

高产 SOD 酶乳酸菌和酵母菌的筛选及优化

任秋涵, 余晓斌, Abdulqader AL-Adeeb

(江南大学生物工程学院)

摘要: 超氧化物歧化酶(高产 SOD 酶乳酸菌和酵母菌的筛选及优化高产 SOD 酶乳酸菌和酵母菌的筛选及优化 SOD)是一种重要的内源性抗氧化酶,在抗氧化和美白产品的开发中具有广泛应用潜力。本研究旨在筛选具有高 SOD 酶活性的乳酸菌和酵母菌,并优化其培养条件,提升 SOD 活性,并进行粗酶液酶学性质研究,为开发益生菌来源的美白产品提供新思路。该研究从发酵食品及实验室保藏菌株中筛选出乳酸 37 株和酵母菌 75 株,通过 SOD 活性测定和诱变筛选出乳酸菌 M-6 (*Levilactobacillus brevis*, SOD 活性湿重 658.71U/g)和酵母菌 SC (*Saccharomyces cerevisiae*, SOD 活性湿重 3480.68 U/g)。通过摇瓶实验优化发酵工艺,确定最优培养基配方及发酵条件与金属离子成分,使乳酸菌和酵母菌 SOD 活性分别达到湿重 1273.69U/g 和 5042.31U/g。进一步研究显示,筛选菌株具有良好的稳定性,具有益生菌应用潜力。本研究创新性地将乳酸菌和酵母菌用于高 SOD 活性微生物的筛选与优化培养,并探索其稳定性和最适条件,为未来抗氧化产品开发应用奠定了基础。

关键词: 超氧化物歧化酶; 乳酸菌; 酵母菌; 条件优化; 酶学性质研究

中图分类号: Q81

Screening and Fermentation Optimization of High-Yield SOD-Producing Lactic Acid Bacteria and Yeast

Ren Qiuhan, Yu Xiaobin, A.Q

(Jiangnan University, School of Bioengineering)

Abstract: Superoxide dismutase (SOD) is a crucial endogenous antioxidant enzyme with significant potential in the development of antioxidant and whitening products. This study aimed to screen lactic acid bacteria and yeast strains with high SOD activity, optimize their culture conditions to enhance SOD production, and investigate the enzymatic properties of crude enzyme extracts. The findings provide new insights into developing probiotic-derived whitening products. A total of 37 lactic acid bacteria and 75 yeast strains were isolated from fermented foods and laboratory-preserved strains. Through SOD activity assays and mutagenesis screening, *Levilactobacillus brevis* M-6 (SOD activity: 658.71 U/g wet weight) and *Saccharomyces cerevisiae* SC (SOD activity: 3480.68 U/g wet weight) were identified as the most promising strains. Shake flask experiments were conducted to optimize the fermentation process, including medium composition, fermentation conditions, and metal ion supplementation. As a result, SOD activity was significantly improved, reaching 1273.69 U/g for *L. brevis* M-6 and 5042.31 U/g for *S. cerevisiae* SC. Further analysis demonstrated that the selected strains exhibited excellent stability and potential probiotic applications. This study innovatively applied lactic acid bacteria and yeast in high-SOD-activity microbial screening and optimization, while also exploring their stability and optimal conditions. These findings lay the foundation for future antioxidant product development.

Key words: Superoxide dismutase; Yeast; Lactic Acid Bacteria; Condition Optimization; Enzymatic Properties Study

作者简介: 任秋涵 2000-, 女, 微生物发酵

通信联系人: 余晓斌 (1965-), 男, 教授, 博导, 微生物发酵技术、酶技术研究开发大健康产品, 人工智能技术辅助酶理性设计和改造, 挖掘开发新功能天然健康因子, 致力于保健食品普通食品化创新性研究. E-mail: xbyu@jiangnan.edu.cn

45 0 引言

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 是一种重要的抗氧化酶, 能够催化超氧阴离子的歧化反应生成分子氧和过氧化氢, 从而在清除氧自由基、保护细胞正常代谢方面发挥关键作用^[1]。作为抗氧化防御体系的核心, SOD 广泛存在于动植物和微生物中, 对维持细胞的氧化还原平衡具有重要意义^[2]。在正常生理条件下, 细胞内的活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 通过抗氧化酶系统被迅速清除。然而, 当 ROS 的产生超过机体清除能力时, 会引发氧化应激, 造成脂质过氧化、蛋白质损伤以及 DNA 突变, 进而诱发炎症、衰老和多种慢性疾病^[3]。SOD 在医学、食品和化妆品领域的广泛应用得益于其强大的抗氧化作用^[4]。在医学领域, SOD 已被开发为新型抗炎药物和抗氧化剂, 用于治疗包括糖尿病、心血管疾病、老年性白内障等多种由氧化应激引发的疾病。此外, SOD 还被用作辐射防护剂, 减少放疗带来的副作用, 并有望应用于移植手术中缓解免疫排斥反应。在食品工业中, SOD 作为一种功能性添加剂被应用于延长食品保质期和增强营养功能。例如, 在保健食品中添加 SOD 能够提升人体的抗氧化能力, 改善健康状况。化妆品行业同样重视 SOD 的独特功效, 利用其抗氧化和抗衰老能力开发出防晒霜、美白精华以及抗皱面膜等护肤产品, 为消费者提供有效的皮肤抗氧化保护^[5]。

60 尽管 SOD 的应用潜力巨大, 但传统生产方式存在诸多挑战^[6]。目前, 大多数商品化 SOD 主要通过从动物血液、器官或植物中提取获得。这种方法不仅生产成本低, 而且易受原料供应和季节波动的限制。此外, 动物来源的 SOD 还可能引发伦理问题和安全隐患^[7]。相比之下, 利用微生物发酵法生产 SOD 具有显著优势。包括大肠杆菌、乳酸菌和酵母在内的多种微生物已被描述为具有 SOD 生产潜力^[8]。乳酸菌和酵母菌衍生的 SOD 等益生菌因其绿色安全的特性可直接添加到化妆品、食品或膳食补充剂中。微生物发酵不仅克服了传统方法的局限性, 还具有生产成本低、稳定性高和易于规模化等特点, 为 SOD 的工业化生产提供了切实可行的解决方案^[9]。筛选高产 SOD 的益生菌菌株并制定相应的强化措施也迫在眉睫^[10]。

70 本研究通过对乳酸菌和酵母菌的筛选与优化, 探索提高 SOD 产量的方法, 以期为 SOD 在食品、化妆品等领域的应用提供技术支持, 为绿色、经济、高效的 SOD 生产模式提供新思路。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与amp;材料

1.1.1 实验材料

菌种来源: 水果、酒曲、泡菜等传统发酵食品以及实验室保藏的益生菌菌株。

1.1.2 仪器与amp;设备

75 冷冻离心机: Thermo Fisher Scientific 公司; 超声破碎仪: 浙江新芝生物有限公司; 多功能酶标仪: Biotek 公司; 电热恒温培养箱: 上海跃进医疗器材厂; 电热恒温水浴锅: 江苏翔天实验仪器; 台式离心机: 上海安亭科学仪器厂。

1.1.3 培养基配方

80 乳酸菌发酵培养基：葡萄糖 2.0%，酵母膏 0.5%，蛋白胨 1.0%，牛肉膏 1.0%，
K₂HPO₄ 0.2%，乙酸钠 0.5%，柠檬酸铵 0.2%，MgSO₄ 0.05%，MnSO₄ 0.025%，吐温 80
0.1%，固体培养基另加琼脂 5%

酵母菌发酵培养基：称取酵母粉 1.0%，胰蛋白胨 2.0%，葡萄糖 2.0%，固体培养基另
加琼脂 5%

85 1.2 高产 SOD 乳酸菌和酵母菌的筛选

1.2.1 菌种的初筛

将水果、酒曲、泡菜等食品用生理盐水稀释至不同浓度后涂布于含有 CaCO₃ 的 PDA
和 MRS 固体培养基中^[11,12]，37℃培养 48h，纯化后进行保藏。活化实验室保藏和分离纯化
获得的菌株，挑取单菌落接种于液体培养基中，摇瓶培养后，取种子液接种发酵培养基，在
90 相同条件下继续摇瓶发酵 24h。发酵后得到活细胞与上清液的混合物。将发酵液于 4℃、
6000 r/min 离心 15 min，得到发酵上清液和活细胞。用无菌水清洗 2 次，4℃、5000
r/min 离心 15 min，去上清留沉淀细胞，用 pH 7.8 磷酸缓冲液 (PBS) 稀释，于 400 W 超
声波、冰浴下破碎 15 min (破碎 2s 间隔 3s) 后，6 000 r/min 离心 20 min，收集上清为无
细胞提取物即为粗酶液。采用南京建成超氧化物歧化酶测定试剂盒 (WST-1 法)，分别测
95 定各菌株发酵上清液、活细胞、无细胞提取物及活细胞与上清液混合物的 SOD 活性，单位
为 U/g 湿菌体。SOD 活力单位定义为在本反应体系中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的酶量
为一个 SOD 活力单位 (U)。活力计算公式如下 (1) (2)。

$$\text{SOD 抑制率(\%)} = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{测定空白}})}{(A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}})} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{SOD 活力(U/g 湿菌体)} = \text{SOD 抑制率} \div 50\% \times \frac{\text{反应体系}}{\text{稀释倍数}} \left(\frac{0.24\text{ml}}{0.02\text{ml}} \right) \times \text{测试前稀释倍数} \div \frac{\text{组织称重(g)}}{\text{所加匀浆缓冲液(ml)}} \quad (2)$$

100 1.2.2 菌种的复筛

将初筛中表现良好的菌株进行能量分别为 500、1000、3000 的低能氮离子注入诱变，
后从中挑取单菌落并再次进行 SOD 活性测试，选取活性高的菌株进行传代培养^[13]。

1.2.3 菌种的鉴定

105 将菌株划线至固体平板，培养 24 h，观察菌落的形态、表面光滑度和隆起情况等，并进
行革兰氏染色，用光学显微镜在 100 倍油镜下观察。利用通用引物对提取到的菌株脱氧核
糖核酸 (Deoxyribonucleic acid, DNA) 进行 16S rDNA 扩增，将 PCR 产物送至上海生工测
序。其后利用 NCBI 数据库完成序列相似性 BLAST 比较分析，并运用 MEGA 11 软件
构建系统发育进化树。

1.2.4 SOD 种类鉴定

110 1 mM 的二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DDC) 可以作为 Cu-ZnSOD 的抑制剂^[4]，可以用

来区分 Cu-Zn SOD 和 Fe 或 Mn-SOD, 在检测 SOD 活性之前, 在室温下向菌液中加入 1 mM 的二乙基二硫代氨基甲酸钠, 反应 15min 后与原始菌液的 SOD 活性进行比较。

1.3 发酵工艺的优化

115 乳酸菌发酵条件采用以下方式: 挑取乳酸菌单菌落接种于 50mL 的 MRS 培养基, 37 °C、200 r/min 摇床中振荡培养 12 h, 按 2% (体积分数) 接种量转接至发酵培养基, 37°C、200 r/min 条件下发酵 24 h。酵母菌发酵条件采用以下方式: 挑取酵母菌单菌落接种于 50mL 的 YPD 培养基, 30 °C、200 r/min 摇床中振荡培养 12 h, 按 2% (体积分数) 接种量转接至发酵培养基, 30°C、200 r/min 条件下发酵 24 h, 其中 250 mL 三角瓶装液量为 50 mL。针对发酵过程中的外界环境因素、培养基营养条件和金属离子进行单因素优化。

120 1.3.1 发酵培养基优化

逐一优化培养基中的组成成分包括碳源、氮源和碳氮比, 考察了不同碳源(空白、葡萄糖、乳糖、果糖、蔗糖、淀粉、麦芽糖和糖蜜)、不同氮源(胰蛋白胨、酵母粉、牛肉膏和硫酸铵的培养基)以及选取最优碳源和氮源的培养基碳氮比(3: 1、2: 1、1: 1、1: 2、1: 3)对菌株生长和发酵产 SOD 的影响。

125 1.3.2 发酵条件优化

在最优发酵培养基的基础上, 针对 SOD 发酵的外界环境因素包括发酵温度、培养基初试 pH 值和接种量逐一优化, 分别在发酵温度 (20°C、25°C、30°C、37°C、42°C)、发酵时间 (12 h、24 h、36 h、48 h、60 h)、培养基初始 pH (5、5.5、6、6.5、7、7.5) 和接种量 (1%、2%、3%、4%、5%) 条件下进行发酵, 发酵 24h 后测定 SOD 活性及 OD 值。

130 1.3.3 金属离子优化

基于最优发酵条件和最优发酵培养基, 进一步探究发酵培养基中添加不同的金属离子 (浓度为 0-2 mmol / L 的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+}) 对菌株生长和发酵产 SOD 的影响。

1.4 粗酶液酶学性质研究

1.4.1 探究 pH 值及其稳定性对酶活的影响

135 用 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 配制 pH 值为 2、3、4、5 的缓冲液; 用 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 配制 pH 值为 5、6、7、8 的缓冲液; 用 Tris-HCl 配制 pH 值为 8、9、10 的缓冲液。分别加入酶反应中测定酶活, 以考察 pH 值对脂肪酶活性的影响。并将酶液与各 pH 缓冲液混合, 放置 120min 后测定酶活, 以研究其 pH 值稳定性。

1.4.2 探究温度对酶活影响及酶的热稳定性

140 取适量酶液分别在 0°C、4°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C 条件下进行酶反应, 15 min 后立即终止反应并测定酶活力。将酶液在最适反应 pH 条件下置于 20~70°C 下保温 2 h, 每 20 min 测定一次, 考察该酶的热稳定性。

2 结果与分析

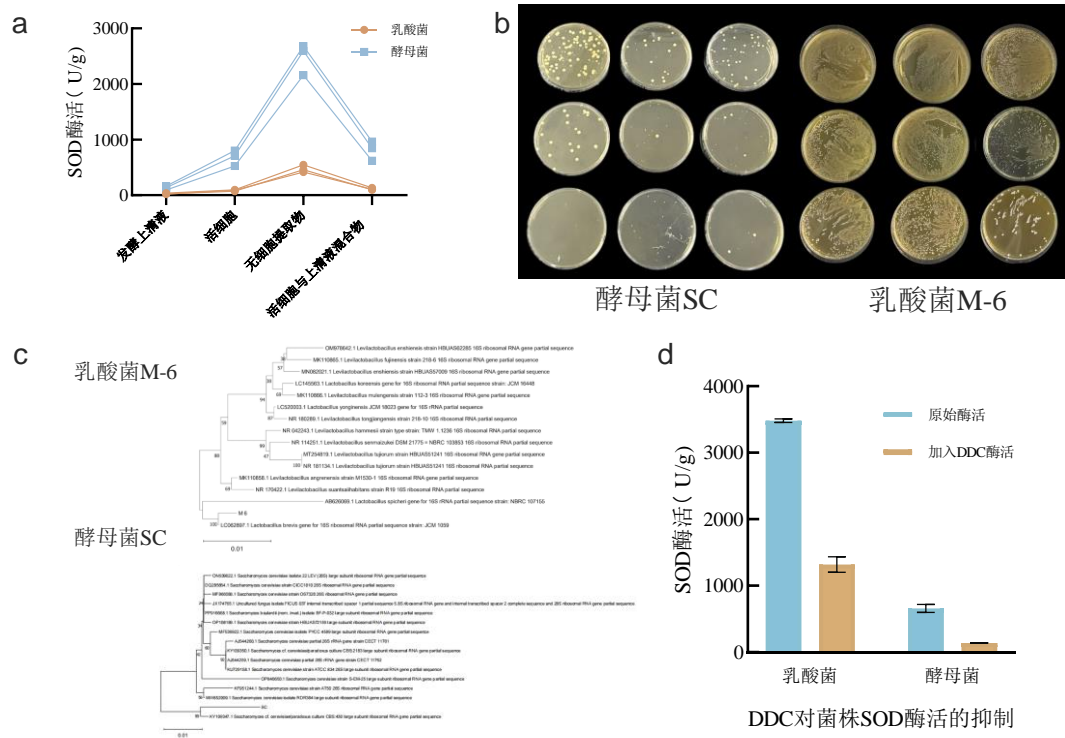
2.1 菌株的筛选及鉴定

145 经过分离纯化和筛选实验室保藏菌株，初步获得 37 株乳酸菌和 75 株酵母菌。对这些菌株的每种细胞组分的 SOD 活性如图 1-a 所示的分析发现，乳酸菌和酵母菌在无细胞提取物中的 SOD 活性都比发酵上清液、活细胞及活细胞与上清液混合物的 SOD 活性高得多，而发酵上清液、活细胞、活细胞与上清混合物的组分也显示出低 SOD 活性，无细胞提取物 SOD 活性大概是发酵上清液的 20 倍左右，是活细胞与上清混合物的 3-4 倍左右，最终选择测定菌株无细胞提取物 SOD 活性作为菌株 SOD 酶活。经过初筛，得到乳酸菌 M-6 SOD 酶活性为 547.62 U/g（以下均为湿重），酵母菌 SC SOD 酶活性为 2683.49 U/g，拥有较高的 SOD 活性，通过低能氮离子注入诱变技术，从如图 1-b 所示平板中挑选出 21 株酵母菌菌株与 24 株乳酸菌菌株进行纯化和 SOD 活性测试筛选，最终确定乳酸菌 M-6-1000j（以下简称 M-6）和酵母菌 SC-3000k（以下简称 SC）为高产 SOD 菌株。经测定，乳酸菌 M-6 的 SOD 活性达到 658.71 U/g，比诱变前菌株原始 SOD 酶活提高 20.29%；酵母菌 SC 的 SOD 活性达到 3480.68 U/g，比诱变前菌株原始 SOD 酶活提高 29.71%，并可以稳定传代。分子生物学鉴定如图 1-c 所示，结果表明，乳酸菌 M-6 为 *Levilactobacillus brevis*，同源率为 99.8%；酵母菌 SC 为 *Saccharomyces cerevisiae*，同源率为 99.36%。根据二乙基二硫代氨基甲酸钠（DDC）对 Cu/Zn SOD 活性的抑制率如图 1-d 所示，两株菌的 SOD 活性抑制率分别达到 75%，判断这两株菌主要生产的 SOD 类型为 Cu/Zn-SOD。

150

155

160



a-各细胞组分 SOD 酶活比较； b-通过低能氮离子注入诱变后的酵母菌 EC 及乳酸菌 M-6 平板；

c-乳酸菌及酵母菌系统发育进化树; d-DDC 对菌株 SOD 活性的抑制率

图 1 高产 SOD 乳酸菌与酵母菌的筛选与鉴定

165

Fig.1 Screening and identification of High-Yield SOD-Producing Lactic Acid Bacteria and Yeast

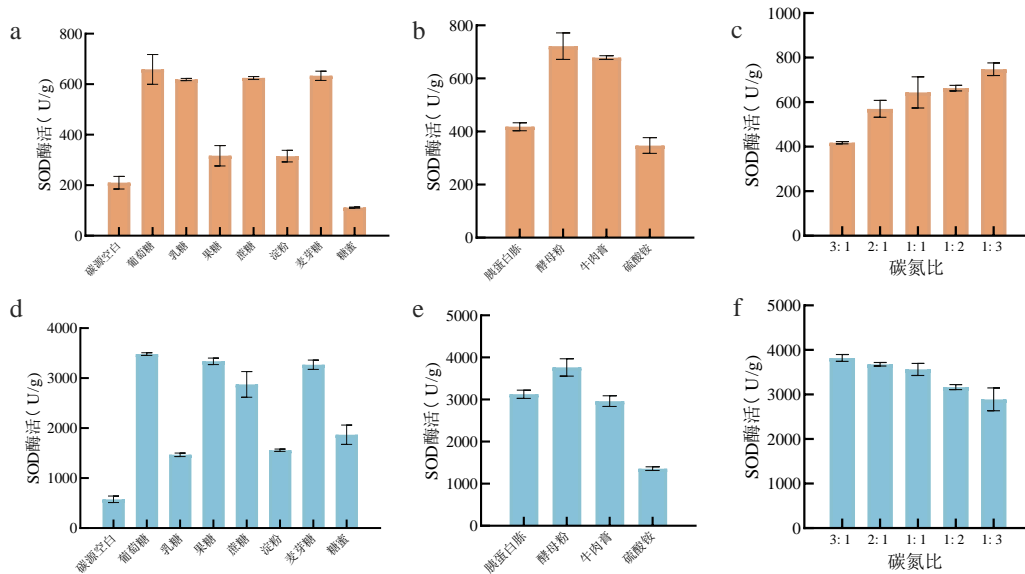
2.2 发酵工艺优化

2.2.1 发酵培养基优化

170

试验筛选获得了两株高产 SOD 菌株,针对其发酵培养基的组成成分(包括碳源、氮源、无机盐和碳氮比)进行优化。优化结果如图 2 所示,可以看出不同的碳源对酵母菌和乳酸菌 SOD 酶活均有显著影响,都表现出以葡萄糖作为唯一碳源时 SOD 酶活性最高,这可能是由于葡萄糖易于分解和吸收,有利于微生物的生长代谢和 SOD 的产生。乳酸菌对乳糖、蔗糖、麦芽糖利用能力相当,酵母菌则对果糖、蔗糖、麦芽糖利用能力相当。乳酸菌和酵母菌最优氮源皆为酵母粉,乳酸菌 SOD 酶活达到 751.8 U/g,酵母菌 SOD 酶活达到 3762.9 U/g,明显高于其他 5 种氮源(图 2-b、图 2-e)。随着碳氮比的降低,乳酸菌 SOD 酶活逐渐提高,在碳氮比为 1: 3 时最高酶活达到 749.7 U/g,相反,随着碳氮比的降低,酵母菌 SOD 酶活逐渐降低,最高酶活为碳氮比 3: 1 是达到 3820.54 U/g。

175



a-乳酸菌碳源优化;b-乳酸菌氮源优化;c-乳酸菌碳氮比优化;
d-酵母菌碳源优化;e-酵母菌氮源优化;f-酵母菌碳氮比优化;

180

图 2 发酵培养基优化结果

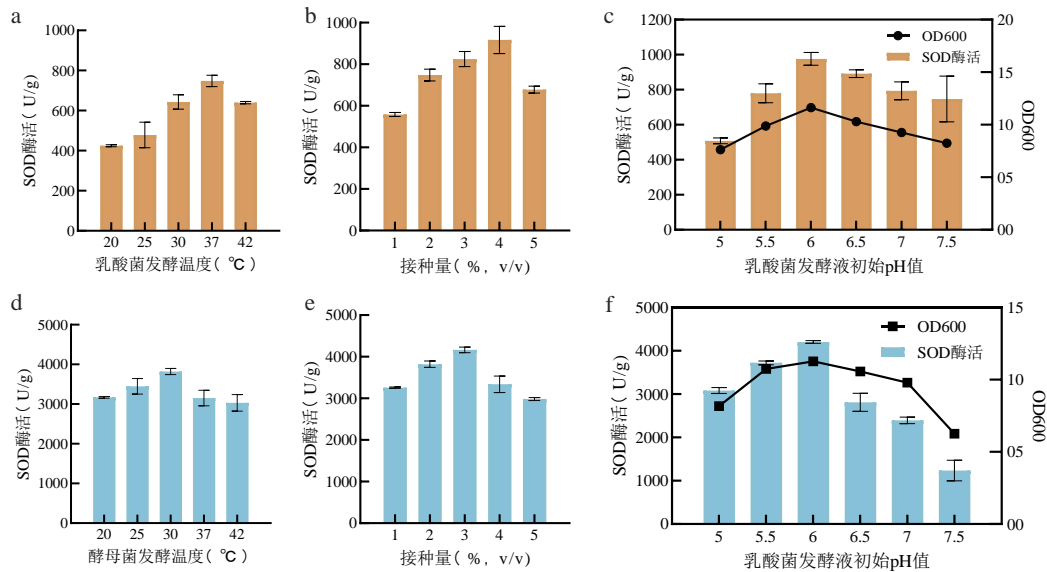
Fig.2 Optimization results of fermentation medium

2.2.2 发酵条件优化

185

基于发酵培养基优化结果,进一步针对发酵条件包括发酵温度、发酵时间、发酵液初始 pH 值以及接种量逐一进行优化。乳酸菌发酵温度优化结果如图 3-a 所示,酵母菌发酵温度优化结果如图 3-d 所示,结果表明, M-6 和 SC 的最适生长温度分别为 37°C 和 30°C,这与

大量报道一致^[15]。高于或低于最适温度都会导致微生物生长和酶合成的减慢。发酵液初始 pH 6.0 最有利于乳酸菌 M-6 生长产生 SOD 酶, 酶活最高达到 975.86 U/g, 发酵液初始 pH 6.0 最有利于酵母菌 SC 生长产生 SOD 酶, SOD 酶活性达 4202.74 U/g(图 3-e); 明显高于其他酸碱度条件, 且菌株生长趋势和 SOD 活性一致。乳酸菌接种量优化结果如图 3-c 所示, 当接种量达到 4%时, SOD 活性达到最高, 达到 916.87 U/g; 酵母菌接种量优化结果如图 3-f 所示, 当接种量达到 3%时, SOD 活性达到最高, 为 4163.64 U/g。根据实验得出, 发酵时间对 SOD 酶活无显著影响。

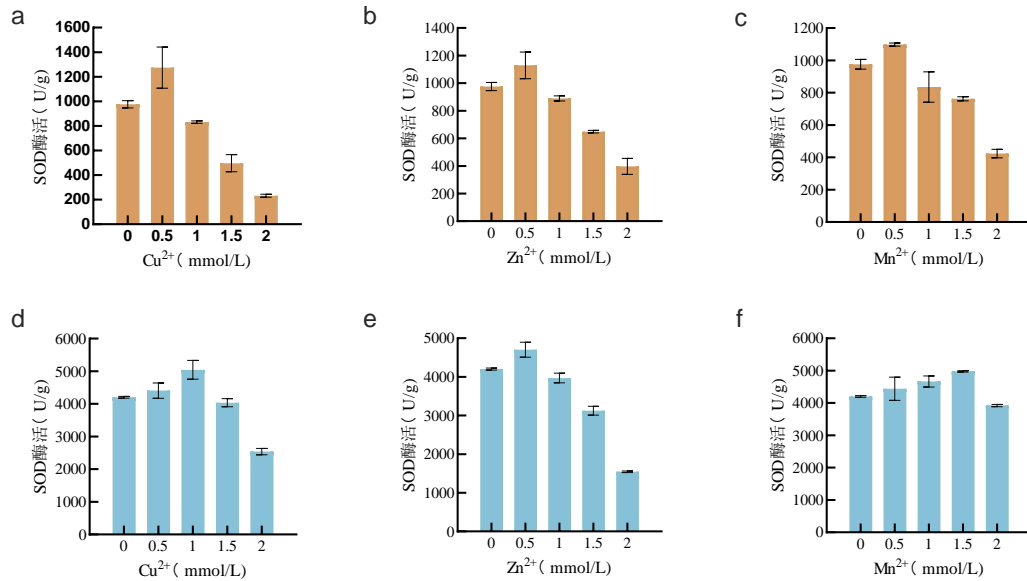


195 a-乳酸菌发酵温度优化;b-乳酸菌发酵培养基初始 pH 值优化;c-乳酸菌培养基装液量优化
d-酵母菌发酵温度优化;e-酵母菌发酵培养基初始 pH 值优化;f-酵母菌培养基装液量优化;
图 3 发酵条件优化结果

Fig.3 Optimization results of fermentation condition

2.2.3 金属离子优化

200 金属离子可以通过诱导细胞内 ROS 的产生而增强微生物产生 SOD 的能力。此外, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 离子都是 SOD 的金属辅基, 通过与金属离子结合位点结合而影响 SOD 的活性^[16]。因此, 研究了金属离子对菌株生长和 SOD 活性的影响。如图 4 所示 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 对菌株的 SOD 活性均有较大影响, 其中乳酸菌 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度为 0.5 mmol/L 时 SOD 活性最高, 在 Cu^{2+} 浓度为 0.5 mmol/L 时达到最高 SOD 活性 1273.69 U/g。
205 酵母菌 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度分别为 1、0.5 和 1.5 mmol/L 时 SOD 活性最高, 在 Cu^{2+} 浓度为 1 mmol/L 时达到最高 SOD 酶活性 5042.31 U/g。金属离子处理后的菌株的 SOD 活性均呈现先升高后降低的趋势, 这可能是因为低浓度的金属离子不能诱导细胞产生过多的 ROS, 而高浓度的金属离子会由于金属毒性导致细胞死亡。而乳酸菌和酵母菌均在 Cu^{2+} 条件作用下达到最高 SOD 酶活, 这可能与其 SOD 种类皆为 Cu/Zn SOD 相关。



乳酸菌铜离子优化;b-乳酸菌锌离子优化; c-乳酸菌锰离子优化;
d-酵母菌铜离子优化;e-酵母菌锌离子优化; f-酵母菌锰离子优化;

图4 金属离子对菌株发酵产 SOD 的影响

Fig.4 Effect of metal ions for SOD production by Lactic Acid Bacteria and Yeast

210

215

2.3 粗酶液酶学性质研究

2.3.1 最适反应温度和最适反应 pH

将 SOD 分别置于 pH 值 2~10 的缓冲液中反应，结果如图 5 所示。其中，乳酸菌 SOD 粗酶液最适反应 pH 为 7.0，当 pH 值小于 7.0 时，酶活力上升速度快。酵母菌 SOD 粗酶液最适反应 pH 为 8.0，当酵母菌 pH 值小于 8 时，酶活力随着 pH 升高而增加，当 pH 大于 5.0 后，活力上升平缓。当 pH 大于 8 时，酶活力则随着 pH 的升高而缓慢下降，说明 SOD 粗酶液在碱性条件下活力较高。在最适 pH 条件下，分别将酶液置于 0~60 °C 条件下反应，测定 SOD 活力。图 5-c 显示，乳酸菌和酵母菌在 30°C 时相对酶活均高于对照组，而乳酸菌在 37°C 时相对酶活达到最高值，酵母菌在 30°C 时为最适反应温度。当低于最适反应温度时，SOD 活力随着温度的升高而缓慢增加，温度超过最适反应温度后酶活随着温度的上升而迅速下降，当反应温度 达到 60°C 时，乳酸菌 SOD 活力仅剩 38.46%，酵母菌 SOD 活力仅剩 28.83%。

220

225

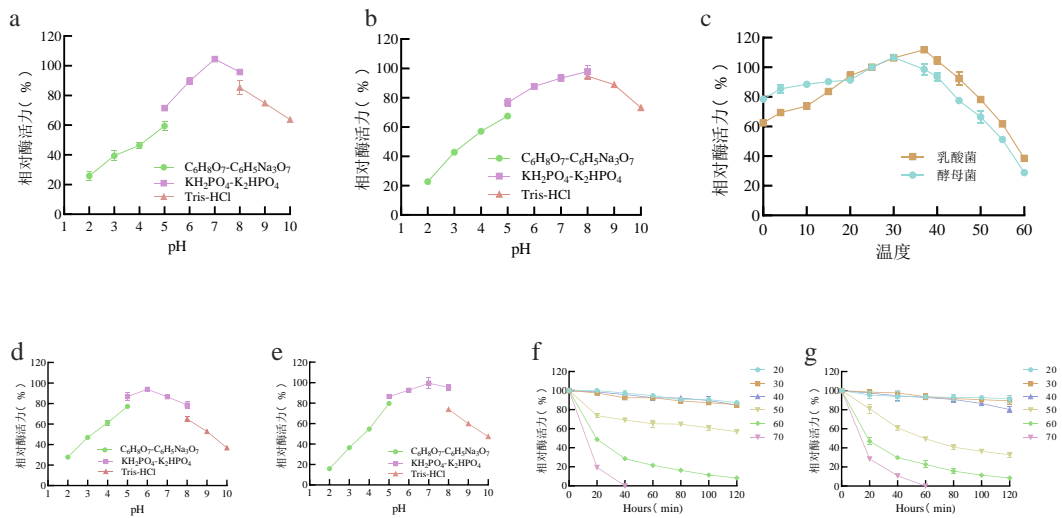
2.3.2 pH 稳定性和热稳定性实验

将酶液置于不同 pH 缓冲液中，放置 120 min，并在最适 pH、最适温度条件下测定 SOD 活力，结果如图 5 所示。乳酸菌和酵母菌皆在 pH 5~8 范围 SOD 较稳定，保温 2 h 后仍残留 70%左右的酶活力。SOD 在酸性环境的耐受性小于碱性环境，这主要是因为 SOD 在酸性环境中金属离子脱落并引起结构改变造成的^[17]。将酶液置于 20-70 °C 温度下分别保温 120 min，测定 SOD 活力，结果如图 5-f、5-g 所示，在 20-40°C 条件下，酶活基

230

本不变, 维持在 90%左右, 而在高温条件下, SOD 酶活不稳定, 失活速度随着温度上升而提高。

235



a-乳酸菌 pH 对 SOD 活力影响;b-酵母菌 pH 对 SOD 活力影响;c-乳酸菌和酵母菌温度对 SOD 活力影响;
d-乳酸菌 SOD 的 pH 稳定性;e-酵母菌 SOD 的 pH 稳定性; f-乳酸菌 SOD 的温度稳定性 g-酵母菌 SOD 的温
度稳定性

240

图 5 粗酶液酶学性质研究
Fig. 5 Enzymatic Properties Study

3 结论

245

本研究从发酵食品和实验室菌株中筛选出两株高 SOD 酶活性的益生菌株, 短乳杆菌 M-6 和酿酒酵母 SC, 并通过诱变获得了酶活性更高的稳定突变体, SOD 酶活分别为 658.71 ± 59.28 U/g 和 3480.68 ± 27.32 U/g。经鉴定, 两株菌主要生产的 SOD 类型均为 Cu/Zn SOD。国内外研究中较少报道短乳杆菌的高 SOD 活性, 本研究丰富了高产 SOD 菌株的多样性。杨明琰^[18]等人通过复合诱变酵母, 获得一株酿酒酵母 CNU49, SOD 活性为 1872U/g 湿菌体, 本研究酿酒酵母 SC 通过优化后的 SOD 活性远高于 CNU49。

250

255

以 SOD 酶活为指标的培养基优化显示, 两株菌的最佳碳源均为葡萄糖, 最佳氮源为酵母粉, 其中乳酸菌 M-6 的最佳碳氮比为 1:3, 酵母菌 SC 为 3:1。发酵条件优化表明, 乳酸菌 M-6 的最优发酵条件为 37℃、接种量 4%、发酵液初始 pH 6.0; 酵母菌 SC 的最优发酵条件为 30℃、接种量 2%、发酵液初始 pH 6.0。此外, Cu^{2+} 的添加显著提高了 SOD 活性, 乳酸菌 M-6 的最佳 Cu^{2+} 浓度为 0.5 mmol/L, 酵母菌 SC 为 1 mmol/L。最后, 根据单因素优化结果, 在最优条件下, 乳酸菌 M-6 最高酶活可达到 1273.69 U/g, 酵母菌 EC 最高酶活可达到 5042.31 U/g。Qiqi Wang^[16]等人在研究乳酸菌和酵母菌混合发酵 SOD 时, 发现添加在混合体系中添加 0.2mmol/L 的 Cu^{2+} 可以提高 SOD 酶活性, 本研究根据不同菌株, 确定了更高的 Cu^{2+} 浓度, 显著提高了 SOD 活性。

260

酶学性质研究表明, 乳酸菌 M-6 的最适反应条件为 pH 7.0、温度 37℃, 酵母菌 SC 为 pH 8.0、温度 30℃。SOD 酶在 pH 5-8、20-40℃ 范围内表现出良好的稳定性。时桂芹^[1]等综述了微生物发酵提高 SOD 产率的研究进展, 但对酶学性质的具体数据报道较少, 本研究补

充了短乳杆菌和酿酒酵母产 SOD 的最适反应条件和稳定性数据, 为后续益生菌在抗氧化和美白产品的生产应用提供帮助和基础。

265

[参考文献] (References)

<点击这里添加参考文献>

- [1] 时桂芹, 周文珊, 任菲. 微生物发酵提高 SOD 产率的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37 (04): 115-124.
- 270 [2] Khan, Z.A.; Mishra, C.; Jyotiranjana, T. In silico analysis of caprine superoxide dismutase1(SOD1) gene [J]. Genomics 2020, 12:212–217.
- [3] 张秋月, 黎谢飞, 曾小群, 吴振, 蔡振东, 郭宇星, 潘道东. 产超氧化物歧化酶乳酸菌的筛选及发酵条件优化 [J]. 中国食品学报, 2021, 21 (10): 143-150.
- 275 [4] Bafana, A., S. Dutt, S. Kumar, and P. S. Ahuja. Superoxide dismutase: An industrial perspective[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2011, 31 (1):65–76.
- [5] 韦灵珍, 王佳, 孙新晓, 等. 黄酮类化合物生物合成及其在化妆品中应用的研究[J]. 合成生物学, 2024: 1.
- [6] Altobelli G G, Van Noorden S, Balato A, et al. Copper/zinc superoxide dismutase in human skin: Current knowledge[J]. Frontiers in Medicine, 2020, 7: 537401.
- 280 [7] Zeinali, F.; Homaei, A.; Kamrani, E. Sources of marine superoxide dismutases: Characteristics and applications [J]. Int. J. Biol. Macromol, 2015, 79:627–637.
- [8] 邢德明, 李新华, 袁慎亮, 等. 产 SOD 乳酸菌 SD06S 菌株培养基条件的优化 [J]. 食品工业, 2014, 35 (05): 43-47.
- 285 [9] 赵佳, 赵飞燕, 沈馨, 等. 乳酸菌抗氧化活性及其应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2023, 39(11): 182-190.
- [10] Pinmanee P, Sompinit K, Arnthong J, Suwannarangsee S, Jantimaporn A, Khongkow M, Nimchua T, Sukyai P. Enhancing the Productivity and Stability of Superoxide Dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* TBRC657 and Its Application as a Free Radical Scavenger[J]. Fermentation. 2022; 8(4):169.
- 290 [11] 周笑犁, 王艳丽, 吴承木, 等. 果蔬发酵液中 3 株乳杆菌的体外功能特性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 119-126.
- [12] Sun Y, Zhang S, Li H, et al. Assessments of probiotic potentials of *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional fermented food: Phenotypic and genomic analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 895132.
- 295 [13] Himani A, Robin J, Mahesh G. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 365-372.
- [14] Brennan, R.E., Kiss, K., Baalman, R., Samuel, J.E. Cloning, expression, and characterization of a *Coxiella burnetii* Cu/Zn Superoxide dismutase[J]. BMC Microbiology, 2015, 15(1):99.

- [15] 许鑫琦, 吕橄, 李仁宽, 叶秀云, 林娟. 重组梅花鹿来源 Cu/Zn-SOD 的分离纯化及酶学性质[J]. 中国食品学报, 2018, 18 (05): 137-143.
- 300 [16] Qiqi Wang, Yuting Lai, Han Zhang, Jianpeng Li, Qilu Zeng, Zhengyong Pan, Han Wu, Minghui Wu, Zhongping Qiu, Enhancement of superoxide dismutase activity using mixed *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces cerevisiae* cultures in simulated gastrointestinal conditions with encapsulation, *Biochemical Engineering Journal*, 2023, 109037: ISSN 1369-703X.
- 305 [17] YANG Fangyao, JIAN Tiantian, JIANG Lixiang, ZHANG Yu, HUANG Xinhe. Expression, purification and characterization of human superoxide dismutase 1 and its mutants[J]. *Journal of Biology*, 2023, 40(2): 20-.
- [18] 杨明琰. 酿酒酵母 CNU94 发酵生产超氧化物歧化酶 (SOD) 的研究[D]. 西北大学, 2005.