

植物乳杆菌 CLP0279 产低温超氧化物歧化酶发酵条件的优化

李晓艳 于爽 窦少华 张庆芳 迟乃玉 王晓辉*

(大连大学生命科学与技术学院 辽宁 大连 116622)

Optimization of fermentation conditions for a cold-adapted superoxide dismutase (SOD) produced by *Lactobacillus plantarum* sp. CLP0279

LI Xiao-Yan YU Shuang DOU Shao-Hua ZHANG Qing-Fang
CHI Nai-Yu WANG Xiao-Hui*

(College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, EC 1.15.1.1, 简称 SOD), 是广泛存在于生物体内的酸性金属酶^[1], 能够催化超氧阴离子自由基歧化生成氧和过氧化氢, 具有抗炎症、抗辐射、抗衰老等作用^[2-4]。海洋微生物生产的低温 SOD 具有低温下高活力及高催化效率; 温和的热处理即可使酶活力丧失, 且不会影响产品的品质等特性^[5-7]。截止目前, 国内外仅有 10 多种海洋低温 SOD 相关报道^[8-12], 但其酶活力相对较低, 不能满足工业化生产要求。

植物乳杆菌作为人体肠道益生菌, 具有维持肠道内菌群平衡、提高机体免疫力等多种功能^[13-15]。目前对海洋来源植物乳杆菌生产低温 SOD 研究较少。本实验室早期从海洋环境中筛选到一株高产低温 SOD 的 *Lactobacillus plantarum* sp.

CLP0279, 以其为研究对象, 在单因素试验的基础上, 采用 Plackett-Burman 设计和响应面设计对其发酵条件进行优化, 为其工业化生产应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Lactobacillus plantarum* sp. CLP0279 筛选自中国辽宁大连黄海海水、海泥, 保藏于辽宁省海洋微生物工程技术研究中心。

1.1.2 培养基: 种子培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, 磷酸氢二钾 2.0, 磷酸二氢钾 1.5, 乙酸钠 5.0, 酵母粉 5.0, 硫酸铜 0.017, 硫酸锌 0.015, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): 玉米粉 20.0, 磷酸氢二钾 2.0, 磷酸二氢钾 1.5, 乙酸钠 5.0, 酵母粉 5.0, 硫酸铜 0.01, 硫酸锌 0.005, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

Foundation item: National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA093512); National Natural Science Foundation of China (No. 31500039)

*Corresponding author: Tel: 86-411-87402624; E-mail: wangxiaohui@dlu.edu.cn

Received: September 13, 2015; Accepted: June 12, 2016

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划) (No. 2014AA093512); 国家自然科学基金项目(No. 31500039)

*通讯作者: Tel: 86-411-87402624; E-mail: wangxiaohui@dlu.edu.cn

收稿日期: 2015-09-13; 接受日期: 2016-06-12

1.2 培养方法

挑取单菌落接种于 5 mL 液体种子培养基。按 8% 接种量将二级种子液接入发酵培养基中, 于 20 °C、160 r/min 培养 48 h。

1.3 SOD 酶活测定方法

发酵液 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min, 弃上清。湿菌体磷酸缓冲液(pH 7.0)溶解后超声波处理, 弃沉淀, 上清即为粗酶液。粗酶液在 15–50 °C 下测定酶活性, 以最大值为 100%。确定 SOD 最适反应温度。

采用 Marklund 等^[16]报道的邻苯三酚自氧化法测定 SOD 酶活。酶活力定义: 1 mL 反应液每分钟抑制邻苯三酚自氧化速度 50% 所需酶量。

1.4 实验设计

1.4.1 单因素实验: 采用单因素实验考察温度、初始 pH、时间等对 *Lactobacillus plantarum* sp. CLP0279 产 SOD 的影响。

1.4.2 Plackett-Burman 设计实验: 选取 $n=12$ 的 Plackett-Burman 设计对单因素实验选择的 5 个因素进行价效考察; 并设计 6 项虚拟项(A、C、E、G、J、L)。见表 1。

1.4.3 最陡爬坡实验设计: 根据 Plackett-Burman 实验及其分析结果设计最陡爬坡实验, 根据拟合线性回归系数的符号以及大小来对显著因素进行步长和变化方向设计。

1.4.4 Box-Behnken 法实验设计: 通过最陡爬坡试验结果分析, 确定出显著因子的高、中、低三水平, 分别表征为 1、0、-1。以温度、时间、初始 pH 为自变量设计 $n=15$ 组的 Box-Behnken 实验。如表 2 所示。

表 1 Plackett-Burman (PB) 实验各因素和水平设计
Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman (PB) design

Code	Parameters	Levels	
		Low (-1)	High (+1)
B	Temperature (°C)	22	24
D	Fermentation time (h)	72	84
F	Initial pH	7.5	8.0
H	Inoculums (%)	8	10
K	Medium volume (per 500 mL)	75	100

表 2 Box-Behnken (BB) 实验各因素和水平设计
Table 2 Factors and levels of Box-Behnken (BB) design

Factors	Levels		
	-1	0	+1
Temperature (°C)	18	20	22
Fermentation time (h)	60	66	72
Initial pH	6.5	7.0	7.5

2 结果与分析

2.1 SOD 粗酶液最适作用温度与单因素实验

Lactobacillus plantarum sp. CLP0279 摇瓶发酵 48 h 产 SOD 粗酶液最适作用温度为 30 °C (图 1A)。由图 1B 可知, 菌株产酶最佳温度为 22 °C, 初步确定为耐冷菌^[17], 而且生产低温 SOD^[18]。单因素实验确定初始 pH 7.0、培养时间 72 h、接种量 8%、装液量 75 mL/500 mL (图 1C–F)。

2.2 发酵条件的 Plackett-Burman (PB) 设计

表 1 和 Minitab17 软件得到 PB 实验设计。由表 3 得到 PB 设计的各因素水平及效应评价见表 4。由表 4 可知温度、时间、初始 pH 影响 *Lactobacillus plantarum* sp. CLP0279 产低温 SOD 酶活的可信度大于 95%, 达到显著水平。

2.3 发酵条件的最陡爬坡试验研究最大响应值区域

试验设计和结果如表 5 所示, 第 2 组实验中, 当温度 20 °C, 时间 66 h, 初始 pH 7.0 时酶活达到最大, 最大值为 220.12 U/mL。第 2 组实验作为中心组合实验的中心点。

2.4 发酵条件的 Response surface method (RSM) 设计

2.4.1 Box-Behnken (BB) 中心组合实验设计: 响应面分析设计实验结果见表 6。

2.4.2 二次回归拟合与方差分析: 运用 Minitab17 软件对试验数据进行回归分析, 得出回归方程:

$$Y=219.42-14.963X_1+13.446X_2+1.646X_3-19.663X_1^2-14.84X_2^2-25.97X_3^2+14.748X_1X_2+2.343X_1X_3+10.075X_2X_3。$$

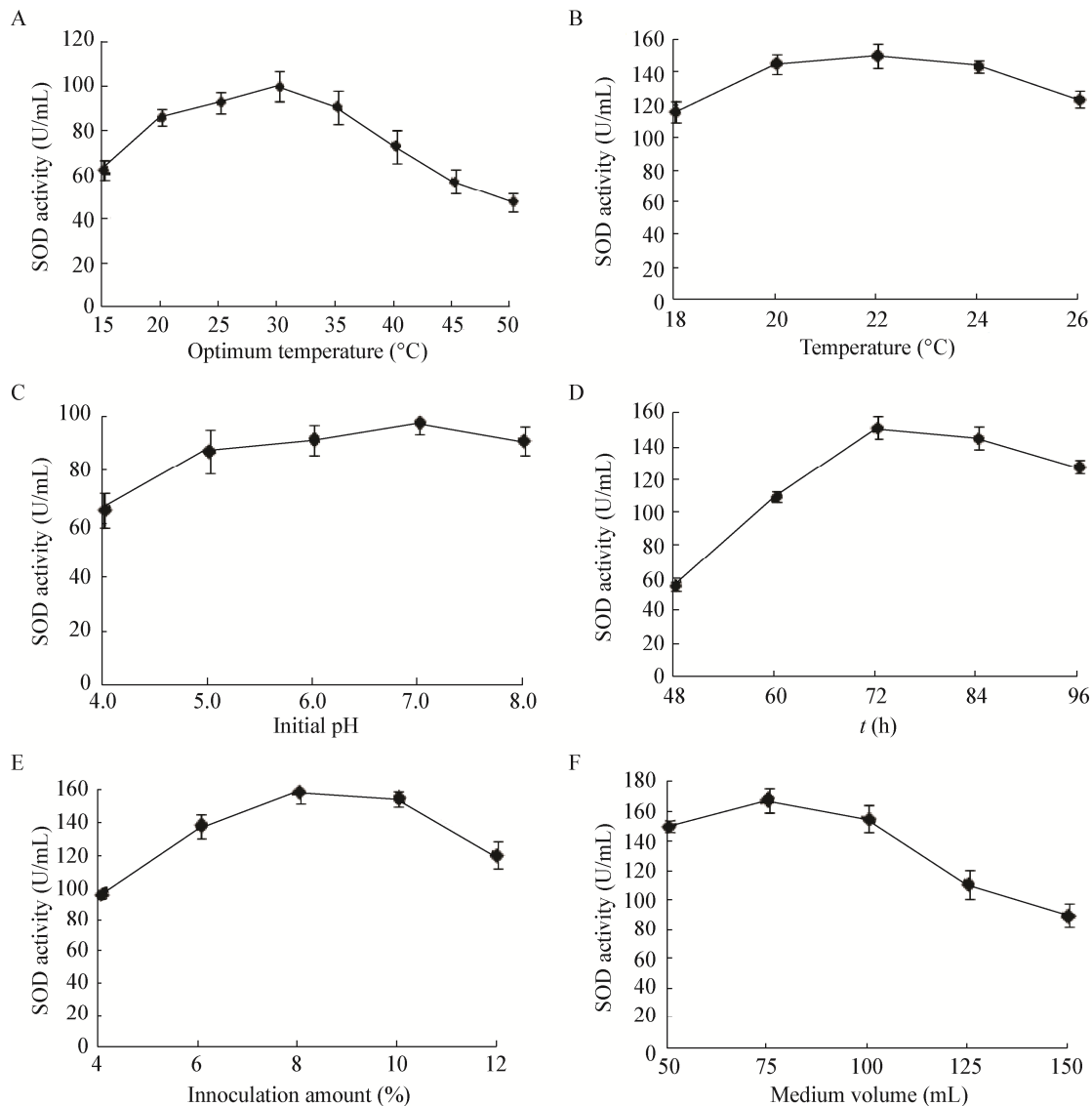


图 1 SOD 粗酶液最适作用温度与单因素实验结果

Figure 1 The optimum temperature of the crude SOD and the results of single factor experiment

注：SOD 粗酶液最适作用温度(A)、温度(B)、初始 pH (C)、时间(D)、接种量(E)、装液量(F)对产酶影响。

Note: A, B, C, D, E, F: Displayed the effect of the optimum temperature of the crude SOD, temperature, initial pH, time, inoculation amount and medium volume on the SOD activity, respectively.

显著性检验和方差分析见表 7。从表 7 结果可知温度因子的平方的 P 值为 0.206、温度与初始 pH 交互因子的 P 值为 0.204 > 0.05, 说明温度因子的平方、温度与初始 pH 的交互因子对 *Lactobacillus plantarum* sp. CLP0279 酶活力的影响不显著, 由此可知 *Lactobacillus plantarum* sp. CLP0279 酶活力变化相当复杂, 试验因子对酶活的影响不是简单的

线性关系, 温度、时间、初始 pH 三因素之间交互效应较大; 回归方程的相关系数 $R^2=99.40\%$, 表明该模型拟和程度良好, 试验设计可靠。

2.4.3 响应面分析: 由图 2、3 可以看出, 温度与时间、时间与初始 pH 交互因子对酶活力存在显著的相关性; 由图 4 看出, 温度与初始 pH 交互影响酶活力不显著。

表 3 $n=12$ 的 Plackett-Burman (PB) 实验设计与响应值表
Table 3 Experimental design and response of Plackett-Burman ($n=12$)

Serial number	(A)	B	(C)	D	(E)	F	(G)	H	(J)	K	(L)	Enzyme activity (U/mL)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	207.20
2	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	192.65
3	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	206.12
4	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	149.05
5	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	158.34
6	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	166.42
7	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	155.82
8	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	163.27
9	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	154.96
10	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	179.28
11	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	160.82
12	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	167.10

表 4 Plackett-Burman 设计的各因素水平及效应评价
Table 4 Factor levels and effect estimates of Plackett-Burman design

Code	Factors (g/L)	Levels		t value	Prob> t	Importance
		-1	+1			
B	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	22	24	-5.78	0.001	1
D	Fermentation time (h)	72	84	-4.20	0.006	2
F	Initial pH	7.5	8.0	-4.00	0.007	3
H	Inoculums (%)	8	10	-1.14	0.298	4
K	Medium volume (per 500 mL)	75	100	-0.44	0.673	5

Note: $R^2=91.96\%$; Adj $R^2=85.25\%$.

表 5 最陡爬坡实验设计及实验结果
Table 5 Experimental design and the results of steepest ascent

Serial number	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Fermentation time (h)	Initial pH	Enzyme activity (U/mL)
1	22	72	7.5	219.87
2	20	66	7.0	220.12
3	18	60	6.5	212.60
4	16	54	6.0	211.55

表 6 $n=15$ 的 Box-Behnken 实验设计与响应值表
Table 6 Experimental design and response of Box-Behnken ($n=15$)

Serial number	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)		Fermentation time (h)		Initial pH		Enzyme activity (U/mL)
	X_1	Code X_1	X_2	Code X_2	X_3	Code X_3	
1	20	0	66	0	7.0	0	219.32
2	20	0	72	1	7.5	1	202.47
3	18	-1	60	-1	7.0	0	200.34
4	20	0	60	-1	6.5	-1	176.90
5	20	0	66	0	7.0	0	220.55
6	18	-1	66	0	6.5	-1	188.98
7	20	0	60	-1	7.5	1	159.66
8	22	1	66	0	6.5	-1	156.92
9	18	-1	66	0	7.5	1	187.97
10	20	0	72	1	6.5	-1	179.41
11	22	1	60	-1	7.0	0	138.37
12	22	1	72	1	7.0	0	198.99
13	20	0	66	0	7.0	0	218.39
14	18	-1	72	1	7.0	0	201.97
15	22	1	66	0	7.5	1	165.28

表 7 回归系数显著性检验

Table 7 Regression coefficients and their significance of the quadratic model

Variable coefficient	Coefficient estimation	Standard error	t value	Prob> t
X_1	-14.963	1.134	-13.190	0.000
X_2	13.446	1.134	11.853	0.000
X_3	1.646	1.134	1.451	0.000
X_1X_1	-19.663	1.670	-11.776	0.206
X_2X_2	-14.840	1.670	-8.887	0.000
X_3X_3	-25.970	1.670	-14.954	0.000
X_1X_2	14.748	1.604	9.193	0.000
X_1X_3	2.343	1.604	1.460	0.204
X_2X_3	10.075	1.604	6.280	0.002

注：软件分析 P 值低于 0.05 的项为酶活显著影响因素。

Note: P values less than 0.05 were considered as indicative of significance on SOD activity.

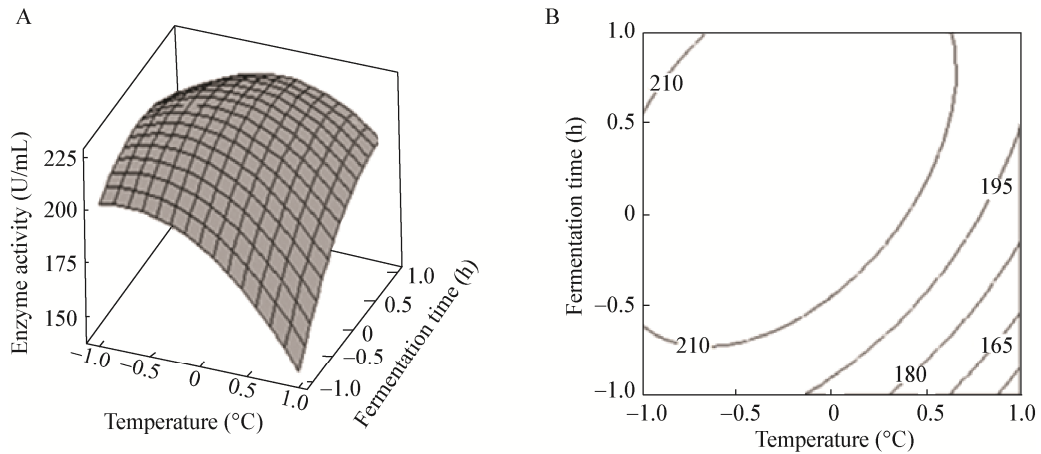


图 2 温度与发酵时间交互影响酶活曲线图(A)与等高线图(B)

Figure 2 The response surface (A) and corresponding contour plot (B) of temperature and fermentation time on the activity of SOD

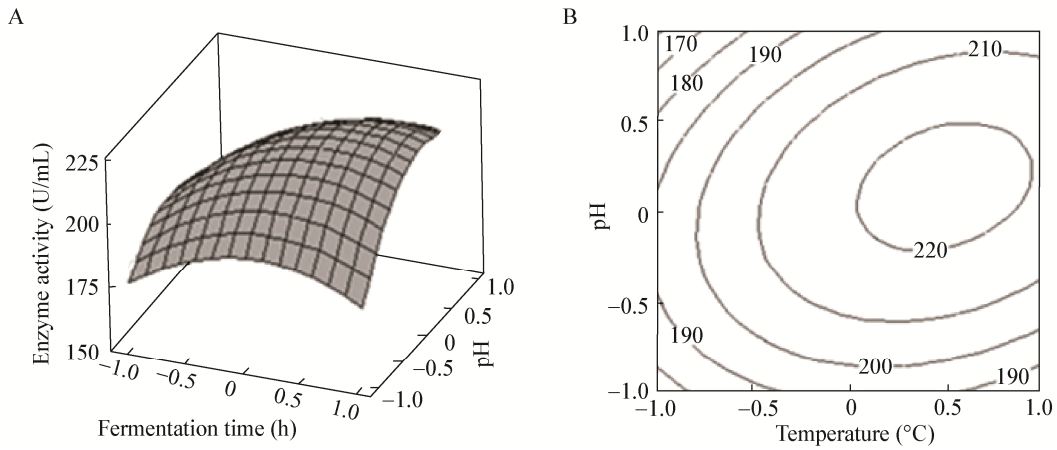


图 3 时间与初始 pH 交互影响酶活曲线图(A)与等高线图(B)

Figure 3 The response surface (A) and corresponding contour plot (B) of fermentation time and initial pH on the activity of SOD

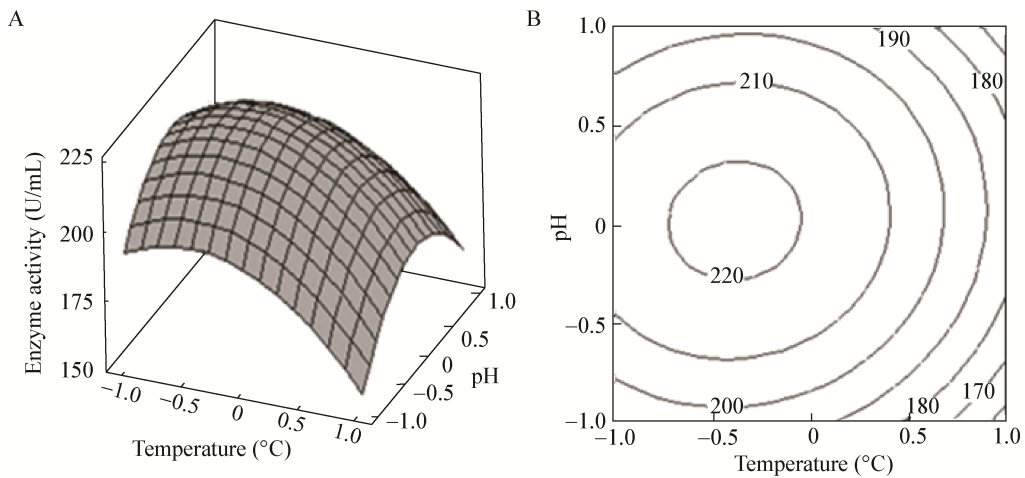


图 4 温度与初始 pH 交互影响酶活曲线图(A)与等高线图(B)

Figure 4 The response surface (A) and corresponding contour plot (B) of temperature and initial pH on the activity of SOD

2.4.4 最优条件的确定与验证: 用 Minitab17 软件预测最大酶活力为 223.74 U/mL, 此时对应的温度、时间、初始 pH 的编码值分别为-0.232 3、0.373 7、0.090 9, 根据编码值与实际值关系, 得到最佳的优化条件为温度 19.5 °C, 时间 68.2 h, pH 7.0。实测 3 次酶活力平均值为 221.87 U/mL, 与理论预测吻合良好。

3 结论

本研究确定 *Lactobacillus plantarum* sp. CLP0279 生产低温 SOD 最佳发酵条件: 温度 20 °C、时间 68 h、初始 pH 7.0、接种量 8%、装液量 75 mL/500 mL, 在此优化发酵条件下酶活力 221.87 U/mL, 是优化前的 1.32 倍。这一结论为 *Lactobacillus plantarum* sp. CLP0279 后期发酵罐放大培养与潜在的产业化提供数据参考。

参考文献

- [1] Retnoningrum DS, Rahayu AP, Mulyanti D, et al. Unique characteristics of recombinant hybrid manganese superoxide dismutase from *Staphylococcus equorum* and *S. saprophyticus*[J]. Protein Journal, 2016, 35(2): 136-144
- [2] Yi JF, Li YM, Liu T, et al. Mn-SOD and CuZn-SOD polymorphisms and interactions with risk factors in gastric cancer[J]. World Journal of Gastroenterology, 2010, 16(37): 4738-4746
- [3] Bafana A, Dutt S, Kumar A, et al. The basic and applied aspects of superoxide dismutase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 68: 129-138
- [4] Duarte T, Cruz IB, Barbisan F, et al. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytics blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism[J]. Pharmacogenomics Journal, 2016. DOI: 10.1038/tpj.2015.91
- [5] Sarkar S, Pramanik A, Mitra A, et al. Bioprocessing data for the production of marine enzymes[J]. Marine Drugs, 2010, 8(4): 1323-1372
- [6] Marx JC, Collins T, D'Amico S, et al. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms[J]. Marine Biotechnology (NY), 2007, 9(3): 293-304
- [7] Zeinali F, Homaei A, Kamrani E. Sources of marine superoxide dismutases: characteristics and applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79: 627-637
- [8] Wang QF, Wang YF, Hou YH, et al. Cloning, expression and biochemical characterization of recombinant superoxide dismutase from Antarctic psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. ANT506[J]. Journal Basic Microbiology, 2015. DOI: 10.1002/jobm.201500444
- [9] Merlino A, Russo Krauss I, Castellano I, et al. Structural and denaturation studies of two mutants of a cold adapted superoxide dismutase point to the importance of electrostatic interactions in protein stability[J]. Biochimica et Biophysica Acta-biomembranes, 2014, 1844(3): 632-640
- [10] Diaz-Rosales P, Chabrilón M, Arijo S, et al. Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*[J]. Journal of Fish Diseases, 2006, 29(6): 355-364
- [11] Zou Y, Yang L, Liu G, et al. Identification of three Superoxide dismutase genes from a *Geobacillus* sp.[J]. The Protein Journal, 2011, 30(1): 66-71
- [12] Ken CF, Hsiung TM, Huang ZX, et al. Characterization of Fe/Mn-superoxide dismutase from diatom *Thalassiosira weissflogii*: cloning, expression, and property[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(5): 1470-1474
- [13] Sun SY, Gong HS, Liu WL, et al. Application and validation of autochthonous *Lactobacillus plantarum* starter cultures for controlled malolactic fermentation and its influence on the aromatic profile of cherry wines[J]. Food Microbiology, 2016, 55: 16-24
- [14] Kwak SH, Cho YM, Noh GM, et al. Cancer preventive potential of kimchi lactic acid bacteria (*Weissella cibaria*, *Lactobacillus plantarum*)[J]. Journal of Cancer Prevention, 2014, 19(4): 253-258
- [15] Yu LL, Zhai QX, Liu XM, et al. *Lactobacillus plantarum* CCFM639 alleviates aluminium toxicity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(4): 1891-1900
- [16] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. European Journal of Biochemistry, 1974, 47(3): 469-474
- [17] Morita RY. Psychrophilic bacteria[J]. Bacteriological Reviews, 1975, 39(2): 144-167
- [18] Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2003, 1(3): 200-208