

SOD 乳酸菌高产菌株筛选鉴定及 SOD 分离纯化

邢德明^{2,3}, 李新华², 袁慎亮^{1,3}, 王晓辉^{*1,3}, 迟乃玉^{1,3}, 张庆芳^{1,3}

(1. 大连大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622; 2. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110866; 3. 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心, 辽宁 大连 116622)

摘要: 筛选出一株产 SOD 乳酸菌, 并对 SOD 进行分离纯化。采用平板富集、革兰氏染色等方法进行初筛。再通过邻苯三酚自氧化法检测 SOD 酶活进行复筛。并经形态学、生理生化试验、16S-rDNA 基因序列分析进行菌种鉴定。通过硫酸铵沉淀、超滤、Sephadex-G100、DEAE-Sephadex FF 等方法进行纯化。筛选得到一株产 SOD 相对较高菌株 SD006, 经鉴定为 *Lactobacillus plantarum*, 纯化后酶活达 37 959.2 U/g。细菌 SD006 是一株产 SOD 的植物乳酸菌, 乳酸菌是一种人体益生菌, 乳酸菌 SOD 可作为食用 SOD 添加到食品中, 具有潜在开发价值和广阔应用前景。

关键词: 乳酸菌; 超氧化物歧化酶; 鉴定; 分离纯化

中图分类号: Q 939.99 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)02—0156—06

Isolation, Identification and Enzyme Purification of a SOD High Producing Strain of Lactic Acid Bacteria

XING Deming^{2,3}, LI Xinhua², YUAN Shenliang^{1,3}, WANG Xiaohui^{*1,3}, CHI Naiyu^{1,3}, ZHANG Qingfang^{1,3}

(1. College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China; 2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 3. Liaoning Technology of Marine Microbiological Engineering Research Center, Dalian 116622, China)

Abstract: One SOD high-producing strain was screened and identified from lactic acid bacteria. The SOD enzyme was purified. The microbial enrichment, Gram staining and Pyrogallol autoxidation determination method were used in the screening. Morphological characteristics, physiology and biochemistry experiments, 16S-rDNA sequencing were used for the strain identification. The SOD enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation, ultrafiltration, sephadex-G100, DEAE-Sephadex FF etc. A SOD high-producing strain (SD006) was obtained and identified as *Lactobacillus plantarum*. The activity of purified enzyme reached 37 959.2 U/g SD006 is a SOD high-producing probiotics strain of *Lactobacillus plantarum*. The SOD purified from *Lactobacillus* is valuable and can be developed and applied in the food industry.

Keywords: *Lactobacillus*, SOD, identification, purification

收稿日期: 2014-05-05

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA021306)。

* 通信作者: 王晓辉(1981—), 女, 辽宁大连人, 工学博士, 讲师, 主要从事微生物与酶工程方面的研究。E-mail: wangxiaohui@dlu.edu.cn

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, ECl. 15.1.1, 简称 SOD), 是一种广泛存在于生物体内的酸性金属酶。1938 年由 Mann 和 Keilin 从牛红细胞中分离得到。1969 年 Mccord 和 Fridovich 发现该酶生物催化活性并命名为超氧化物歧化酶^[1-2]。SOD 是生物体内最佳的自由基清除剂, 其应用广泛, 可应用于医药、食品、化妆品等领域^[3-6]。目前 SOD 主要是从动物血液及植物中提取。从动物血液或植物中提取 SOD 存在成本高、易污染、易受季节影响等缺点; 而微生物 SOD 则具有成本低、不易被污染、不受季节影响、工艺简单、易形成规模化生产等优点^[7-8]。目前产 SOD 菌株研究多集中在酵母菌, 对产 SOD 乳酸菌研究较少。乳酸菌是一类重要的工业微生物, 其不仅可以提高食品营养价值, 改善食品风味, 且乳酸菌是人体益生菌, 有增强人体免疫力、降血压等作用^[9-14], 因此产 SOD 乳酸菌选育具有潜在开发价值和前景。

通过邻苯三酚自氧化法从酸菜、牛奶、大酱等食品中筛选出一株产 SOD 酶活较高的菌株, 并对其 SOD 进行初步纯化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 采自辽中地区农村鲜牛奶、农家酸菜汁、农家黄豆酱样品共计 50 份。

1.1.2 主要仪器 雷磁 PHS-3C 型 pH 计: 上海精科制造; JY98-3D 超声波细胞破碎机; 宁波新芝生物科技有限公司; HD-4 电脑核酸蛋白检测仪: 上海沪西分析仪器有限公司; CBS-B 程控多功能自动部份收集器: 上海沪西分析仪器有限公司; UV-1200 型紫外可见分光光度计: 上海美谱达仪器有限公司。

1.1.3 主要试剂 邻苯三酚 AR(沪试); 磷酸氢二钠 AR(沪试); 磷酸二氢钠 AR(沪试); EDTA(Sigma 公司)。

1.1.4 富集培养基 蛋白胨 1 g/dL、酵母膏 0.5 g/dL、NaCl 1 g/dL、琼脂 2 g/dL; pH 7.0(0.1 MPa 灭菌 20 min)。

1.1.5 初筛培养基 葡萄糖 2.5 g/dL、蛋白胨 2.5 g/dL、酵母膏 1 g/dL、溴甲酚紫 0.02 g/dL、琼脂 2 g/dL; pH 7.0(0.1 MPa 灭菌 20 min)。

1.1.6 发酵培养基 牛肉膏 0.5 g/dL、酵母粉 0.5 g/dL、

蛋白胨 1 g/dL、磷酸氢二钾 0.2 g/dL、柠檬酸铁铵 0.15 g/dL、乙酸钠 0.5 g/dL、葡萄糖 2 g/dL、吐温-80 0.1 g/dL、MgSO₄·7H₂O 0.05 g/dL、MnSO₄·4H₂O 0.02 g/dL; pH 7.0(0.1 MPa 灭菌 20 min)。

1.2 方法

1.2.1 产 SOD 乳酸菌初筛 将样品接种于 10 mL LB 发酵液中做种子液, 于 25 ℃培养 12 h, 将种子液分别稀释 10⁻⁷、10⁻¹⁰、10⁻¹³、10⁻¹⁶ 四个梯度, 涂布于富集培养基上, 25 ℃培养 36 h, 将不同菌落分别划线在初筛培养基上, 25 ℃培养 36 h。把使初筛平板变色的菌株进行革兰氏染色。将革兰氏阳性且无芽孢的菌株送宝生物工程(大连)有限公司鉴定。将鉴定为乳酸菌的菌株接种于发酵培养基中, 25 ℃、150 r/min 摇床培养 36 h。

1.2.2 产 SOD 乳酸菌复筛 将初筛菌株发酵液于 4 ℃、5 000 r/min 离心 15 min 得到湿菌体, 用无菌水洗 2 次, 4 ℃、5 000 r/min 离心 15 min, 将湿菌体用 pH 7.8 磷酸缓冲液按 1:5 比例稀释, 于 300 W 超声波、冰浴下破碎 20 min(破碎 5 s 间隔 5 s), 6 000 r/min 离心 20 min, 收集上清即粗酶液。采用邻苯三酚自氧化法^[15-16]分别测定各菌株粗酶液 SOD 酶活。

酶活定义: 以 1 mL 反应液每分钟抑制邻苯三酚自氧化速度 50% 的酶量为一个超氧化物歧化酶酶活力单位。

1.2.3 菌株的鉴定

1) 形态学观察: 在平板培养基上观察菌落形状、颜色、大小等形态学特征, 通过不同染色方法在光学显微镜(10×100)下观察菌落形态。

2) 生理生化研究: 根据《常见细菌系统鉴定手册》设计生理生化实验, 对葡萄糖、麦芽糖、乳糖、鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露醇、山梨醇、甘油、明胶液化、H₂O₂、吲哚、甲基红等指标进行生理生化试验。

3) 16S rDNA 序列分析: 采用酚氯仿抽提法提取菌株 DNA。使用细菌 16S rDNA 的通用引物进行 PCR 扩增, 设计引物序列为 Forward primer P1(5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 Reverse primer P2(5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。扩增反应体系 Ex Taq (5 U/μL) 0.25 μL, Buffer 5.0 μL, dNTP mixture 5.0 μL, P1 primer 1.0 μL, P2 primer 1.0 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 循环条件: 98 ℃预变性 4 min, 一次循环; 98 ℃变性 30 s, 55 ℃复性 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 30 次循环; 修复延伸, 72 ℃ 5 min。

PCR 扩增产物送上海生工生物有限公司测序。

提交菌株 SD006 的 16SrDNA 序列在 NCBI 数据库中进行比对, 选取相似性最高的 20 株菌的 16SrDNA 序列, 进行 ClustalX 比对, 利用 MEGA5.05 软件分析, 构建系统发育树。

1.2.4 SOD 纯化

1) 硫酸铵沉淀: 粗酶液中加入硫酸铵, 4 °C 盐析 12 h, 蛋白质沉淀用 pH 7.8 的磷酸缓冲液 (含 EDTA 0.2 mmol/L) 溶解。分别测不同浓度下得到的沉淀酶活, 最后收集含酶活的蛋白沉淀, 溶解得盐析酶液。

2) 透析超滤: 将盐析酶液转入预先处理好的透析袋中, 4 °C 透析 24 h, 用于除去小分子物质及金属离子。将透析后的酶液转入 10 000 超滤管, 4 °C、5 000 r/min 离心 30 min。回收浓缩酶液, 4 °C 保藏。

3) 葡聚糖(G-100)凝胶柱: 取 5 mL 浓缩酶液, 加入经 pH 6.8 磷酸缓冲液预平衡的 Sephadex G100 柱(Φ 1.6 cm $\times$ 50 cm), 调节恒流泵洗脱速度 0.3 mL/min。调节自动收集器每管 3 mL, 根据洗脱峰记录试管编号, 分别测定每管酶活。

4) DEAE-Sephrose FF: 取 5 mL 酶液, 加入经 pH 7.8 磷酸缓冲液预平衡的 DEAE-Sephrose FF 柱(Φ 1.6 cm $\times$ 30 cm), 依次用含 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L NaCl 的 pH 7.8 磷酸缓冲液洗脱。调节恒流泵洗脱速度 0.3 mL/min。调节自动收集器每管 3 mL, 根据洗脱峰记录试管编号, 分别测定每管酶活。

5) SDS-PAGE: 采用 SDS-PAGE 鉴定酶液纯化程度, 用考马斯亮蓝染色法确定电泳条带位置。电泳规格: 分离胶 12 g/dL, 浓缩胶 5 g/dL, 电压 150 V, 1.5 mm 梳, 时间 2 h, 考马斯亮蓝 R250 染色。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选及鉴定

2.1.1 菌种筛选

1) 产 SOD 乳酸菌菌株初筛: 从所采集的样品中共分离得到 57 株菌株, 其中使 BCP 平板变色的产酸菌 32 株, 镜检革兰氏染色阳性无芽孢菌株 21 株, 经鉴定, 其中 17 株为乳酸菌。

2) 产 SOD 乳酸菌菌株复筛: 在初筛基础上, 利用邻苯三酚自氧化法测出初筛分离得到的乳酸菌 SOD 粗酶液酶活和菌体湿重, 见表 1。其中菌株 SD006 菌体湿重为 31.7 g/L, 酶活 2 957.63 U/g。其

酶活相对较高, 因此选用 SD006 为本实验出发菌株。

表 1 菌株 SOD 酶活及菌体湿重

Table 1 SOD activity and bacterial wet weight of strains

菌株编号	菌体湿重/(g/L)	SOD 酶活/(U/g)
SD001	29.20	1702.03
SD002	25.60	1682.91
SD003	27.30	1739.32
SD004	21.20	1893.27
SD005	28.40	1539.92
SD006	31.70	2957.63
SD007	16.30	2219.72
SD008	17.90	1998.32
SD009	16.20	1772.21
SD010	30.00	2148.65
SD012	28.30	1340.81
SD013	32.00	2173.20
SD014	25.70	1802.26
SD015	19.20	2760.17
SD016	28.90	1587.77
SD017	26.30	1289.63

2.1.2 菌株 SD006 鉴定

1) 形态学观察: 由图 1-2 可知, 菌株 SD006 为圆形菌落, 菌落突起, 表面光滑。镜检为革兰氏阳性, 杆状, 无芽孢。



图 1 菌株 SD006 平板划线图

Fig. 1 Streak plate of strain SD006



图 2 菌株 SD006 显微形态特征

Fig. 2 Micro-morphology of strain SD006

2)生理生化试验:菌株 SD006 的生理生化特征测定结果见表 2。菌株 SD006 可分解葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、麦芽糖、乳糖。甲基红试验、甘露醇试验、山梨醇试验为阳性。明胶水解试验、H₂O₂ 试验、吲哚试验、H₂S 产生试验、硝酸盐还原试验、淀粉水解试验、氧化酶试验、接触酶试验、鼠李糖试验、甘油试验呈阴性。

表 2 菌 SD006 生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strains SD006

鉴定特征	菌株 SD006	鉴定特征	菌株 SD006
明胶液化试验	-	葡萄糖	+
H ₂ O ₂ 试验	-	麦芽糖	+
吲哚试验	-	乳糖	+
H ₂ S 产生试验	-	鼠李糖	-
甲基红试验	+	甘露醇	+
硝酸盐还原试验	-	阿拉伯糖	+
淀粉水解试验	-	山梨醇	+
氧化酶试验	-	木糖	+
接触酶试验	-	甘油	-

注:+:阳性反应;-:阴性反应。

3)菌株 16sRNA 序列分析:通过 16sRNA 序列分析菌株 SD006 含 1 417 bp, 将基因序列输入 GenBank 数据库进行比对,基于与 SD006 同源性较高的菌株构建系统发育树, 见图 3。其与 *Lactobacillus plantarum* (NR 042394.1)同源性最高。SD006 与 *Lactobacillus plantarum* 相似性达 99%, 结

合生理生化特征, 可确定 SD006 属于 *Lactobacillus plantarum*。

2.2 SOD 纯化

经邻苯三酚自氧化法检测,粗酶液硫酸铵 40%~70%梯度盐析沉淀含有 SOD 酶活, 其它梯度未检测出 SOD 酶活,因此选用 40%~70%梯度盐析,见表 3。将沉淀用 pH 7.8 磷酸缓冲液溶解,进行透析袋透析,超滤膜超滤除杂浓缩,浓缩液经 Sephadex - G100 凝胶柱层析,结果见图 4。在整个洗脱过程出现 4 个蛋白质峰, 分别测定各试管酶活,SOD 酶活存在于第二个蛋白质峰(13~37 管)内,收集第二个蛋白质峰内酶液。20 ℃预冷 5 h,冷冻干燥浓缩。

将浓缩酶液用 DEAE-Sephadex FF 柱洗脱,结果见图 5。在整个洗脱过程中出现 3 个蛋白质峰,分别测定各管酶活,SOD 酶活主要存在于第三个蛋白质峰内,说明 DEAE 琼脂糖除去了一部分杂蛋白质。将第三个峰(31~56 管)收集到的酶液,20 ℃预冷 5 h,冷冻干燥浓缩。

2.3 SDS-PAGE 结果

将分离纯化处理的酶液进行 SDS-PAGE,结果见图 6。粗酶液经过硫酸铵沉淀、透析袋透析、超滤膜超滤、Sephadex- G100 凝胶柱和 DEAE-Sephadex FF 柱分离后的电泳得到了单一条带,说明纯化效果较好,根据相对迁移率相对分子质量关系,可以计算出该 SOD 的相对分子质量为 39 290。

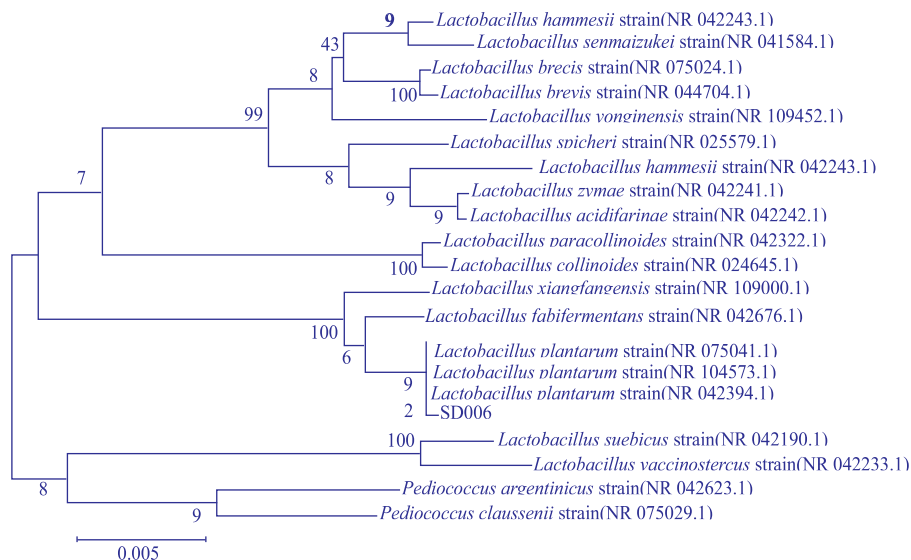


图 3 植物乳酸杆菌 SD006 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree showing the relationships of SD006 with the sequence of relating type

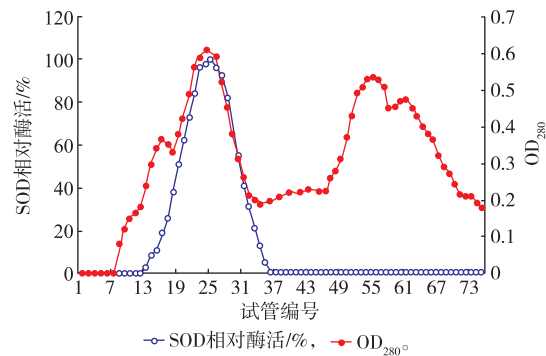


图 4 葡聚糖凝胶 G-100 洗脱结果

Fig. 4 Eluting result of Sephadex G-100 column chromatography

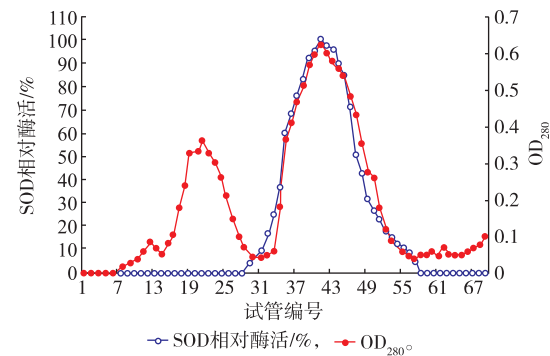


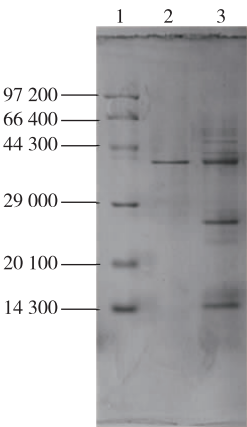
图 5 DEAE-琼脂糖凝胶 FF 洗脱结果

Fig. 5 Eluting result of DEAE-Sephadex FF column chromatography

表 3 SOD 纯化结果

Table 3 Result of isolation and purification

方法	总蛋白质质量/mg	总活力/U	比酶活/(U/g)	回收率/%	纯化倍数
抽提	281.88	37137.00	4126.00	100.00	1.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析	167.08	33185.62	6890.42	89.36	1.67
超滤	101.70	23667.98	10810.12	71.32	2.62
Sephadex G100 凝胶过滤	15.02	13964.11	21867.8	59.00	5.3
DEAE-Sephadex FF 离子色谱	7.67	5522.81	37959.2	39.55	9.2



1-Marker;2-DEAE-Sephadex FF;3-Sephadex G-100

图 6 不同纯化阶段酶液 SDS-PAGE 结果

Fig. 6 SDS-PAGE of SOD solution at different stages of purification

3 结 语

通过富集培养的方法从牛奶等分离得到 57 株菌,其中乳酸菌 17 株,从中筛选得到一株产 SOD 酶

活相对较高的乳酸菌 SD006,经生理生化实验和 16SrDNA 基因序列分析,鉴定为 *Lactobacillus plantarum*。培养液经过硫酸铵沉淀、透析超滤、Sephadex-G100 层析、DEAE-Sephadex FF 离子交柱色谱等步骤分离纯化,经 SDS-PAGE 得到单一条带,说明纯化效果较好,其纯化后酶活达到 37 959.2 U/g。

目前世界各国对 SOD 应用的开发主要集中在医药领域,但随着人们生活水平的提高,人们对健康的观念从传统的药物治疗向食品保健方面转化,SOD 在食品上的应用将越来越受人们的关注。但目前 SOD 食品种类还相对较少,尚不能满足人们对 SOD 食品的需求。因此应加强 SOD 在食品领域的应用研究。近年微生物 SOD 成为研究热点,但对产 SOD 乳酸菌的菌种选育研究相对较少,乳酸菌是一种人体益生菌,同时是一种重要的工业微生物,其用途广泛,尤其是在食品领域,因此乳酸菌 SOD 菌种选育有利于 SOD 在食品领域的应用开发。

参考文献:

[1] McCord J M,Irwin Fridovich. Superoxide dismutase;an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein)[J]. J Biol Chem, 1969,2(44):6049-6055.

- [2] 陈惠芳,王琦,付学池,等. 超氧化物歧化酶(SOD)的分子生物学[J]. 生命的化学,2003,23(4):291-293.
CHEN Huifang, WANG Qi, FU Xuechi, et al. Molecular biology of superoxide dismutase[J]. **Chemistry of Life**, 2003, 23(4): 291-293. (in Chinese)
- [3] 朱秀敏. 超氧化物歧化酶的生理活性[J]. 当代医学, 2011, 17(15): 26-27.
ZHU Xiumin. Physiological activity of superoxide dismutase[J]. **Contemporary Medicine**, 2011, 17(15): 26-27.
- [4] Muscoli C, Cuzzocrea S, Riley D P, et al. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies[J]. **British Journal of Pharmacology**, 2003, 40(1): 445-460.
- [5] 王素芳,蒋琳兰,赵树进. 微生物超氧化物歧化酶研究进展[J]. 药物生物技术, 2002, 9(6): 378-380.
WANG Sufang, JIANG Linlan, ZHAO Shujin. The development of research in the superoxide dismutase of microorganism[J]. **Pharmaceutical Biotechnology**, 2002, 9(6): 378-380. (in Chinese)
- [6] Yun Y S, Lee Y N. Purification and some properties of superoxide dismutase from *Deinococcus radiophilus*, the UV-resistant bacterium[J]. **Extremophiles**, 2004, 32(8): 237-242. (in Chinese)
- [7] 杨明琰, 张晓琦, 沈俭, 等. 微生物产超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(1): 49-52.
YANG Mingyan, ZHANG Xiaoqi, SHEN Jian, et al. Research progress in extrating superoxide dismutase from microorganism[J]. **Journal of Microbiology**, 2004, 24(1): 49-52. (in Chinese)
- [8] 田春美, 钟秋平. 超氧化物歧化酶现状研究进展[J]. 中国热带医学, 2005, 8(5): 1730-1732.
TIAN Chunmei, ZHONG Qiuping. Advance in current research of superoxide dismutase[J]. **China Tropical Medicine**, 2005, 5(8): 1730-1732. (in Chinese)
- [9] 王小英, 马文丽, 郑文岭. 乳酸菌超氧化物歧化酶基因的克隆与特性分析[J]. 海南医学院学报, 2009, 15(6): 548-552.
WANG Xiaoying, MA Wenli, ZHENG Wenling. Clone and characteristic analysis of superoxide dismutase (SOD) in lactic acid bacteria[J]. **Journal of Hainan Medical College**, 2009, 15(6): 548-552. (in Chinese)
- [10] 谢继清, 李玉华, 杨春梅, 等. 超氧化物歧化酶的药理作用[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(1): 72-74.
XIE Jiqing, LI Yuhua, YANG Chunmei, et al. Pharmacology activities of superoxide dismutase [J]. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**, 2009, 30(1): 72-74. (in Chinese)
- [11] Abe M, Nishidai T, Yukawa Y, et al. Studies on the radioprotective effects of superoxide dismutase in mice[J]. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 1981, 16(7): 205-209.
- [12] Chikanza I, Fernandes L. Novel strategies for the treatment of os-teroarthritis [J]. **Expert Opin Invest Drugs**, 2000, 9(7): 1499-1503.
- [13] Khan M A, Van D J, Yeung I W, et al. Partial volume rat lung irradiation, assessment of early DNA damage in different lung regions and effect of radical scavengers[J]. **Radiother Oncol**, 2003, 66(1): 95-102. (in Chinese)
- [14] 彭丹, 孙材江, 周江南. 一氧化氮在实验性骨关节炎软骨细胞凋亡中的作用[J]. 中华风湿病学杂志, 2000, 4(4): 232-234.
PENG Dan, SUN Caijiang, ZHOU Jiangnan. The regulation effect of NO in the apoptosis of chondrocytes in experimental OA[J]. **China Journal of Rheumatology**, 2000, 4(4): 232-234. (in Chinese)
- [15] 丁克祥. 对邻苯三酚自氧化法实验影响因素的研究[J]. 海军工程学院学报, 1986, 36(3): 109-113.
DING Kexiang. Research on influence factors of pyrogallol autoxidation method [J]. **Journal of Naval University of Engineering**, 1986, 3(36): 109-113. (in Chinese)
- [16] 严万里, 陈晓明, 郭丽艳, 等. 超氧化物歧化酶活性测定的影响因素研究[J]. 生物学通报, 2011, 46(3): 50-53.
YAN Wanli, CHEN Xiaoming, GUO Liyan, et al. Research on influencing factors of superoxide dismutase activity assay[J]. **Bulletin of Biology**, 2011, 46(3): 50-53. (in Chinese)
- [17] 黎瑞珍, 杨庆建, 陈贻锐. 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定及其应用研究[J]. 琼州大学学报, 2004, 28(5): 34-37.
LI Ruizhen, YANG Qingjian, CHEN Yirui. Study of determination of superoxide dismutase (SOD) activation and application[J]. **Journal of Qiongzhou University**, 2004, 28(5): 34-37. (in Chinese)