

Bacillus cereus MBRH3 的鉴定及 以海带为原料生产 SOD

郝之奎, 潘 勇, 杨甫岳, 陈 怡, 董玲玲, 王 科, 吴莉萍, 沈泽航
(台州职业技术学院 应用生物技术研究, 浙江 台州 318000)

摘要: 从浙江省台州市剑门港海区采集海底淤泥样本, 以海带作为唯一营养因子筛选出 3 株 SOD 产生菌, 并对其中 1 株产 SOD 活性较高的菌株从形态学、生理生化及分子生物学特征等方面进行了鉴定, 该菌属于芽胞杆菌科(Bacillaceae), 芽胞杆菌属(*Bacillus*), 蜡样芽胞杆菌(*cereus*), 命名为 *Bacillus cereus* MBRH3。利用中心组合设计实验(Contral Composite Design)对该菌株的产酶培养基进行了优化, 结果表明, 当培养基主要成分玉米浆粉、海带浆、葡萄糖和硫酸锰质量浓度(g/L)分别为 4.5、4.11、2.10 和 0.62 时, SOD 活性最高达到 203.38 U/mL。还未曾发现该菌能够利用海带生产 SOD 的文献报道。本菌株保藏于中国典型微生物保藏中心(保藏号: CCTCC NO:M2013581)。

关键词: 蜡样芽胞杆菌; SOD; 分离; 鉴定; 发酵优化

中图分类号: S 946.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)01—0054—08

Identification and Improvement of SOD Production for *Bacillus cereus* MBRH3

HAO Zhikui, PAN Yong, YANG Fuyue, CHEN Yi,
DONG Lingling, WANG Ke, WU Liping, SHEN Zhehang

(Institute of Applied Biotechnology, Taizhou Vocational & Technical College, Taizhou 318000, China)

Abstract: Three Microorganism with SOD production were separated from the seafloor mud of Jianmen harbour in Taizhou, Zhejiang Province, China. Thus, further studying on one of the stronger SOD activity strain was undertaken, Its phenotype, genetic and phylogenetic analysis experiments suggested that the strain belongs to the family Bacillaceae, genus Bacillus and named as *Bacillus cereus* MBRH3. A sequential statistical methodology comprising of Contral Composite Design were applied to enhance the fermentative production of SOD, As a result, maximum chitinase activity of 203.38 U/mL was obtained in the optimized medium concentration (g/L) of 4.5 corn steep powder, 4.11 Sea weed paste, 2.10 glucose and 0.62 magnesium sulfate. Bacteria was deposited into China Center for Type Culture Collection(CCTCC NO:M2013581).

Keywords: *Bacillus cereus* MBRH3, SOD, isolation, identification, fermentation optimization

收稿日期: 2014-05-18

基金项目: 浙江省教育厅科研计划项目(Y20125673); 大学生科技创新项目(2013R460001); 台州市海洋生物资源开发与利用科技创新团队项目(台市委办发[2012]58号, MBR2012032); 浙江省教育厅高等学校访问工程师校企合作项目(FW2012048)。

作者简介: 郝之奎(1972—), 男, 安徽阜阳人, 工学博士, 工程师, 主要从事海洋微生物资源开发与利用研究。E-mail: haozhikui123@126.com

超氧化物歧化酶 (EC 1.15.1.1, Superoxide dismutase, SOD) 是活细胞产生的专一性催化生物体内超氧阴离子自由基 (O_2^-) 发生歧化反应生成过氧化氢和氧气的金属酶, 它维持生物体内自由基的产生和清除的动态平衡, 对生物具有保护、防衰和治病作用。SOD 是金属酶, 根据其结合的不同金属离子可分为 Fe-SOD、Mn-SOD 和 Cu·Zn-SOD。原核细胞及部分植物主要含有 Fe-SOD, 呈黄色。真核细胞线粒体及原核细胞中含有 Mn-SOD, 呈紫色。植物的叶绿体、过氧化物酶体及真核细胞细胞浆内含有较多的 Cu·Zn-SOD, 呈蓝绿色^[1]。近年来, 学者们在链霉菌属中发现了 Ni-SOD 和 Fe·Zn-SOD, 在牛肝中发现了 Co·Zn-SOD^[2], SOD 的种类日益丰富。SOD 应用非常广泛: 在医药领域, SOD 可治疗因 O_2^- 引起的疾病, 如关节炎和类风湿性关节炎等; 在食品领域, SOD 可作为保健食品的添加剂, 具有抗疲劳、抗衰老、抗辐射和消炎作用, 还可用于水果保鲜; 在日化领域, SOD 具有防晒、抗皱、祛斑、抗炎作用; 在农业和植保领域, SOD 具有提高抗逆性能和耐受性等。

活的动物、植物及微生物细胞都能产生 SOD, 但是不同的生物产 SOD 的强度差异很大, 同一生物体的不同部位 SOD 的差异也很大。动物内脏和血液曾是 SOD 的主要来源^[3], 但是, 来源于动物的 SOD 易造成交叉感染和过敏反应等不良后果, 应用受到很大限制。植物中特别是大豆、玉米、桑叶、大蒜及仙人掌等含量相对较高^[4-6], 但其提取工艺复杂, 以致生产成本较高而不能大量生产。微生物发酵获取 SOD 是现在最常用的方法, 王岁楼^[7]、王素芳^[8]等学者筛选获得 SOD 高产菌, 通过发酵 SOD 酶活分别达 600 U/g 湿菌体和比活 3 048 U/mg, 微生物发酵生产 SOD 具有产量高、工艺简单等显著优势, 是获取 SOD 的主要方法, 特别是利用现在分子生物技术的构建的产 SOD 的工程菌, 使通过发酵获得 SOD 更加有效^[9]。

海带是多年生大型藻类, 我国海带产量约 90 万 t/年, 是世界总产量的一半, 排第一位^[10]。海带不仅具有食用价值, 还是一种高附加值的工业原料。海带的主要成分是褐藻胶, 同时富含碘、钙等矿物质元素及多种氨基酸和维生素。海带营养丰富, 其含量最多的海带多糖具有抑制肿瘤生长、改善肾功能衰竭、降低血脂、降低血压等药理作用, 是天然的保健食品, 为我国及东南亚诸多国家的人们所喜爱。

以海带为原料可生产褐藻胶、甘露醇、膳食纤维和海藻酸钠等重要工业原料或食品。此外, 还可以海带为原料发酵制造乳酸、乙醇甚至饮料等。我国虽是海带产量大国和海带加工大国, 但是海带加工水平与世界发达国家相比还有一段距离。深入开展海带应用潜能研究是提高海带利用价值有效途径^[11]。作者在开发海洋微生物资源过程中, 以海带为唯一营养筛选获得一株能利用海带为底物合成 SOD 的微生物菌种。多糖类物质在自由基清除过程中叶发挥重要作用^[12]。特别是海带中含有的褐藻糖胶自身有较强的清除氧自由基的作用, 与 SOD 功能相同^[13], 选择海带作为生产 SOD 的原料更能够发挥其优势。

1 材料与方法

1.1 材料

样本采自于浙江省台州市剑门港海区海底淤泥 (28°1'57"N, 121°36'38"E), 共 10 份。

1.2 主要仪器

紫外分光光度计: UV-3000, HITACHI 公司产品; 光学显微镜: ECLIPSE 公司产品。

1.3 试剂及培养基

市售海带, 纯净水浸泡 24 h, 切块后使用豆浆机充分粉碎, 调配成干物质质量分数为 5 % 的海带浆, 低温储存备用。

发酵培养基 (g/L): $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, KH_2PO_4 0.7, K_2HPO_4 0.3, 葡萄糖 2, 玉米浆粉 2, 牛肉膏 2, 海带浆 2 mL, pH 7.0。

1.4 目标菌株的分离筛选

取 2 g 海底淤泥样本加入以海带为唯一营养成分的培养基中, 35 °C, 200 r/min, 条件下培养 108 h, 取 5 mL 发酵液, 加入 50 mL 无菌水中充分混合, 依次稀释制 $10^1 \sim 10^6$ 倍, 然后取 10^4 和 10^5 两个稀释倍数的样品各 0.2 mL 分别均匀涂在仍仅有海带为培养基的平板上, 37 °C 培养 72 h。后挑选单菌落在新的筛选培养基平板上划线转接, 直至获得单菌落纯培养物, 接着进一步复筛或 4 °C 保存备用。

1.5 目标菌株的复筛

把初筛得到的菌株接种至含有海带的培养基中, 600 nm 检测其生长情况, 当菌种浓度达 2.20 时取 1 mL 种子分别接种于产酶培养基中。35 °C、200 r/min 条件下培养 48 h 检测酶活。每个样品进行了

3个平行实验,灭菌水做对照,SOD酶活为3个平行实验的平均值。

1.6 SOD酶活性的测定方法

SOD酶活测定参照参考文献[14]采用微量连苯三酚自氧化法测定,取待测培养液1 mL离心后取上清液0.1 mL和3 mL 0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(含EDTA 1 mmol/L,pH 8.2)0.1 mL连苯三酚溶液(0.05 mol/L,0.1 mol/L盐酸配制)组成总体系,缓冲液35~37℃预热。在波长325 nm下测吸光度,以灭活等量酶液作空白对照。酶活定义:在一定条件下,1 mL的反应液中,每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达50%时的酶量定义为一个活力单位(U)

$$\text{SOD}_{\text{activity}} (\text{U/mL}) = 2 (\Delta A_{325} - \Delta' A_{325}) / \Delta A_{325} \times 3.2 \times n / V$$

(ΔA_{325} 为连苯三酚自氧化时的A325读数差, $\Delta' A_{325}$ 为添加酶液后A325读数差,3.2为测定的反应液体积, n 为酶液稀释倍数, V 为用于反应的酶液体积。)

1.7 菌株的生理生化及形态学鉴定

菌株形态及生理生化实验参照工业微生物实验技术手册^[15-16]和伯杰氏细菌鉴定手册^[17]。

1.8 菌株的分子生物学研究

DNA的提取^[18]:种子于200 r/min,30℃条件下发酵10 h,8 000 g冷冻离心10 min,收集菌体。总DNA提取方法按照试剂盒方法进行(细菌基因组提取试剂盒:上海赛百盛基因技术有限公司产品)。

利用通用引物扩增16S rRNA基因。引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成:5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA-3'和5'-CGGTTACCTTGTACGACTT-3'^[19]。PCR反应条件为:94℃预变性4 min,进入循环,94℃变性50 s,55℃退火50 s,72℃延伸2 min,35个循环,72℃延伸10 min后保存4℃状态。PCR产物用UltraClean PCR Clean-up kit纯化,及时送上海生物工程有限公司测序。

序列及系统发育分析:通过BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)将菌株SYBC-H1的16S rRNA基因序列进行同源分析。多序列比对应用软件Clustal W(V 1.83)^[20],用BioEdit(V 7.01)进行序列调整。最后用Mega软件(V 5.1)采用邻位相连法(neighbor-joining,NJ)构建(Kimura 2-parameter distance calculation)进化树^[21]。1000 bootstrap 检验^[22]。

1.9 产SOD培养基的优化

采用中心组合试验(Central Composite Design, CCD)方法,使用软件Design-Expert进行实验设计与分析。利用单因素实验筛选出对产SOD有潜在影响的4种培养基成分,进一步确定培养基各成分的最佳含量并验证。

发酵培养条件为:温度:35℃;转速:200 r/min;装液量:50 mL;接种量体积分数2%;培养时间:48 h。数据取3个平行实验的平均值,显著性分析采用t-检验, $P < 0.05$ 视为显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 SOD产生菌的筛选

经过利用仅有海带为营养的培养基的筛选,得到了3株可利用海带为营养的微生物,微生物大都产生SOD,对初筛得到的菌株进一步复筛,获得一株酶活相对较高的作为进一步深入研究的菌株。

2.2 菌株MBRH3的鉴定

2.2.1 MBRH3的生理生化及形态学特征 MBRH3菌落呈圆形,表面光滑,边缘整齐,乳白色不透明,菌体粘稠不易挑起(图2(a));菌体长度约1.1~2.5 μm ,直径约0.5~1.0 μm ;杆状成链(图2(b))。生理生化实验结果表明,该菌是革兰氏阳性菌;在5℃至45℃温度范围内都可生长,最适生长温度为35℃,pH为3.5~8.5时都可生长,最佳生长pH是6.5。兼性好氧。能利用的碳源有:蔗糖、N-乙酰氨基葡萄糖、壳二糖、半乳糖、葡萄糖、果糖、菊粉、麦芽糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖等。能分泌的酶如下:过氧化氢酶、半乳糖酶、 β -葡萄糖苷酶、尿酶、蔗糖酶、麦芽糖酶、淀粉酶等。

2.2.2 菌株 *Bacillus cereus* MBRH3 的 16S rRNA 基因序列测定及聚类分析 通过分子生物学手段获得MBRH3的16S rRNA基因,测序片段总长1,251 bp。登录<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>。利用blast进行同源性分析,结果显示,与Bosea sp. BIWAKO-01(AB425327.1)最接近,Max Ident达到99%。根据blast结果,选择有代表性的菌株使用软件Mega3.1利用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树(图2)。

从形态学、生理生化及分子生物学特征鉴定表明,该菌属于芽胞杆菌科(Bacillaceae),芽胞杆菌属(*Bacillus*),蜡样芽胞杆菌(*cereus*),命名为*Bacillus cereus* MBRH3。对于该菌能够以海带为原料生产

SOD 还未曾见过文献报道。本菌株保藏于中国典型微生物保藏中心(保藏号:CCTCC NO:M2013581)。

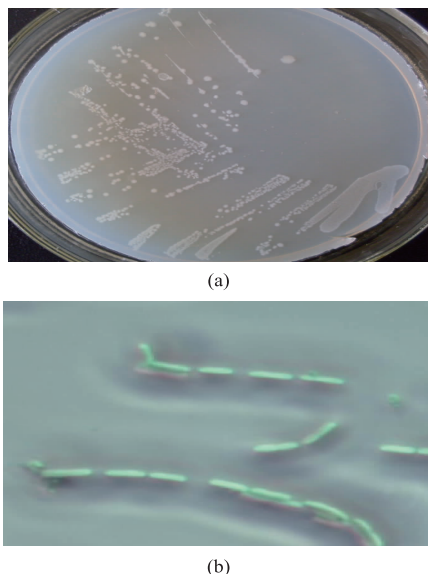


图1 *Bacillus cereus* MBRH3 的菌落(a)及显微照片(b)

Fig. 1 Clone (a) and micrographs (b) of *Bacillus cereus* MBRH3 sequences

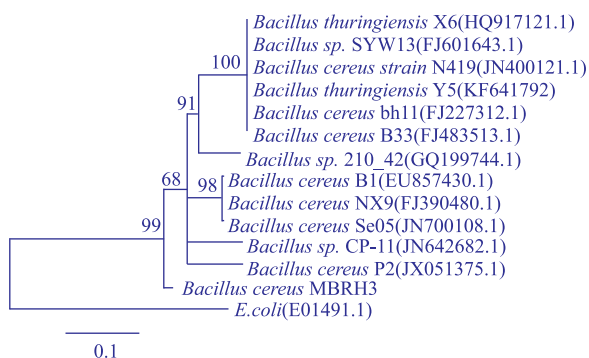


图2 基于 16S rRNA 基因序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining tree resulting from analysis of the 16S rRNA gene sequences

2.3 产酶条件的优化实验结果

利用海带生产 SOD 是本实验的出发点。采用单因素优化法确认对 SOD 产量有潜在影响的玉米浆粉、海带浆、葡萄糖及硫酸锰等营养因子,并通过爬坡实验确认该营养因子的大致水平,然后使用中心组合设计法(CCD)优化培养基。中心组合设计水平、编码及实验结果见表 2~6。软件拟合所得二次多项式方程式为:

$$Y = 193.78 + 4.30X_1 + 30.76X_2 + 10.71X_3 + 5.34X_4 + 11.82X_1X_2 + 1.04X_1X_3 + 8.18X_1X_4 + 6.50X_2X_3 - 0.70X_2X_4 - 11.00X_3X_4 - 19.70X_1^2 - 14.19X_2^2 - 25.49X_3^2 - 19.53X_4^2$$

中心组合实验设计方差及回归分析如表 2。由表可知,模型 $p=0.0054 < 0.05$,说明该模型在 99.5% 的概率水平下是显著的。而失拟合不显著($p=0.0517 > 0.05$),说明模型中无需再引入其他因素。决定系数 $R^2=0.9857$,说明 98.57% 实验变化情况都可以用该模型解释, $R^2_{adj}=0.9357$,与 R^2 相符,表明 SOD 条件优化发酵模型是基本合理的。图 3 表明,观测值与预测值都分布在同一直线附近,进一步说明该模型与事实是相符的。二次方系数的值分别是 -19.69, -14.17、-25.49 和 -19.53,说明抛物线开口向下,可求出最大值。对回归方程进行求导,结合图 4、图 5、图 6、图 7 和图 8 的三维响应面,求得该模型的最大值, $X_1=1, X_2=0.74, X_3=0.2$ 和 $X_4=0.61$,对应的玉米浆粉、海带浆、葡萄糖和硫酸锰的实际值(g/L)分别为 4.50, 4.11, 2.10 和 0.62,此模型的最大响应值为, 203.38 U/ml。实验结果显示 MBRH3 发酵产 SOD 的过程中,海带的作用是显著的($P_2=0.002 < 0.05$),这与以海带为唯一营养物质筛选的目标菌株相一致。也说明该菌株具有一定的特异性,他能很好利用海带。葡萄糖是微生物可直接利用的能源物质,本实验也显示葡萄糖对 SOD 的产生影响显著($P_2=0.002 < 0.0165$)。

图 4 反映了玉米浆和海带两种营养之间的关系以及对产 SOD 的影响,显著性检验显示 $P(0.0968) > 0.05$,说明它们之间的交互作用是不显著的,也就是说不管他们的值处于高水平还是低水平,其产酶能力都不能达到最大值。ANOVA 分析显示玉米浆粉与海带浆之间、玉米浆粉与葡萄糖之间、玉米浆粉与硫酸锰之间以及海带浆和葡萄糖之间相关性都不显著(表 2),但是从图 5~9 可知,各种营养因子对产 SOD 的影响都符合正态分布,说明该类物质作为产 SOD 的原料被微生物利用符合一般规律。作为产 SOD 的几种主要营养物质,只有葡萄糖与硫酸锰之间的交互作用显著($p=0.035 < 0.05$)的,改变他们在培养基里的浓度使其达到某一水平时可使产酶能力达到最大值。在产 SOD 过程中,葡萄糖与硫酸锰之间相互影响显著地原因可能是葡萄糖在被利用时,会产酸,造成发酵环境的 pH 值改变,发酵体系的 pH 值改变也会影响硫酸锰的吸收或改变了 SOD 的结构,这种改变又对菌株利用葡萄糖产生影响,这也从侧面说明该 SOD 与锰关系密切,属于 Mn-SOD。

表 1 中心组合设计水平、编码及实验结果

Table 1 Experimental design and results of the central composite design

实验号	编码值/水平								酶活/(U/mL)
	玉米浆粉		海带浆		葡萄糖		硫酸锰		
	编码	实际值/(g/L)	编码	实际值/(g/L)	编码	实际值/(g/L)	编码	实际值/(g/L)	
1	0	3.00	0	3.00	0	2.00	0	0.50	196.62
2	+1	4.50	+1	4.50	+1	2.50	-1	0.30	183.36
3	+1	4.50	+1	4.50	-1	1.50	-1	0.30	117.69
4	-1	1.50	-1	1.50	+1	2.50	-1	0.30	114.28
5	0	3.00	0	3.00	0	2.00	0	0.50	199.11
6	0	3.00	0	3.00	0	2.00	-1.68	0.16	126.52
7	-1	1.50	+1	4.50	+1	2.50	+1	0.70	136.32
8	+1	4.50	-1	1.50	+1	2.50	+1	0.70	91.41
9	0	3.00	0	3.00	-1.68	1.16	0	0.50	109.18
10	0	3.00	0	3.00	0	2.00	0	0.50	192.76
11	+1	4.50	-1	1.50	-1	1.50	+1	0.70	95.74
12	-1.68	0.48	0	3.00	0	2.00	0	0.50	127.82
13	-1	1.50	+1	4.50	-1	1.50	+1	0.70	118.84
14	0	3.00	0	3.00	0	2.00	+1.68	0.84	144.49
15	0	3.00	+1.68	5.52	0	2.00	0	0.50	201.43
16	-1	1.50	-1	1.50	-1	1.50	-1	0.30	78.77
17	0	3.00	0	3.00	+1.68	2.84	0	0.50	128.14
18	+1.68	5.52	0	3.00	0	2.00	0	0.50	142.27
19	0	3.00	-1.68	0.48	0	2.00	0	0.50	99.93

表 2 中心组合实验设计方差及回归分析

Table 2 Analysis of variance (ANOVA) and regression for chitinase production

来源	自由度	系数	平方和	均方	F	P> t
模型	14	4.68	27 320.98	1 951.5	19.70	0.005 4
X ₁ -玉米浆	1	0.34	104.40	104.40	1.05	0.362 6
X ₂ -海带浆	1	0.25	5 151.13	5 151.13	52.00	0.002 0
X ₃ -葡萄糖	1	0.52	1 565.47	1 565.47	15.80	0.016 5
X ₄ -硫酸锰	1	0.16	161.46	161.46	1.63	0.270 8
X ₁ X ₂	1	0.04	462.67	462.67	4.67	0.096 8
X ₁ X ₃	1	0.025	8.72	8.72	0.088	0.781 5
X ₁ X ₄	1	-0.19	221.45	221.45	2.24	0.269 2
X ₂ X ₃	1	-0.11	337.61	337.61	3.41	0.138 1
X ₂ X ₄	1	0.19	1.64	1.64	0.017	0.903 9
X ₃ X ₄	1	0.30	968.66	968.66	9.78	0.035 3
X ₁ ²	1	-0.95	5 138.57	5 138.57	51.88	0.002 0
X ₂ ²	1	-0.32	2 659.01	2 659.01	26.84	0.006 6
X ₃ ²	1	-0.53	8 605.75	8 605.75	86.88	0.000 7
X ₄ ²	1	-0.16	5 054.06	5 054.06	52.02	0.002 0
残差	4		396.22	99.06		
失拟合	2		375.75	187.87	18.35	0.051 7
纯误差	2		20.47	10.24		
合计	18		27 717.20			

R-Squared=0.985 7, Adj R-Squared=0.935 7

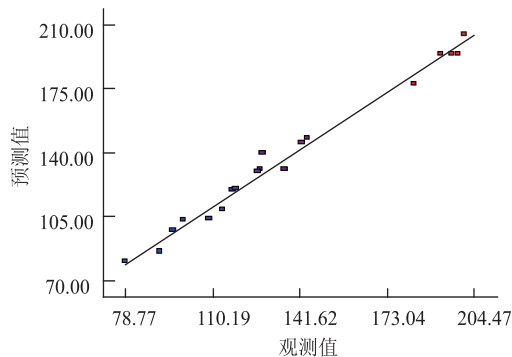


图 3 观测值与预测值之间关系图

Fig. 3 Plot of predicted vs actual chitinase activity (U/mL values)

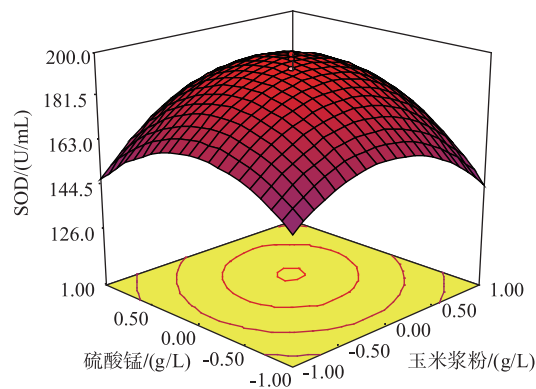


图 6 玉米浆粉及硫酸锰对 SOD 活性的影响三维图

Fig. 6 3D response surface curve for effects of Corn steep powder, magnesium sulfate and their mutual interaction

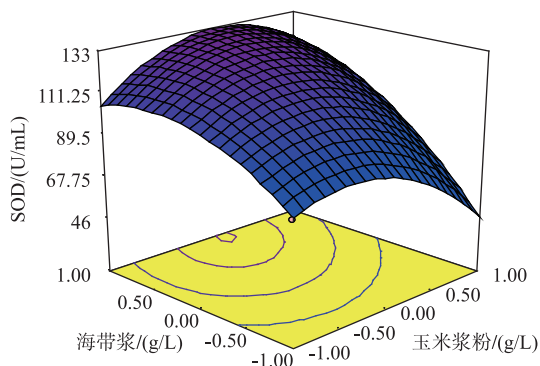


图 4 玉米浆粉及海带浆对 SOD 活性的影响三维图

Fig. 4 3D response surface curve for effects of Corn steep powder, Sea weed paste and their mutual interaction

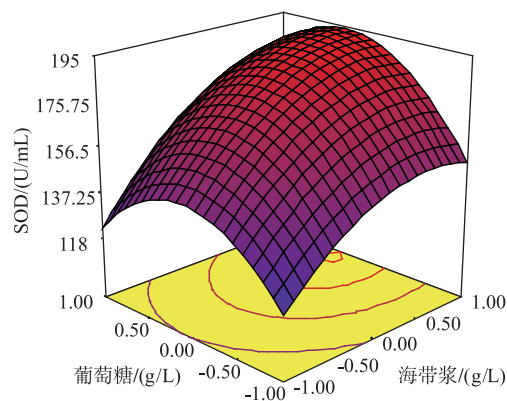


图 7 海带浆及葡萄糖对 SOD 活性的影响三维图

Fig. 7 3D response surface curve for effects of Sea weed paste, glucose and their mutual interaction

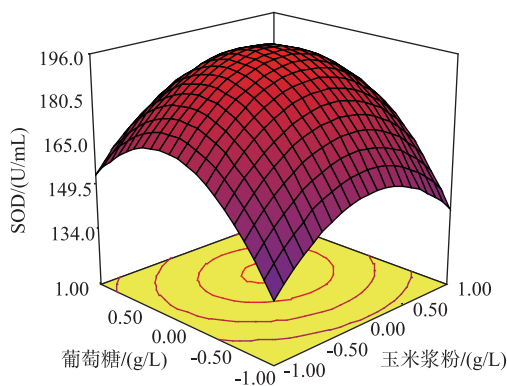


图 5 玉米浆粉及海带浆对 SOD 活性的影响三维图

Fig. 5 3D response surface curve for effects of Corn steep powder, glucose and their mutual interaction

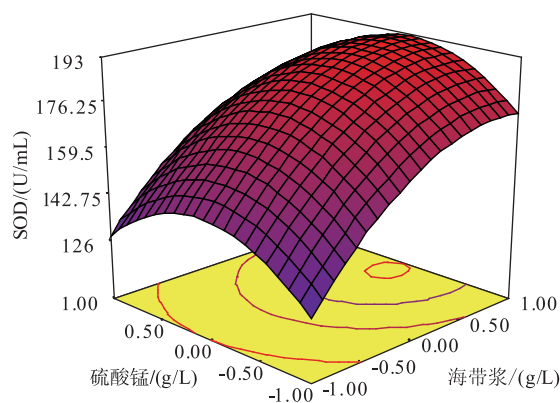


图 8 海带浆及硫酸锰对 SOD 活性的影响三维图

Fig. 8 3D response surface curve for effects of Sea weed paste, magnesium sulfate and their mutual interaction

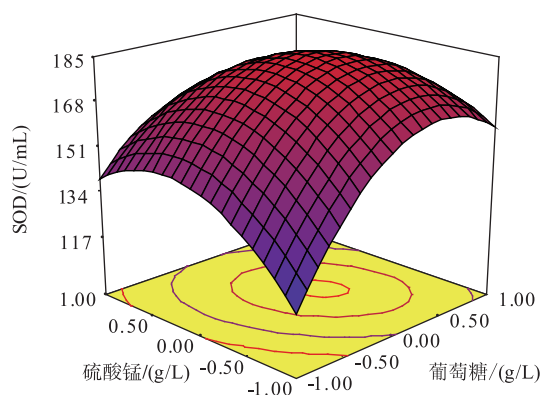


图9 葡萄糖及硫酸锰对 SOD 活性的影响三维图

Fig. 9 3D response surface curve for effects of glucose, magnesium sulfate and their mutual interaction

3 结语

细胞在代谢活动中都会产生活性氧 (reactive

oxygen species), 这样就必然激活细胞的自我保护机制, 产生 SOD 消除氧自由基是活细胞免受其毒害的主要途径之一。海洋微生物在温度、压力、渗透压等复杂的不良环境剧烈变化胁迫下, 会产生大量活性氧, 这种恶劣条件也必促使微生物增强其合成 SOD 的强度以消除氧自由基的毒害, 长期的进化使海洋微生物形成了完善的抗氧化机制, 从合成 SOD 这个角度来看, 海洋微生物与陆源微生物相比具有更大的优势和潜力。海带自身含有 SOD, 其主要成分海带多糖也具有清理氧自由基的功能, 以海带为原料利用海洋微生物生产 SOD 可使其优势充分发挥。

对 MBRH3 产 SOD 培养基的优化是挖掘其产酶潜力的最有效途径, 在资源日益匮乏的条件下, 选择廉价的生产原料对降低生产成本尤为重要, 以廉价的海带、玉米浆粉和葡萄糖为主要原料生产 SOD 有着成本优势, 是 SOD 产业化过程的有意义探索。

参考文献:

- [1] 谭天伟, 杨光忠, 马润宇. 用醇类从酵母中释放超氧化物歧化酶[J]. 生物工程学报, 1996, 12(2): 148-151.
TAN Tianwei, YANG Guangzhong, MA Runyu. Selective release of superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* by alcoholic solvent[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 1996, 12(2): 148-151. (in Chinese)
- [2] 陈忠宁, 毛宗万, 唐雯霞. 铜锌超氧化物歧化酶的结构机理及其模拟研究进展[J]. 化学通报, 1993, 6: 1-7.
- [3] 刁治民, 杜军华, 马寿福. 动物血液的开发利用[J]. 青海科技, 2000, 7(3): 7-10.
DIAO Zhimin, DU Junhua, MA Shoufu. Exploitation of the animal blood[J]. **Qinghai Science and Technol**, 2000, 7(3): 7-10. (in Chinese)
- [4] 王志鑫, 孔维宝. 大蒜超氧化物歧化酶(SOD)的提取及分离纯化方法研究综述[J]. 甘肃农业科技, 2010, 10(1): 43-47.
WANG Zhixin, KONG Werbao. Research progress on isolation and purification of superoxide dismutase (SOD) from Garlic[J]. **Guansu Agriculture Science and Technology**, 2010, 10(1): 43-47. (in Chinese)
- [5] 袁艺, 李纯, 张小青. 桑叶超氧化物歧化酶的提取和性质研究[J]. 安徽农业大学学报, 1997, 24(3): 297-301.
YUAN Yi, LI Chun, ZHANG Xiaoqing. Research on purity and features of superoxide dismutase of Mulberry leaf [J]. **Journal Anhui Agricultural University**, 1997, 24(3): 296-301. (in Chinese)
- [6] 余旭亚, 赵声兰, 李涛, 等. 仙人掌超氧化物歧化酶的纯化及其部分性质研究[J]. 精细化工, 2002, 19(4): 234-237.
YU Xuya, ZHAO Shenglan, LI Tao, et al. Purification and some properties of superoxide dismutase from Cactus [J]. **Fine Chemicals**, 2002, 19(4): 234-237. (in Chinese)
- [7] 王岁楼, 张平之, 张欣, 等. 酵母 SOD 形成的生理学研究[J]. 工业微生物, 1997, 27(3): 21-23.
WANG Shuilou, ZHANG Pingzhi, ZHANG Xin, et al. Physiological conditions of the SOD production from strain [J]. **Industrial Microbiology**, 1997(3): 21-23. (in Chinese)
- [8] 王素芳, 蒋琳兰, 赵树进. 微生物超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 药物生物技术, 2002, 9(6): 378-380.
WANG Sufang, JIANG Linlan, ZHANG Shujin. The development of research in the superoxide dismutase of microorganism[J]. **Pharmaceutical Biotechnology**, 2002, 9(6): 378-380. (in Chinese)
- [9] 施惠娟, 贺华君, 魏东芝, 等. 人 Mn-SOD cDNA 的克隆及高效表达[J]. 生物工程学报, 1999, 31(6): 707-710.
SHI Huijuan, HE Huajun, WEI Dongzhi, et al. Cloning and expression of Human Manganese-superoxide dismutase cDNA[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 1999, 31(6): 707-710. (in Chinese)
- [10] 刘增胜, 柳正. 中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.

- [11] 解秋菊, 闫培生, 池振明. 真姬菇 JB06 发酵海带废渣所得产物的抗自由基和总抗氧化能力[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(4): 429-432.
XIE Qiuju, YAN Peishen, CHI Zhenming. Anti-free radical and antioxidant activity of exopolysaccharide from fermented kelp waster by *Hypsizygus marmoreus* JB06[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(4): 429-432. (in Chinese)
- [12] 薛长湖, 徐强, 赵雪, 等. 琼脂低聚糖清除自由基的活性[J]. 水产学报, 2003, 27(3): 283-288.
XUE Changhu, XU Qiang, ZHAO Xue. Radical scavenging ability of agar oligomers [J]. **Journal of Fisheries of China**, 2003, 27(3): 283-288. (in Chinese)
- [13] 王悠, 唐学玺. 不同海带品系抗氧化系统活性耐热性的相关性研究[J]. 应用生态学报, 2005, 16(8): 1507-1512.
WANG You, TANG Xuexi. Relationships between antioxidant activities and heat-resistant features of two *Laminaria japonica* strains[J]. **Chinese Journal of Applied Ecology**, 2005, 16(8): 1507-1512. (in Chinese)
- [14] 郑铁曾, 涂提坤. SOD 酶活测定中连苯三酚自氧化法的探讨[J]. 天津微生物, 1995(1): 1-5.
ZHENG Tiejeng, TU Tikun. Investigation on pyrogallol self-oxidation for determination of SOD[J]. **Tianjing Microbiology**, 1995(1): 1-5. (in Chinese)
- [15] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [16] R.E.布坎南, N.E.吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [17] Kmpfer P, Young CC, Sridhar K, et al. Transfer of sancti, filiformis, japonensis and arvensicola to the genus Chitinophaga and description of Chitinophaga skermanii sp. nov.[J]. **Int J Syst Evol Micr**, 2006, 56(9): 2223-2228.
- [18] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms[J]. **J Mol Biol**, 1961, 3(2): 208-218.
- [19] Brosius J, Dull T J, Sleeter D D, et al. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli* [J]. **Journal of Molecular Biology**, 1981, 148(2): 107-127.
- [20] Weon H, Kim B, Yoo S, et al. *Andreprevotia chitinilytica* gen. nov., sp. nov., isolated from forest soil from Halla Mountain, Jeju Island, Korea[J]. **Int J Syst Evol Micr**, 2007, 57(7): 1572-1575.
- [21] Saitou N and Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. **Mol Biol Evol**, 1987, 4(4): 406-425.
- [23] Kimura M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. **J Mol Evol**, 1980, 16: 111-120.

科技信息

美国消费者要求 FDA 将芝麻纳入过敏原管理

应部分美国消费者要求, 美国公共事务科学中心 (CSPI) 要求 FDA 将芝麻籽及其制品纳入过敏原成分进行管理。

公共事务科学中心认为, 芝麻过敏人群在食用芝麻产品后身体会出现致命的反应, 因此对于这类食品需在配料表中标识芝麻过敏原。

据报道, 目前全美约有 50 万消费者对芝麻及其制品过敏, 美国现行标示管理法规对牛奶、鸡蛋、鱼、甲壳类水产品、坚果、花生、小麦、大豆 8 种食品原料进行管理, 还没有包括芝麻及其制品。另外, 加拿大、澳大利亚、欧盟都对芝麻及其产品按照过敏原进行管理。芝麻产品包括香油 (芝麻油) 和其他含芝麻成分的“天然风味成分”或“调味品”。

[信息来源] 食品伙伴网. 美国消费者要求 FDA 将芝麻纳入过敏原管理 [EB/OL]. (2014-12-5). <http://news.foodmate.net/2014/12/286676.html>