

光合细菌的抗氧化作用机理探讨

俞吉安, 张承康, 陈 峰, 王 斐

(上海交通大学 生命科学技术学院, 上海 200030)

摘要: 活性光合细菌 1 号株的培养离心得到菌体和上清液两个组分。这两种组分在两个重要离体系统中 { 牛血清蛋白-亚麻油酸- Fe^{2+} (I 系统) 和脑组织匀浆- Fe^{2+} (II 系统) } 具有明显抗脂质过氧化作用。上清液作用较弱, 在两个系统中其抑制作用为 10.2% ~ 13.4%。而在 I 系统中菌体浓度为 5mg/L 时, 抑制率为 56.9%, 在 II 系统中菌体浓度仅 5 μg /L 时, 抑制率就达到 74.1%。进一步研究表明: 在碱性条件下, 连苯三酚会产生超氧阴离子, 并由它引发连锁反应而发生自氧化。由自氧化进程曲线的斜率 K 值代表了它自氧化速率的大小。在空白对照情况下 K_1 值为 1.33, 而添加菌体悬液达 250mg/L 时, K_5 值下降至 0.47, 说明光合细菌有显著抑制连苯三酚自氧化作用, 其原因是光合细菌中有效成分对超氧阴离子有很好的猝灭作用。

关键词: 光合细菌; 脂质过氧化; 化学发光; 超氧阴离子

中图分类号: Q599

文献标识码: A

文章编号: 1000-7032(2000)03-0219-05

1 引 言

光合细菌是一种古老的微生物, 因为它含有丰富的光合色素, 主要能通过光合磷酸化获得能量而生长繁殖。过去, 仅作为研究光合作用机理的材料, 80 年代对其在工农业上实际应用价值如高浓度有机废水处理, 水产饲料添加剂等方面得到广泛应用^[1-3]。近年来人们利用其中安全无毒活性菌种, 开发为具有抗衰老, 免疫调节, 抗辐射等多种功能的新型保健品^[4-6]。

光合细菌在进行光合作用过程中会产生大量的氧自由基、羟自由基等并引发多种脂质过氧化物自由基($\text{RO}\cdot$ 和 $\text{POO}\cdot$), 为防止这些自由基对细胞的损伤, 细胞内也有多种有效的自由基清除物质, 如细菌色素, 卟啉类化合物, 超氧歧化酶等, 因此研究这方面的生理活性就十分必要^[7]。本文, 在两个典型的易氧化脂质系统中, 用化学发光法测定了菌体本身及培养上清液对脂质过氧化的抑制作用, 并在连苯三酚自氧化系统中证实了它们对超氧阴离子的猝灭作用, 从而从活性光合细菌对自由基猝灭角度探讨了抗氧化作用的机理。

2 材料与 方法

2.1 微生物培养

2.1.1 微生物培养以浑球红假单细胞菌体 1 号

株为培养菌株, 以乙酸盐培养基为培养基, 震荡培养(100 次/分) 48h。

2.1.2 破碎细菌悬液: 离心 15min 收集菌体, 并加 Tris 缓冲液超生波破碎, 用缓冲液配制成 0.25 ~ 2500mg/L 不同浓度的破碎细菌悬液。

2.1.3 培养物离心收集菌体后, 留下的上清液经缓冲液适当稀释后, 待测定用。

2.2 测定方法^[8]

2.2.1 BSA-亚麻油酸- Fe^{2+} 测定系统(对脂质过氧化抑制作用的测定)

用牛血清蛋白(BSA)配成浓度为 1mg/mL 溶液, 用 3-氨基邻苯二甲酰肼(luminol)配成浓度为 0.354mg/mL 溶液, 两者以 2:1 体积比混合, 取混合液 200 μL , 加 15 μL 亚麻油酸, 然后再加入不同浓度样品 20 μL , 空白对照加入 20 μL 缓冲液。用生理盐水加至总体积为 900 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 分钟, 再加入浓度为 10mmol/L 的 FeSO_4 溶液 100 μL 继续温育 30min 后, 用 GSH-1 型生物化学发光仪测定该系统 30s 内累积脉冲数($\text{CP}_{30\text{s}}$), 每个浓度测定 5 个样品, 取其平均值。

2.2.2 脑匀浆- Fe^{2+} 系统(对脂质过氧化抑制作用的测定)

取新鲜小鼠大脑组织匀浆, 用生理盐水配成含匀浆 10% 的悬液, 取 400 μL 悬液, 加上不同浓度的样品 20 μL , 空白对照仅加入 20 μL 缓冲液, 用

生理盐水将总体积补为 900 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 温育 30s, 再加入浓度为 10mmol/L 的 FeSO₄ 溶液 100 μ L 继续温育 15min, 用上述同样方法测定 CP_{30s}。

2.2.3 利用连苯三酚自氧化系统, 测定样品对超氧阴离子的清除作用

取 9mL, pH8.2, 50mmol/L 的 Tris-HCL 缓冲液放入比色皿, 再加入 1mL 不同浓度样品, 空白对照组加入 1mL Tris 缓冲液, 然后加入浓度为 100mmol/L 的连苯三酚溶液 20 μ L, 在波长 420nm 处, 测定其光密度变化, 反应开始后每 30s 记录比值, 每一样品重复 5 次, 取其平均值。

3 实验结果

3.1 在 BSA-亚麻油酸-Fe²⁺ 系统中光合细菌对脂质过氧化的抑制作用

在该系统中亚麻油酸(70%)和亚油酸(30%)的混合物, 其化学结构中有多个不饱和双键, 在空

表 1 上清液在 BSA-亚麻油酸-Fe²⁺ 系统中对脂质过氧化抑制作用

Table 1 The inhibiting function of the supernatant liquid of PBS culture on lipid-peroxidation in system I (BSA-linoleic acid-Fe²⁺).

样品浓度(稀释度)	0	1/5	1/2	1
发光强度(CP _{30s})	307 \pm 6	298 \pm 7	288 \pm 7	267 \pm 7
抑制率(%)	0	3.0	6.3	13.4

CP_{30s}空白杯测量值, 平均为 8

表 2 菌体成分在 BSA-亚麻油酸-Fe²⁺ 系统中对脂质过氧化抑制作用

Table 2 The inhibiting function of cells of PBS culture on lipid-peroxidation in system I (BSA-linoleic acid-Fe²⁺).

菌体浓度(mg/L)	0	0.25	2.5	25	250	2500
发光强度(CP _{30s})	307 \pm 6	265 \pm 9	253 \pm 5	191 \pm 2	137 \pm 5	94 \pm 3
抑制率(%)	0	14.0	18.1	28.8	56.9	71.3

CP_{30s}空白杯测量值, 平均为 8

3.2 在脑匀浆-Fe²⁺ 系统中, 光合细菌对脂质过氧化的抑制作用

脑组织中含丰富的脂质和不饱和脂肪酸, 极易由 Fe²⁺ 引发脂质过氧化作用, 并由此产生超弱发光, 其强度由生物化学发光仪直接测定。

从表 3 可以看到上清液中也存在抑制脑匀浆

表 3 上清液在脑匀浆-Fe²⁺ 系统中对脂质过氧化抑制作用

Table 3 The inhibiting function of the supernatant liquid of PBS culture on lipid-peroxidation in system II (homogenat-Fe²⁺).

样品浓度(稀释度)	0	1/5	1/2	1
发光强度(CP _{30s})	4978 \pm 38	4620 \pm 16	4535 \pm 22	4471 \pm 28
抑制率(%)	0	7.1	8.7	10.2

CP_{30s}空白杯测量值, 平均为 8

气中会发生自氧化, BSA 也有较强的自氧化作用, 而亚铁离子的存在加快了这一进程。此系统是模拟生物膜中易自氧化主要成分的模型, 具有测定应用价值。为提高测定灵敏度, 在系统中加入发光剂(Luminol)提高其灵敏度。在该系统中易氧化物质自氧化作用产生超弱发光, 发光值的大小可直接反映脂质过氧化作用的强度, 可用生物化学发光仪测定。

从表 1 可以看到上清液中存在对脂质过氧化作用的抑制成分, 但相对作用较弱, 上清液稀释 5 倍以上时, 这种抑制作用几乎不能测得。

从表 2 可以看到菌体中存在抑制脂质过氧化作用的活性物质, 随浓度增加这种抑制作用也逐渐增强, 测定系统中菌体悬液实际浓度为 5mg/L 时(250mg/L \times 20 μ L \div 1mL=5mg/L)抑制率可达到 56.9%。

中易氧化物质的氧化作用, 但作用较弱。

由于上述二系统中可氧化物质是不同的, 因此从表 4 可看到在菌体浓度很低时(0.25mg/L \times 20 μ L \div 1mL=5 μ g/L)就能有效抑制脑匀浆中某些物质的氧化作用, 抑制率达 74.1%, 这和 BSA-亚麻油酸-Fe²⁺ 系统中有显著差异。

表 4 菌体悬液在脑匀浆-Fe²⁺ 系统中对脂质过氧化的抑制作用

Table 4 The inhibiting function of cells of PBS culture on lipid peroxidation in system II (homogenat-Fe²⁺).

菌体浓度(mg/L)	0	0.25	2.0	25	250	2 500
发光强(CP _{30s})	4 978±35	1 293±32	1 053±22	965±15	817±26	677±13
抑制率(%)	0	74.1	79.0	81.8	83.1	86.5

CP_{30s}空白杯测量值, 平均为 8

3.3 光合细菌对连苯三酚自氧化系统中超氧阴离子的清除作用

碱性条件下连苯三酚自氧化产生超氧阴离子自由基, 并由它产生连锁反应, 引发单线态氧和过氧化氢产生, 这些活性氧能直接或间接促进膜中脂质过氧化, 造成膜结构损伤, 因此常用这种系统来测定某些生理活性物质对氧自由基的清除能力。

连苯三酚自氧化进程可由 OD₄₂₀的变化值, 绘制成自氧化进程曲线来表示(图 1), 而该曲线斜率的大小间接反映了连苯三酚自氧化速率的大小。

由图 1 和表 5 可见随测定系统中菌体悬液浓度增加, 连苯三酚自氧化反应进程曲线斜率 *K* 值变小, 表明连苯三酚自氧化速率变慢, 其原因是随菌体悬液浓度增大对氧自由基的猝灭作用增加, 由氧自由基引发的连苯三酚自氧化速率减弱。

表 5 不同浓度光合细菌悬液对连苯三酚自氧化曲线斜率的影响

Table 5 The effect of different concentration of PSB cells on the rate of triphenolcig' s autoxidation

菌体悬液浓度(mg/L)	0	0.25	2.5	25	250
自氧化曲线斜率	<i>K</i> ₁ (1.33)	<i>K</i> ₂ (1.07)	<i>K</i> ₃ (0.90)	<i>K</i> ₄ (0.73)	<i>K</i> ₅ (0.47)

4 结 论

1. 在模拟生物膜易氧化脂质及蛋白质系统中, 肯定了光合细菌对脂质过氧化的抑制作用, 其中光合细菌培养上清液作用较弱, 抑制率仅为 13.4%, 而光合细菌菌体悬液随浓度增大, 抑制作用较为明显, 当浓度达到 250mg/L 时抑制率达到 56.9%。

2. 在含有丰富极易氧化脂质等物质的小鼠脑匀浆系统中, 光合细菌对脂质过氧化的抑制作用更为明显, 当光合细菌菌体悬液浓度仅为 2.5mg/L 时, 抑制率就达到 79%, 但随着浓度增大, 抑制率增强不十分明显。另外, 光合细菌培养上清液对脂质过氧化物的抑制作用也比较弱, 抑制率仅为 10.2%。

在上述两个系统中, 光合细菌对脂质过氧化物的抑制作用的表现有所不同, 可能是由于两个

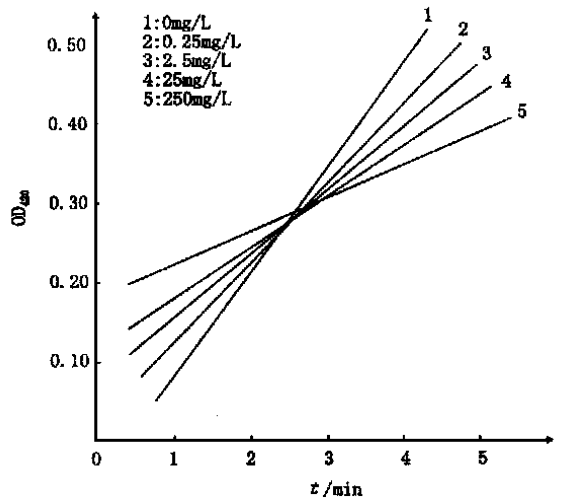


图 1 不同浓度光合细菌悬液存在下连苯三酚自氧化反应进程曲线

Fig. 1 The process curve of triphenolcig' s autoxidation in the presence of different concentration of PSB cells.

系统中易氧化成份性质上的差别所致。但总的来说光合细菌对脂质过氧化的抑制作用是显著的。

3. 在碱性条件下, 连苯三酚会产生超氧阴离子, 由这种氧自由基引发自氧化作用。如在此溶液中添加光合细菌菌体悬液后自氧化速率明显减慢, 表明光合细菌对其自氧化有显著抑制作用, 并随着光合细菌添加浓度的增大, 抑制作用也增强。由此可以推断光合细菌对脂质过氧化的抑制作用的机理之一, 是通过猝灭氧自由基而实现的。

4. 本研究在模拟生物膜典型脂质-蛋白质成份及富含脂质的脑匀浆两个重要测定系统中, 肯定了光合细菌对脂质过氧化的抑制作用。另外, 抑制连苯三酚由氧自由基引发的氧化过程, 阐明了光合细菌对自由基的猝灭作用, 从而在对氧自由基猝灭作用和抗脂质氧化两个相互有关联方面评价光合细菌的生物学意义。

参 考 文 献:

- [1] 北村博, 森田茂广等. 光合细菌 [M]. 东京: 学会出版 0 | —, 1984.
- [2] Yu Ji'an, Ge Shigui. The treatment of fermentative waste water and the utilization of it by products [J]. *J. Chinese Environment Defence Industry*, 1991, (2): 23-25.
- [3] Huang Meizhen, *et al.* The study of photosynthetic bacteria applied on the prawn breeding [J]. *J. Agriculture of Fujian Province*, 1997, (1): 27-34.
- [4] Yu Ji'an, Ye Yongjun. The biosynthesis of carotenoids in photosynthetic bacteria P4 strain and its activity in protecting cells against ultraviolet [J]. *J. Shanghai Jiao Tong Univ.*, 1996, 30(9): 1-7.
- [5] Jia Jifeng, Chen Junwen, Xi Xiaoping, *et al.* The toxic test of An Tai oral liquid produced by using photosynthetic bacteria [J]. *J. Sanitary and Toxic Analysis Science*, 1999, 13(2): 129.
- [6] Baker D J, Jaylor C E, Slashak P W, *et al.* *Infection and Immunity* [C]. Sept., 1990. 2862-2868.
- [7] Fang Yunzhong, Li Wenjie. *The Development of Free Radical Life Science* [M]. Peking: Atomic Energy Publishing house, 1993.
- [8] Chen Xiaoying, Hu Tianxi. Some Chinese medicine and secretive liquid of some plants' effect of inhibiting on lipid-peroxidation [J]. *Chin. J. Lumin.*, 1994, 15(4): 348-352.

Study on the Mechanism about the Effect of Photosynthetic Bacteria on the Anti-oxidation

YU Ji'an, ZHANG Cheng-kang, CHEN Feng, WANG Fei

(College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: Photosynthetic bacteria (PBS) is a special kind of microbe, it is not only as a good kind of material which has been studied in photosynthesis, but also it has been applied to the treatment of high concentration's organic waste water and a fodder additive in the aquatic breeding. Recently a few active strains which are nontoxic for human being, may be used in health field because it has been discovered some physiologic activities such as anti-radiation, the regulation of immunity etc.

For proving the effect of PBS on inhibiting lipid-peroxidation, two typical systems were measured by using the method of chemiluminescence. The system I that was imitated easy-oxidative components of membrane of cell were constituted by BSA-linoleic acid- Fe^{2+} . The chemical structure of linoleic acid molecule has some dual-binding between carbon atoms. The structure can be oxidized easily. BSA (bovine serum albumin) also has same character. The existence of Fe^{2+} promoted the process of lipid-oxidation. Luminol was added into system I for raising sensitive degree. The autoxidation of components in system I would cause low-level bioluminescence. The value of the bioluminescence can be measured by the instrument of bio-chemiluminescence (Model GSH-1) and represent the strength of lipid-oxidation. In the system II, it was constituted by mouse brain-homogenate and Fe^{2+} . The brain homogenate contains rich lipid and poly-unsaturated fatty acid, which initiate the process of lipid-oxidation easily with the existence of Fe^{2+} . The strength of the autoxidation was measured by the same method.

The culture of the active photosynthetic bacteria No. 1 strain was centrifuged into two parts: the cell of bacteria and the supernatant liquid. In the system I the rate of inhibiting on the lipid-peroxidation was 13.4% for the undiluted supernatant liquid. It was 56.4% for suspended cell when the concentration of cell was 5mg/L. The effecting function was stronger with the increasing of cell concentration. In the system II the rate of inhibition was 10.2% for the undiluted supernatant liquid. However it already reached 74.1% when the concentration of cell was only 5 μ g/L. It was stronger than that in the system I.

In an alkali condition triphenoliclog can release superoxide anion. Moreover it initiated successive reactions and caused an autoxidation. In the autoxidation process the value of curve's slant rate(K) presents the rate of the autoxidation. The result showed the suspended cell has the function of inhibiting on the autoxidation obviously. When the concentration of cell was 250mg/L, K reduced to 0.47 as compared with that K equals 1.33 under contrast condition. It has also proved that PSB has a good effect on quenching superoxide anion.

In order to discover new microbiological resource and provide a basis of the theory for PSB applied as a new healthy product, we explored the anti-oxidative function from two associated aspects about inhibiting lipid-peroxidation and quenching superoxide anion.

Key words: photosynthetic bacteria; lipid-peroxidation; chemiluminescence; superoxide anion

Received 17 January 2000

第二届全国有机分子及聚合物发光与激光学术会议纪要

由中国物理学会发光分科学会、中国化学会高分子专业委员会、长春应用化学科学研究中心、吉林大学、中国科学院长春应用化学研究所、中国科学院长春光学精密机械与物理研究所主办,由中国科学院院士、吉林大学教授沈家骢担任主席的《第二届全国有机分子及聚合物发光与激光学术会议》于 2000 年 8 月 1~6 日在长春召开。吉林省政府刘淑莹副省长出席了开幕式并讲话。国家自然科学基金委工程与材料学部高分子学科的董建华主任、吉林省计委贾广和副主任、吉林大学刘中树校长、任露泉副校长、中国科学院长春分院黄长泉院长、中国科学院长春应用化学研究所所长助理安立佳、中国科学院长春光学精密机械与物理研究所所长助理、中国物理学会发光分科学会秘书长申德振等也出席了开幕式。美国柯达公司的石健民博士、日本九州大学的邹德春博士、台湾新竹清华大学的陈寿安教授以及香港城市大学的洪良森教授等六位海外学者应邀出席了会议,并做了非常精彩的邀请报告。会议共收到稿件 104 篇,其中邀请报告 14 篇,口头报告 44 篇,墙报 46 篇。参加会议的科技工作者及研究生共计 149 人,分别来自 30 多个高校、科研及企业单位。这是一次非常成功的大会,通过交流与讨论,代表们一致认为:目前国内有机分子及聚合物发光与激光的研究水平虽然与国际先进水平还有一定的差距,但较两年前已有大幅度的提高,如有机电致发光器件的寿命已超过 3 000 小时,接近中试水平;有机电致发光新材料的某些性能已达到国际先进水平;有机电泵激光的研究也有了一定的基础。如果国家能够加大投入,相信我们是有机会、有能力赶超世界先进水平的。会议期间,在会议主席沈家骢院士的倡导下,成立了全国有机及聚合物发光与激光学术联络小组,并经全体代表一致通过。小组成员由全国高校及科研单位的研究骨干组成,名单详见附录。最后经全体代表讨论通过,决定《第三届全国有机分子及聚合物发光与激光学术会议》于 2002 年在上海召开,由复旦大学主办。

附:有机电致发光联络小组成员:

顾 问:徐叙瑗

组 长:沈家骢

副组长:待定(北京地区,上海地区)

成 员:白凤莲,邹德春,邱 勇,张志林,侯晓远,曹 镛,刘式壙,李文连,王利祥,申德振

秘 书:田文晶