,其在高浓度乙酸和乙醇中仍可生长,而对照组对于乙酸和乙醇也比较敏感,生长基本被完全抑制。上述结果充分表明,来自嗜热菌的 AfSOD 显著提高了酵母菌的耐受性,这为重组菌种的发酵生产提供了便利。

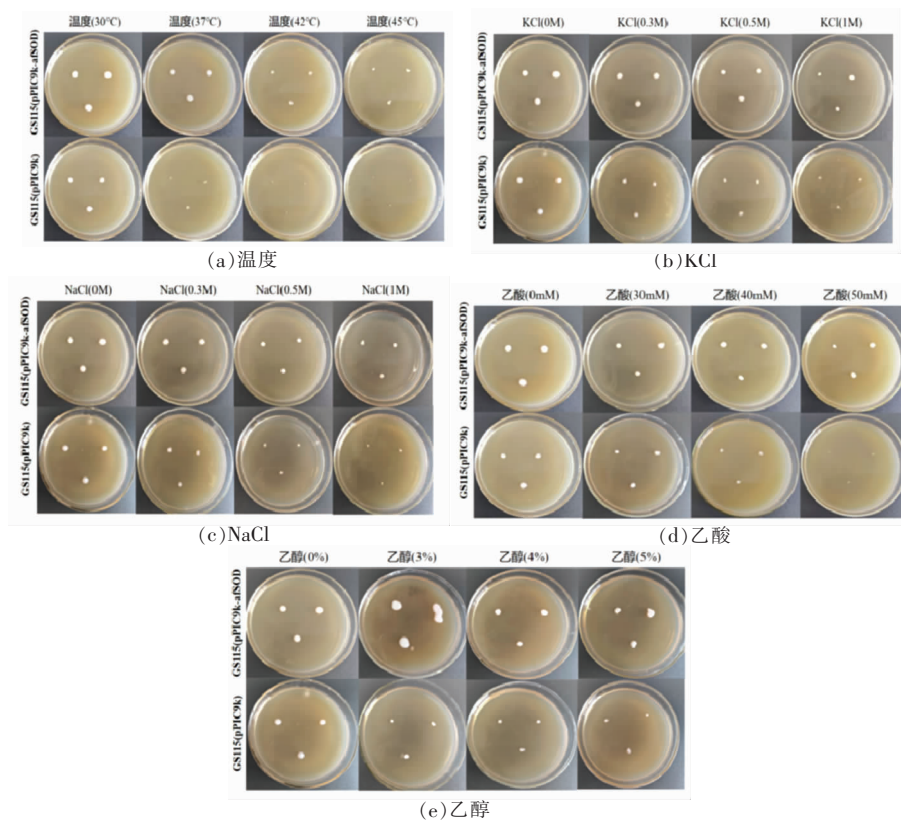


图 4 重组酶对毕赤酵母菌耐受性的影响

Fig.4 The effect of recombinant enzymes on the tolerance of *Pichia pastoris*

2.6 重组酶 AfSOD 的抗氧化作用

由图 5 可以看出,重组酶 AfSOD 对 DPPH 和羟自由基具有明显的清除作用,其中 DPPH 清除率达到 $(97.65 \pm 1.46)\%$,羟自由基清除率达到 $(89.48 \pm 2.53)\%$ 。另与对照组相比,重组酶 AfSOD 的抗氧化能力要优于 Vc。上述结果表明,重组酶 AfSOD 对 DPPH 和羟自由基的清除效果更高,表现出较好的抗氧化活性,这很可能是赋予了宿主菌较强的高温、高盐及高酸耐受性的原因。

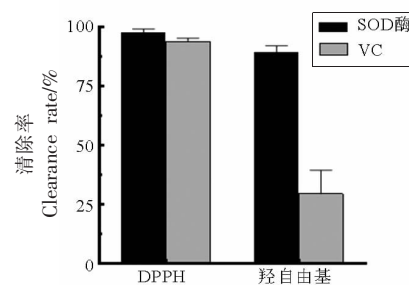


图 5 重组酶 AfSOD 的抗氧化作用

Fig.5 Antioxidant effect of the recombinant enzyme AfSOD

3 讨论

本研究成功实现了烟曲霉超氧化物歧化酶 AfSOD 在毕赤酵母 GS115 的重组表达。研究发现重组酶 AfSOD 的最适温度为 40 °C, 在 20~50 °C 反应时, 该酶能维持 60% 以上的酶活力, 当温度超过 60 °C 后, 酶活急剧消失。目前, 研究报道的 SOD 最适温度范围一般为 30~50 °C, 如 Bhatia 等^[8]所研究的嗜热细菌 KA 55 MTCC 12684 的 SOD 最适反应温度同样为 40 °C, 当温度超过 60 °C 后, 酶活力迅速下降; Wang 等^[27]发现嗜冷细菌嗜盐单胞菌 (*Halomonas* sp. ANT108) 来源的 SOD 最适温度则为 35 °C, 在 25~45 °C 时, 可保持 60% 以上的酶活力。重组酶 AfSOD 经 40 °C 和 50 °C 处理后, 拥有较好的温度稳定性, 然而与其它嗜热菌来源的 SOD 相比温度稳定性较弱, 推测其主要原因可能是酶蛋白分子在不同的宿主中翻译后修饰存在差异, 进而使得性质存在差异。

重组酶 AfSOD 的最适 pH 值为 8.0, 在偏碱性环境 (pH 7.0~10.0) 中, 重组酶 AfSOD 表现出较好的酶活力, 在 pH 5.0~11.0 范围内稳定, 处理 1 h 后仍能维持 70% 以上的酶活力, 具有宽 pH 稳定性。Li 等^[28]在研究长尾蝶参中的 SOD 时, 得到的结果与之较为相似, 都在碱性环境下拥有良好的酶活力, 酸性环境下基本没有活性, 可能是因为蛋白内部的金属配体在低 pH 值下丢失, 而在碱性环境下较稳定。

Niyomploy 等^[29]在开展球茎百部草中的 SOD 酶研究发现, 高浓度的 Cu^{2+} 会对酶产生抑制作用, 这与本研究的结果存在一定差异。Qiao 等^[30]研究发现, 随着 Cu^{2+} 添加量的增加, 重组菌表达 SOD 酶的活力显著提高。Zhao 等^[31]在对 Cu/Zn-SOD 晶体结构进行研究时指出, Cu/Zn-SOD 中的 Cu^{2+} 结合位点是预先建立的, 即使在没有 Cu^{2+} 时也会提前预留出来, 这一特征在所有的 Cu/Zn-SOD 中都是保守的, 这也为异源表达的 Cu/Zn-SOD 与野生型分离的 Cu/Zn-SOD 对 Cu^{2+} 不同的敏感度做出了解释。 Zn^{2+} 对 Cu/Zn-SOD 酶活也有促进作用, 然而促进效果没有 Cu^{2+} 显著, 其主要原因为 Cu^{2+} 位于 Cu/Zn-SOD 的活性中心, 其离子浓度与活性的强弱具有直接关系, 而 Zn^{2+} 在 Cu/Zn-SOD 中所起到的主要作用为维持 Cu/Zn-SOD 结构的稳定性, 因

此 Zn^{2+} 虽然对 AfSOD 的活性具有促进作用, 但是明显没有 Cu^{2+} 显著, 类似的结果曾在一些报道中出现。 Mn^{2+} 对 Cu/Zn-SOD 的抑制作用虽被多次证明, 但抑制程度具有差异, 如 Ibrahim 等^[32]发现 Mn^{2+} 对 Cu/Zn-SOD 活性具有轻微的抑制作用, 然而 Moon-ai 等^[33]研究结果表明 Mn^{2+} 可以显著抑制 SOD 酶活力。在本研究中, Fe^{3+} 和 Cd^{2+} 对 SOD 活性均表现出了促进作用, 更为相似的是, 在低浓度时具有较高的促进效果, 提高离子浓度后, 对 SOD 活性的促进效果反而有所下降, 类似的结果在 Chafik 等^[1]的研究中也出现, 甚至在 Chafik 的研究中 5 mmol/L 的 Cd^{2+} 对 Cu/Zn-SOD 的活性产生了轻微的抑制效果, 然而抑制程度很低, 仅有 4%。同样对 SOD 活性具有促进作用的还有 Na^{+} 和 Ca^{2+} , 这些金属离子都可能在 SOD 清除超氧阴离子的过程中对其产生辅助作用。值得一提的是, Fe^{2+} 多次被证实对 SOD 的活性具有抑制作用^[34], 这可能是由于 Fe^{2+} 置换了 SOD 活性中心的 Cu^{2+} , 从而导致 SOD 活性出现了被抑制的情况。

酵母在工业发酵生产过程中对高温、渗透压、乙酸和乙醇等这些胁迫条件的耐受性直接关系到生产工艺、发酵程度、发酵结果、代谢产物和设备确定等问题。究其原因是酵母在生长过程中受到外界胁迫会产生大量的超氧阴离子, 对宿主菌产生危害作用, 而超氧化物歧化酶可以促进超氧阴离子的分解, 从而抑制胁迫对宿主菌的影响, 增强其耐受性。Raza 等^[35]在研究海藻糖介导的冷胁迫耐受性机理时发现, 在冷胁迫条件下, 超氧化物歧化酶、过氧化物酶等抗氧化酶活性增加, 通过降低丙二醛含量以保护机体生长; 吴丽华等^[36]研究发现, 低浓度硫酸锌处理酵母细胞后超氧化物歧化酶相关基因 SOD 1 和 SOD 2 表达增强, 促使 SOD 活性和总抗氧化能力升高, 进而提高细胞相对存活率。本研究在温度、渗透压、盐、乙酸和乙醇胁迫性的平板中, 发现重组酵母菌均可正常生长, 而对照组酵母的生长受到抑制, 且随着浓度 (温度) 升高, 抑制效果愈加明显。结果表明重组酶 AfSOD 可以显著增强宿主菌的耐受性, 能够有效地保护宿主免受环境变化带来的细胞损伤, 然而具体作用途径仍需进一步研究。

4 结论

本研究实现了以毕赤酵母 GS115 为表达宿主对烟曲霉超氧化物歧化酶的高效表达,酶活力为 213.78 U/mL,重组酶 AfSOD 的最适反应温度为 40 ℃,最适 pH 值为 8.0,在中性、碱性条件下具有优良的稳定性。金属离子中 Cu^{2+} 对重组酶 AfSOD 的活力有明显的促进作用。而且重组酶 AfSOD 的过表达,有利于增强酵母菌对温度、渗透压、盐、乙酸和乙醇的耐受性能。综上,重组酶 AfSOD 在食品工业中具有较好的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] CHAFIK A, ESSAMADI A, ÇELIK S Y, et al. Purification and biochemical characterization of a novel copper, zinc superoxide dismutase from liver of camel (*Camelus dromedarius*): An antioxidant enzyme with unique properties [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 86: 428–436.
- [2] ISLAM M N, RAUF A, FAHAD F I, et al. Superoxide dismutase: An updated review on its health benefits and industrial applications [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62 (26): 7282–7300.
- [3] CHERUBIM D J D L, MARTINS C V B, FARIA L O, et al. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications [J]. *Journal of cosmetic dermatology*, 2020, 19(1): 33–37.
- [4] 王涛, 翟晨, 王亮, 等. 基于氨基功能化离子液体萃取番茄中超氧化物歧化酶 [J]. *食品科学*, 2021, 42(21): 56–62.
WANG T, ZHAI C, WANG L, et al. Extraction of superoxide dismutase from tomato using amino functionalized ionic liquids [J]. *Food Science*, 2021, 42 (21): 56–62.
- [5] SARKAR R K, BHOWMIK M, BISWAS SARKAR M, et al. Comprehensive characterization and molecular insights into the salt tolerance of a Cu, Zn-superoxide dismutase from an Indian Mangrove, *Avicennia marina* [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 1745.
- [6] HOU Z Q, ZHAO L, WANG Y T, et al. Effects of high pressure on activities and properties of superoxide dismutase from chestnut rose [J]. *Food Chemistry*, 2019, 294(10): 557–564.
- [7] KONG L H, XIONG Z Q, SONG X, et al. Enhanced antioxidant activity in *Streptococcus thermophilus* by high-level expression of superoxide dismutase [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 579804.
- [8] BHATIA K, MAL G, BHAR R, et al. Purification and characterization of thermostable superoxide dismutase from *Anoxybacillus gonensis* KA 55 MTCC 12684 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117(10): 1133–1139.
- [9] 邓盾, 张云, 孙爱君, 等. 深海嗜热菌耐高温 Mn-超氧化物歧化酶的性质研究 [J]. *现代食品科技*, 2016, 32(9): 77–83, 160.
DENG D, ZHANG Y, SUN A J, et al. Study on the properties of high-temperature resistant Mn superoxide dismutase from deep-sea thermophilic bacteria [J]. *Modern Food Technology*, 2016, 32 (9): 77–83, 160.
- [10] 黄蕾, 卢海强, 谷新晰, 等. 嗜热真菌单宁酶的克隆表达及在柿子汁中的应用 [J]. *中国食品学报*, 2020, 20(2): 120–126.
HUANG L, LU H Q, GU X X, et al. Cloning and expression of tannase gene from *Thermophilic fungi* and effect of recombinant tannase on antioxidant activity of persimmon juice [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20 (2): 120–126.
- [11] WOJTUSIK M, VERGARA P, VILLAR J C, et al. Thermal and operational deactivation of *Aspergillus fumigatus* β -glucosidase in ethanol/water pretreated wheat straw enzymatic hydrolysis [J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 292(2): 32–38.
- [12] GU X X, LU H Y, ZHANG L, et al. A thermophilic GH5 endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* and its synergistic hydrolysis of mannan-containing polysaccharides [J]. *Catalysts*, 2021, 11(7): 862–874.
- [13] LAMBOU K, LAMARRE C, BEAU R, et al. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus* [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(4): 910–923.
- [14] 相雯研, 张娟, 堵国成, 等. 天然酵母中烘焙酵母的分离鉴定与性能优化 [J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(22): 1–7.
XIANG W Y, ZHANG J, DU G C, et al. Isola-

- tion, identification, and performance optimization of baking yeast from natural yeast[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(22): 1-7.
- [15] 甘祥武, 赵乐怡, 李学优, 等. 巨峰葡萄源酿酒酵母筛选与酿造指标研究[J]. 食品科技, 2022, 47(4): 1-5.
- GAN X W, ZHAO L Y, LI X Y, et al. Screening of Jufeng grape source brewing yeast and study on brewing index[J]. Food Technology, 2022, 47(4): 1-5.
- [16] DALDOUL S, HANZOULI F, HAMDI Z, et al. The root transcriptome dynamics reveals new valuable insights in the salt-resilience mechanism of wild grapevine (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*)[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1077710.
- [17] 张小华, 刘向勇, 王群林, 等. 酿酒酵母 SOD1、SOD2 基因缺失对胁迫耐受性的影响[J]. 中国酿造, 2012, 31(9): 115-118.
- ZHANG X H, LIU X Y, WANG Q L, et al. The effect of SOD1 and SOD2 gene deletion in brewing yeast on stress tolerance[J]. China Brewing, 2012, 31(9): 115-118.
- [18] 刘兴艳, 潘军, 顾一洪, 等. 四株野生酵母菌株耐受性的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(1): 6.
- LIU X Y, PAN J, GU Y H, et al. Study on the tolerance of four wild yeast strains[J]. Food Industry Technology, 2015, 36(1): 6.
- [19] GARBA A M, ISA H R, ABUBAKAR S, et al. Determination of antioxidant activity of leave extracts of *Albizia chevalieri* using free radical scavenging activity assay[J]. International Research Journal of Pure and Applied Chemistry, 2019, 19(1): 1-6.
- [20] SENTHILKUMAR A, THANGAMANIA, KARTHISHWARAN K, et al. Essential oil from the seeds of *Moringa peregrina*: Chemical composition and antioxidant potential[J]. Elsevier, 2020, 129: 100-105.
- [21] FU H G, LIANG Y B, ZHONG X Q, et al. Codon optimization with deep learning to enhance protein expression[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1-9.
- [22] IMLAY K R, IMLAY J A. Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(9): 2564-2571.
- [23] BLACKNEY M J, COX R, SHEPHERD D, et al. Cloning and expression analysis of *Drosophila extracellular* Cu Zn superoxide dismutase[J]. Bioscience Reports, 2014, 34(6): 851-863.
- [24] BRENNAN R E, KISS K, BAALMAN R, et al. Cloning, expression, and characterization of a *Coxiella burnetii* Cu/Zn superoxide dismutase[J]. BMC Microbiology, 2015, 15(1): 1-9.
- [25] FENG K, YU J H, CHENG Y, et al. The SOD gene family in tomato: Identification, phylogenetic relationships, and expression patterns[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7(8): 1279-1281.
- [26] HART P J, BALBIRNIE M M, OGIHARA N L, et al. A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase[J]. Biochemistry, 1999, 38(7): 2167-2178.
- [27] WANG Q F, NIE P, HOU Y H, et al. Purification, biochemical characterization and DNA protection against oxidative damage of a novel recombinant superoxide dismutase from psychrophilic bacterium *Halomonas sp.* ANT108[J]. Protein Expression and Purification, 2020, 173(5): 1-7.
- [28] LI Y A, ZHANG H B. A novel, kinetically stable copper, zinc superoxide dismutase from *Psychropotes longicauda*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 998-1005.
- [29] NIYOMPLOY P, BOONSOMBAT R, KARNCHANATAT A, et al. A superoxide dismutase purified from the roots from *Stemona tuberosa*[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2014, 44(7): 663-679.
- [30] QIAO K, FANG C H, CHEN B, et al. Molecular characterization, purification, and antioxidant activity of recombinant superoxide dismutase from the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 36(8): 1-14.
- [31] ZHAO Y, ZHAO L, ZHANG W W, et al. Production of a novel superoxide dismutase by *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* and analysis of the thermal stability of the enzyme[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 5(9): 1-10.
- [32] IBRAHIM M A, MOHAMED M M, GHAZY A, et al. Superoxide dismutases from larvae of the camel tick *Hyalomma dromedarii*[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2013, 164(3): 221-228.
- [33] MOON-AI W, NIYOMPLOY P, BOONSOMBAT R, et al. A superoxide dismutase purified from the rhizome of *Curcuma aeruginosa* Roxb. as inhibitor of

- nitric oxide production in the macrophage-like RAW 264.7 cell line[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(8): 2138–2155.
- [34] LIU J G, WANG J B, YIN M M, et al. Purification and characterization of superoxide dismutase from garlic[J]. Biochem Mol Biol Int, 2011, 89(4): 294–299.
- [35] RAZA A, SU W, JIA Z Q, et al. Mechanistic insights into trehalose-mediated cold stress tolerance in rapeseed[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 857980.
- [36] 吴丽华, 陈燕飞, 仪慧兰, 等. 氧化胁迫参与硫酸锌诱导的酵母细胞死亡[J]. 环境科学学报, 2019, 39(9): 3188–3194.
- WU L H, CHEN Y F, YI H L, et al. Oxidative stress participates in zinc sulfate induced yeast cell death[J]. Journal of Environmental Science, 2019, 39(9): 3188–3194.

Characterization of a Thermostable Superoxide Dismutase form *Aspergillus fumigatus* and Its Influence on Multi-stress Tolerance in *Pichia pastoris*

CUI Baoyu¹, LU Haiqiang¹, WANG Yuyin¹, LIU Qiong², TIAN Hongtao¹, GU Xinxi^{1*}
(¹College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Heibei
²Beijing Shengtoda Biotechnology Co., Beijing 100193)

Abstract Superoxide dismutase is a cellular antioxidant with promising applications in food, cosmetic and pharmaceutical industries. In this study, based on the codon preference and efficient expression pattern of *Pichia pastoris*, the superoxide dismutase *afSOD* gene from *Aspergillus fumigatus* was optimized to reduce the GC content from 59% to 41%, and the CAI value was optimized from 0.69 to 0.96, and the gene sequence identity before and after the optimization was 73.8%. The recombinant strain induced an enzyme activity of up to 213.78 U/mL for 72 h. The recombinant enzyme AfSOD had the highest catalytic activity at pH 8.0 and 40 °C, and was stable in a neutral environment and at 40–50 °C. The promotion of the enzyme activity by the metal ion Cu²⁺ was particularly significant, with 5 mmol/L of Cu²⁺ increasing the enzyme activity by 80%, whereas Fe²⁺ showed a significant inhibitory effect. The recombinant enzyme AfSOD showed a significant scavenging effect on DPPH and hydroxyl radicals up to (97.65±1.46)% and (89.48±2.53)%. In addition, the efficient expression of recombinant enzyme AfSOD significantly enhanced the tolerance of yeast strains to temperature, osmotic pressure, salt, acetic acid and ethanol. This study not only provides some technical support for the efficient preparation of superoxide dismutase, but also provides theoretical support for the enhancement of yeast production tolerance.

Keywords superoxide dismutase; codon optimization; efficient expression; enzymatic properties; tolerance