

SOD 高产菌株乳酸菌的选育及其产酶条件的研究

迟乃玉¹ 刘英昊² 张庆芳¹ 刘长江¹

(沈阳农业大学生物技术学院 沈阳 110161)¹

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)²

摘要: 采用常规筛选方法从 200 多株不同种属的乳酸菌中筛选出一株超氧化物歧化酶 (SOD) 产量较高的菌株 (Sn-898) 作为实验出发菌株, 经紫外线 (UV), 硫酸二乙酯 (DES), 亚硝基胍 (NTG) 复合诱变, 选育出一株 (*Lactobacillus plantarum*-578 简写 *L. plan*-578) SOD 产量高达 6400 u/g 湿菌体的高产菌株。该突变株的 SOD 产量较出发菌株提高了 3.5 倍, 并研究了影响 SOD 产生的最适温度, 起始 pH 值, 通气量, 培养时间等因素。在优化培养条件下, *L. plan*-578 菌株 SOD 产量达 9100 u/g 湿菌体。

关键词: 超氧化物歧化酶, 乳杆菌, 选育, 培养条件

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0022-04

THE BREEDING OF THE SOD HIGH-PRODUCING STRAIN AND STUDIES ON ITS CULTURE CONDITIONS

CHI Nai-Yu¹ LIU Ying-Hao² ZHANG Qing-Fang¹ LIU Chang-Jiang¹

(School of Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)¹

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)²

Abstract: The SOD producing strains were obtained from more than 200 strains of different species and genera of lactic acid bacterias. A SOD high-producing mutant (*L. plan*-578) was bred through multiple mutagenesis (UV, DES and NTG). The production of SOD was 6400 u/g fresh cells, which 3.5 times of original strain (*Lactobacillus plantarum* Sn-898). Then several factors influencing the SOD production were investigated and the optimum conditions of producing SOD were obtained: temperature 36°C, initial pH 7.0, aeration 50 (L/h), culture time 48 hour. The *L. plan*-578 produce SOD 9100 (u/g) fresh cells in optimal condition.

Key words: Superoxide dismutase, *Lactobacillus plantarum*, Breeding, Culture conditions

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, EC_{1.15.1.1}, 简称 SOD) 是生物体防御氧化损伤的一种十分重要的金属酶^[1,2]。SOD 的主要功能是清除生物体内有氧代谢产生的超氧自由基 (O₂⁻)^[3]。超氧自由基 (O₂⁻) 被认为对各种生物大分子及组织细胞有严重的损伤作用^[4], 因此对 SOD 的提取、活性保存及其作为保健药品、功能食品等应用方面的开发研究倍受关注。SOD 提取主要有两条途径^[5], 一是从动物血液中提取, 二是从植物组织中提取。这两种提取 SOD 方法, 存在工艺繁琐, 成本高, 易引起污染等问题。目前, Cu/Zn-SOD 微生物发酵法生产报道较少, 特别是直接利用可食用的乳酸菌生产 Cu/Zn-SOD 还未见报道。本文报道了 Cu/Zn-SOD 高产菌株乳酸菌的选育及最适发酵条件, 拟为直接食用型 SOD 产品的开发及微生态制剂的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

209 株不同种属的植物乳杆菌、嗜热链球菌、乳链球菌等，沈阳农业大学食品科学系保存，其中植物乳杆菌、乳链球菌为日本北海道大学农学院微生物研究室赠送。

1.2 培养基

基础培养基：葡萄糖 10g，蛋白胨 5g，酵母膏 2g， KH_2PO_4 1.2g，pH7.0，定容 1L。

发酵培养基：玉米粉 20g， KH_2PO_4 2g， K_2HPO_4 0.5g， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5mg， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg，pH7.0，定容 1L。

1.3 试剂

氯化硝基四唑氮蓝，甲硫氨酸，核黄素，蛋氨酸等均为分析纯，北京化学试剂公司。

1.4 培养方法

将实验菌株在斜面培养基活化，接种 1 环于液体种子中，培养 36h，再以 3% 的接种量接种于发酵培养基中，培养 48h，5000r/min，离心得上清液和湿菌体，测定湿菌体重和 SOD 酶活力 (u/g 湿菌体)。

1.5 诱变方法

收集对数生长期菌体，用生理盐水适当稀释后，分别用紫外照射 (15W，30cm)，1% 的硫酸二乙酯 (亚硝基胍)，及紫外照射和硫酸二乙酯 (或亚硝基胍) 相互结合方法进行诱变处理后，取 0.1mL 涂平板，28℃ 培养 2d，随机挑取菌落、传代、进行 SOD 液体发酵产量检测，筛选出 SOD 产量高的突变菌株。

1.6 SOD 测定方法

酶活力单位：一定条件下，氯化硝基四唑氮蓝被 SOD 抑制 50% 所需酶量定义为一个活力单位 (u/g 湿菌体)。

2 结果与讨论

2.1 SOD 高产乳酸菌选育谱系

以 200 多株乳酸菌为出发菌株，经一系列初筛、复筛、诱变、复筛，最终选育出 SOD 产量达 6400u/g 湿菌体的高产菌株，筛选过程如图 1。

209 株不同 种属的乳酸菌	SOD 活力 (u/g 湿菌体)
↓ 初筛	
2 株不同种属乳酸菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus lactis</i>)	1620 ~ 2740
↓ 复筛	
Sn-898	2680
↓ UV, DES, NTG	
Sn-76	3200
↓ UV + DES, UV + NTG	
Sn-18	4300
↓ UV, DES, NTG	
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> -578	6400

图 1 SOD 高产乳酸菌选育谱系

2.2 菌株 *L. plan-578* 遗传稳定性

将 *L. plan-578* 接种到斜面培养基上连续进行 12 代传代, 每隔 1 代进行液体发酵培养, 测定 SOD 产量, 结果表明 (图 2), 该突变株为稳定突变株。

2.3 *L. plan-578* 最适发酵条件研究

2.3.1 温度对 *L. plan-578* 产生 SOD 的影响: *L. plan-578* 在不同温度下进行液体发酵, 结果见图 3。实验结果表明: 温度在 34℃ ~ 38℃ 变化时, SOD 的产量较高, 当温度超过 38℃ 或低于 32℃ 时, SOD 产量明显降低, 这可能是菌体生长速度下降所致。因此, SOD 发酵生产温度应控制在 34℃ ~ 38℃ 之间。

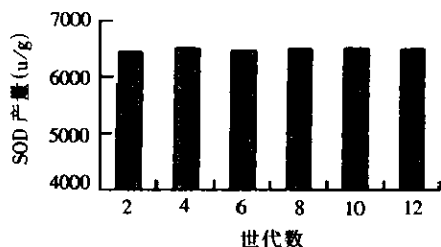


图 2 *L. plan-578* 遗传稳定性

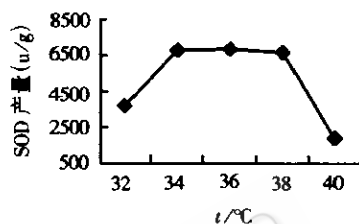


图 3 温度对 *L. plan-578* 产 SOD 的影响

2.3.2 pH 对 *L. plan-578* 产生 SOD 的影响: 乳酸菌可以在 pH 4.0 ~ 7.5 范围内生长良好。本实验中选取 pH 值在 3.0 ~ 7.0 范围内进行液体培养, 测定 SOD 产量。结果表明 (图 4): 在发酵起始 pH 为 3.0 ~ 7.0 时 SOD 产量变化不明显, 说明该突变株在酸性环境下生长能力较强。

2.3.3 培养时间对 *L. plan-578* 产 SOD 的影响: 液体发酵时, 采用 500mL 三角瓶装培养基 50mL, 每间隔 12h 测定结果表明 (图 5), *L. plan-578* 培养 24 ~ 36h 时, SOD 产量增加量较小, 48h SOD 产量达到最高, 根据 SOD 生产用途不同, 可以选用不同培养时间。

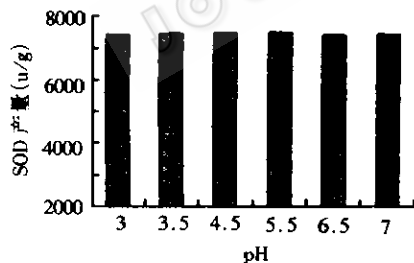


图 4 pH 对 *L. plan-578* 产 SOD 影响

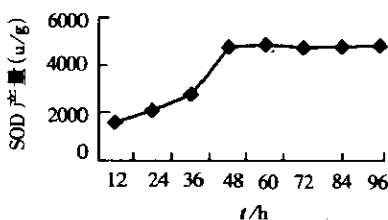


图 5 培养时间对 *L. plan-578* 产 SOD 影响

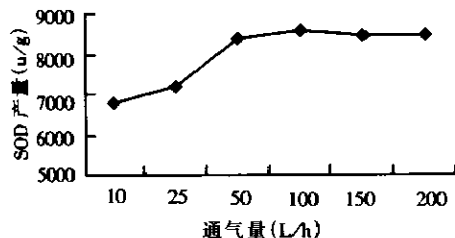
2.3.4 通气量对 *L. plan-578* 产 SOD 的影响: 氧气对微生物细胞 SOD 合成有较大的促进作用。我们采用 5L 发酵罐, 进行通气量对 *L. plan-578* 产 SOD 的影响实验, 实验结果表明 (图 6), 随通气量增加, SOD 产量明显增加, 当通气量大于 50 (L/h) 时, 通气量再增加, SOD 产量不再增加。

2.4 *L. plan-578* 发酵条件优化对 SOD 产量影响

结果见表 1。

3 结论

本文采用常规方法选育出耐高温、直接可食用的 Cu/Zn-SOD 高产乳酸菌, 该突变株属 (*L. plan-578*) 植物乳杆菌, 是人体肠道内有益微生物菌群之一^[6]。该突变株在

图 6 通气量对 *L. plan* - 578 产 SOD 的影响表 1 *L. plan*-578 发酵条件优化对 SOD 产量的影响

优化条件	SOD 产量 (u/g)
CK	6480
温度	6860
pH	7400
培养时间	8800
通气量	9100

肠道内能生长, 其生长过程中能产生 Cu/Zn-SOD, 而且该突变株产生的 Cu/Zn-SOD 抗胃蛋白酶、胰蛋白酶水解能力强^[7], 因此该突变株为功能性 SOD 产品的开发和微生态制剂的研制提供了方便。该项研究为降低 SOD 生产成本, 采用玉米粉为主要发酵基质, 在优化条件的基础上 Cu/Zn-SOD 产量达 9100 (u/g), 是其他方法生产 SOD 或 SOD 活性保存成本的 1/8 ~ 1/5, 该项研究应用前景广阔^[8]。

参考文献

- [1] McCord J M, Keele J B, Fridovich I. Proc Natl Acad Sci USA, 1971, **68**: 1024 ~ 1027.
- [2] Hewitt J, Morris J G. FEBS Lett, 1975, **50**: 315 ~ 318.
- [3] Bannister J V, Bannister W H, Rotilio G. Crit Rev Biochem, 1987, **22**: 111 ~ 180.
- [4] Moody C S, Hassan H M. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, **79**: 2855 ~ 2859.
- [5] 迟乃玉, 张庆芳, 刘长江, 等. 沈阳农业大学学报, 1999, **30** (2): 171 ~ 175.
- [6] 杨洁林, 郭兴华, 张 麓, 等. 乳酸菌生物学基础及其应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 87 ~ 98.
- [7] 迟乃玉, 张庆芳, 刘长江, 等. 生物技术, 2000, **11** (6): 24 ~ 27.
- [8] 迟乃玉, 刘长江, 张庆芳, 等. SOD 乳酸菌生产技术. 2000 专利, 批准号: 01106224. X.