

超氧化物歧化酶、丙二醛、脯氨酸作为裂殖壶菌菌种性能评价的新指标

张丽, 任路静, 胡元维, 瞿亮, 黄和*

南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 210009

摘要: 【目的】对不同 *Schizochytrium* sp. HX-308 种子期超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和脯氨酸(Pro)进行测定,旨在寻找出一种评价菌种质量优劣的新方法。【方法】选用 *Schizochytrium* sp. HX-308 中的1株驯化高产菌株和1株原始菌株在正常条件下活化,以及同一原始菌株分别在正常条件和恶劣条件下活化的2组实验,分别通过WST-4法、巴比妥酸比色法和比色法测定SOD、MDA和Pro含量,探讨不同菌株中这3个指标与裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. HX-308 最终发酵性能之间的关系。【结果】发酵性能最佳的驯化菌株整个种子期的SOD、MDA和Pro含量都最低,平均仅为0.025 U/g、26.20 mmol/g·Fw和0.098 mg/g·Fw,而发酵性能最差的恶劣条件下菌株的SOD已达到了它的6倍以上,MDA和Pro也达到了2倍以上。【结论】本研究最终证实,这3个指标与菌株的发酵性能呈负相关关系,可以作为评价裂殖壶菌菌株发酵性能优劣的新指标,为菌株选育的优化提供了指导。

关键词: 裂殖壶菌, 超氧化物歧化酶, 丙二醛, 脯氨酸, 评价指标

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)02-0136-09

二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)是重要的 ω -3多不饱和脂肪酸,研究表明DHA在婴幼儿神经系统的正常发育、抗心血管疾病和抗癌症等方面起着重要作用^[1-2]。目前,利用海洋微生物发酵制备DHA已成为研究热点^[3]。裂殖壶菌 *Schizochytrium* 是一类低等海洋真菌,以其高生长速率和高效的产油效率等特点被认为是发酵生产DHA的理想菌种^[4]。

以往的研究主要集中在如何提高菌株的产DHA能力^[5-6],其中对优良菌株的筛选也主要是通过最终发酵结果来评判,这种方法对菌株生产能力

的评价指标较单一,周期也较长,若进行大规模筛选,工作烦琐,劳动强度大。因此,寻求一种快速、简便的评价菌株生产性能优劣的方法很有必要。

本研究主要从终产物DHA出发考虑,由于产物DHA是一种极易被氧化的多不饱和脂肪酸^[7],其氧化产物为MDA,胞内MDA含量越低,说明DHA被氧化损失的也越少。而在胞内起主要氧化剂的是 $\cdot\text{O}_2^-$ ^[8],SOD作为生物体内天然的 $\cdot\text{O}_2^-$ 清除剂,不仅能提高菌株的抗衰老能力,更重要的是能减轻甚至阻断脂质过氧化作用,从而使不饱和脂肪酸的损失降低。Pro作为外界环境胁迫的相容性溶质,通常

基金项目: 国家科技支撑计划(2011BAD23B03); 国家重点基础研究发展计划(2011CB200906); 国家高技术研究发展计划(SS2012AA021704); 江苏省自然科学基金(BK2012424)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-83172094; E-mail: biotech@njut.edu.cn

作者简介: 张丽(1988-),女,江苏常州人,硕士研究生,研究方向为微生物学。E-mail: lizhang.0402@163.com

收稿日期: 2012-08-29; **修回日期:** 2012-11-21

可以作为一种渗透调节剂或细胞质酶的保护性物质^[9],也可根据其含量的变化来了解菌体的生长情况。因此,本文主要从 SOD、MDA、Pro 三个角度出发,探讨三者与常规发酵指标的相关性,从而为评价菌株生产能力提供一种新的方式。

1 材料和方法

1.1 菌种

裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.) HX-308(CCTCC M209059)原始菌株,裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.) HX-308 驯化菌株(该驯化菌株是通过将原始菌株不断地进行培养条件驯化,从而筛选得到性状最佳的菌株,与原始菌株相比,其产量普遍提高了 30% 左右)。

1.2 主要仪器和试剂

3K15 型 Sigma 高速冷冻离心机(Sigma), Spectra Max M3 多功能酶标仪(美国分子仪器公司),752S 型紫外可见分光光度计(上海凌光技术有限公司),岛津 2010 气相色谱仪(日本岛津公司)。总 SOD 活性检测试剂盒(南京奥青生物技术有限公司),硫代巴比妥酸、茛三酮、3,5-二磺基水杨酸(南京晚晴化玻仪器有限公司),冰醋酸、甲苯、无水乙醇、正己烷(分析纯,南京晚晴化玻仪器有限公司)。

1.3 培养基

种子培养基、发酵培养基参照文献^[10]。

1.4 实验设计

种子活化:设定 2 组活化方式,每组试验设定 3 个重复。第 1 组,原始菌株在不同条件下活化:(1)正常条件:25℃、150 r/min (OS + NC = Original Strain + Normal Condition);(2)氮源缺乏的恶劣条件:培养基氮源减半,25℃、100 r/min (OS + BC = Original Strain + Bad Condition);第 2 组,原始菌株和驯化菌株在同一条件下活化:(1)原始菌株在 25℃、150 r/min 条件下培养(OS + NC = Original Strain + Normal Condition);(2)驯化菌株,在 25℃、150 r/min 条件下培养(AS + NC = Adapted strain + Normal Condition)。培养时间 20-24 h,连续活化 3 代,每代种子期菌株的测定指标包括:生物量、DHA 含量、SOD 酶活、MDA 和 Pro 含量。

发酵培养:将上述不同方法培养的种子按 10% (v/v) 的接种量接入装有 50 mL 发酵培养基的

250 mL 凹槽三角摇瓶中培养至糖耗尽,培养温度 25℃,转速 150 r/min。发酵完成后,测定各菌株的测定指标包括:生物量、油产量和 DHA 产量。

1.5 测定方法

1.5.1 SOD 活性测定:参考 James F. Ewing^[11-12] 等的方法:离心收集细胞,用 3 mL 预冷的 4℃ pH 值 7.8 的磷酸缓冲液(含 0.1 mmol/L EDTA,简称 EDTA-PB)洗 3 次,并将细胞悬于 EDTA-PB 中,超声波破菌(冰浴超声破碎),在 4℃ 下,5200 × g 离心 60 min。制备的上清液,按照 SOD 活性检测试剂盒的 WST-1 法测定。37℃ 孵育 20 min,在 450 nm 测定吸光度。将黄嘌呤氧化酶耦联反应体系中抑制百分率为 50% 时为一个酶活力单位(unit),定义单位蛋白下的酶活为比酶活(U/g)。

1.5.2 MDA 和 Pro 含量测定:MDA 含量采用巴比妥酸比色法测定^[13],Pro 含量采用比色法测定^[14]。

1.5.3 细胞干质量和油脂提取方法:参照文献^[15];

1.5.4 脂肪酸甲酯制备及气相色谱分析:参照文献^[16]。

1.6 数据分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行显著性分析。试验结果数据均采用平均数 ± 标准差表示,而不同组之间的差异性比较采用 one-way ANOVA 方法, $P < 0.05$ 表示差异显著,具有统计学意义。

采用 Origin 8.0 统计软件进行相关性分析。试验结果的相关性分析采用 Fitting 方法,通过观测相关性方程的 r 来判断最终的相关性。

2 结果

2.1 不同 *Schizochytrium* sp. HX-308 菌株种子培养阶段生长性能比较

不同裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. HX-308 菌株在种子培养阶段生长性能差异如表 1 所示。选择连续培养 3 代的种子进行比较,2 组试验中,在整个种子期,营养饥饿菌体生长极其缓慢,从而导致菌体生物量和 DHA 占总脂肪酸的含量都较低,最终仅为 10.21 g/L 和 33.28%, 分别比原始菌株低了 60.33% 和 30.75%。而驯化菌株的生长状态明显优于原始菌株,其中菌体生物量和 DHA 占总脂肪酸的含量达到了 30.35 g/L 和 54.76%, 分别为原始菌株的 1.2 倍和 1.1 倍。对数据进行方差分析和邓肯

多重比较后发现,原始菌株、营养饥饿菌株和驯化菌株在种子阶段生长性能具有显著性差异($P < 0.05$)。

表 1 不同裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. HX-308 种子期菌株性能

Table 1 The performance of different generation *Schizochytrium* sp. HX-308 strains in seed period

Different batch	The first generation seed ¹		The second generation seed ²		The third generation seed ³	
	Biomass (g/L) ± SD	DHA content (%) ± SD	Biomass (g/L) ± SD	DHA content (%) ± SD	Biomass (g/L) ± SD	DHA content (%) ± SD
OS + NC	15.13 ± 1.41 ^{b1}	41.95 ± 2.64 ^{c1}	23.52 ± 0.20 ^{b2}	46.17 ± 1.65 ^{c2}	25.74 ± 1.23 ^{b3}	48.06 ± 0.57 ^{c3}
OS + BC	8.92 ± 2.04 ^{a1}	24.47 ± 3.47 ^{d1}	7.63 ± 1.08 ^{a2}	30.29 ± 4.12 ^{d2}	10.21 ± 2.12 ^{a3}	33.28 ± 3.73 ^{d3}
AS + NC	20.31 ± 1.35 ^{c1}	45.29 ± 0.69 ^{b1}	27.28 ± 2.50 ^{c2}	50.28 ± 0.84 ^{b2}	30.35 ± 1.15 ^{c3}	54.76 ± 0.30 ^{b3}

The values are means of three replicates and their standard deviations. Means with different letters are significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$).

2.2 不同 *Schizochytrium* sp. HX-308 菌株发酵性能差异比较

将 2.1 中不同处理的 *Schizochytrium* sp. HX-308 菌株接入同样的发酵培养基中探讨其发酵性能的差异如图 1 所示。比较 2 组试验的最终发酵参数生物量、油产量和 DHA 产量结果发现:营养饥饿菌株的 3 个发酵参数最低,分别仅为 24.20 g/L、7.53 g/L 和 2.21 g/L;而驯化菌株的发酵参数最高,分别达到了 54.98 g/L、30.84 g/L 和 12.29 g/L。对数据进行显著性比较后表明,这 3 个菌株的发酵性能具有显著性差异($P < 0.05$)。种子菌株的显著性差异,导致了最终发酵性能的差异。

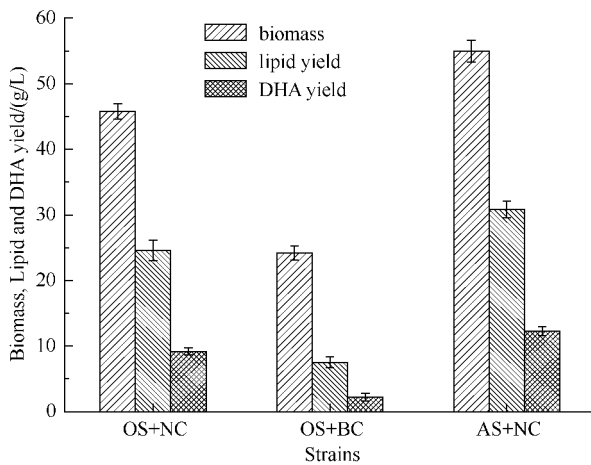


图 1 不同裂殖壶菌 *Schizochytrium* sp. HX-308 菌株的发酵结果

Fig. 1 The fermentation results of different *Schizochytrium* sp. HX-308 strains. OS + NC: Original Strain + Normal Condition; OS + BC: Original Strain + Bad Condition; AS + NC: Adapted strain + Normal Condition. Means with different letters are significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$).

不同状态的 *Schizochytrium* sp. HX-308 菌株发酵后脂肪酸分布的差异如表 2 所示。在营养饥饿菌

株的发酵结果中,以 C14:0 和 C16:0 为主的饱和脂肪酸含量较高,分别为 6.06% 和 29.78%,短链饱和脂肪酸(short-chain SFAs, C14:0% + C16:0%)占总脂肪酸的含量比原始菌株高了 1.3%,因此菌体中 DHA 的含量则明显较低仅为 30.32%,比原始菌株低了 14%。在驯化菌株的发酵结果中,C14:0 和 C16:0 占总脂肪酸的含量分别为 6.77% 和 21.84%,短链饱和脂肪酸占总脂肪酸中的含量比原始菌株低了 6%,因此菌体中 DHA 的含量较高,为原始菌株的 1.2 倍。由此可见,种子阶段生长性能差异显著的菌株在最终发酵的产物脂肪酸组成上也存在了显著性差异。

表 2 不同 *Schizochytrium* sp. HX-308 菌株的脂肪酸分布

Table 2 The fatty acid composition of different

Schizochytrium sp. HX-308

TFA	(OS + NC) / % ± SD	(OS + BC) / % ± SD	(AS + NC) / % ± SD
C14:0	7.98 ± 0.25	6.06 ± 0.23	6.77 ± 0.41
C14:1	0.75 ± 0.58	3.52 ± 0.39	0.74 ± 0.30
C16:0	26.60 ± 1.10	29.78 ± 0.48	21.84 ± 0.81
C16:1	0.36 ± 0.11	0.92 ± 0.21	0.36 ± 0.41
C18:0	0.37 ± 0.102	1.07 ± 0.30	0.38 ± 0.41
C18:3	0.32 ± 0.10	0.92 ± 0.21	0.37 ± 0.32
EPA	3.69 ± 0.32	11.52 ± 0.51	1.30 ± 0.28
DPA	13.48 ± 0.41	12.14 ± 0.33	13.95 ± 0.82
DHA	44.27 ± 0.25	30.32 ± 0.30	51.64 ± 0.38
Others	2.19 ± 0.11	1.76 ± 0.29	2.26 ± 0.34

OS + NC: Original Strain + Normal Condition; OS + BC: Original Strain + Bad Condition; AS + NC: Adapted strain + Normal Condition.

2.3 SOD 酶活与不同 *Schizochytrium* sp. HX-308 菌株性能相关性分析

不同 *Schizochytrium* sp. HX-308 菌株在 3 代种子期 SOD 酶活的变化和发酵性能的相关性如图 2 所示。随着代数的增加,营养饥饿菌株的 SOD 酶活呈现不断升高的趋势,由最初的 0.0340 U/g 升高到第 3 代的 0.297 U/g,而驯化菌株的 SOD 酶活呈

降低趋势,3代后降低了59%。对3个菌株种子期的SOD酶活进行显著性分析,发现3个菌株第1代时酶活无显著性差异,但到第2代和最终第3代时,SOD酶活具有显著性差异($P < 0.05$)。将最终

第3代SOD酶活力数据与常规发酵指标中的生物量、DHA产量、DHA占总脂肪酸比例进行相关性分析,拟合方程的 $r < 0$,显示它们之间呈负相关性。

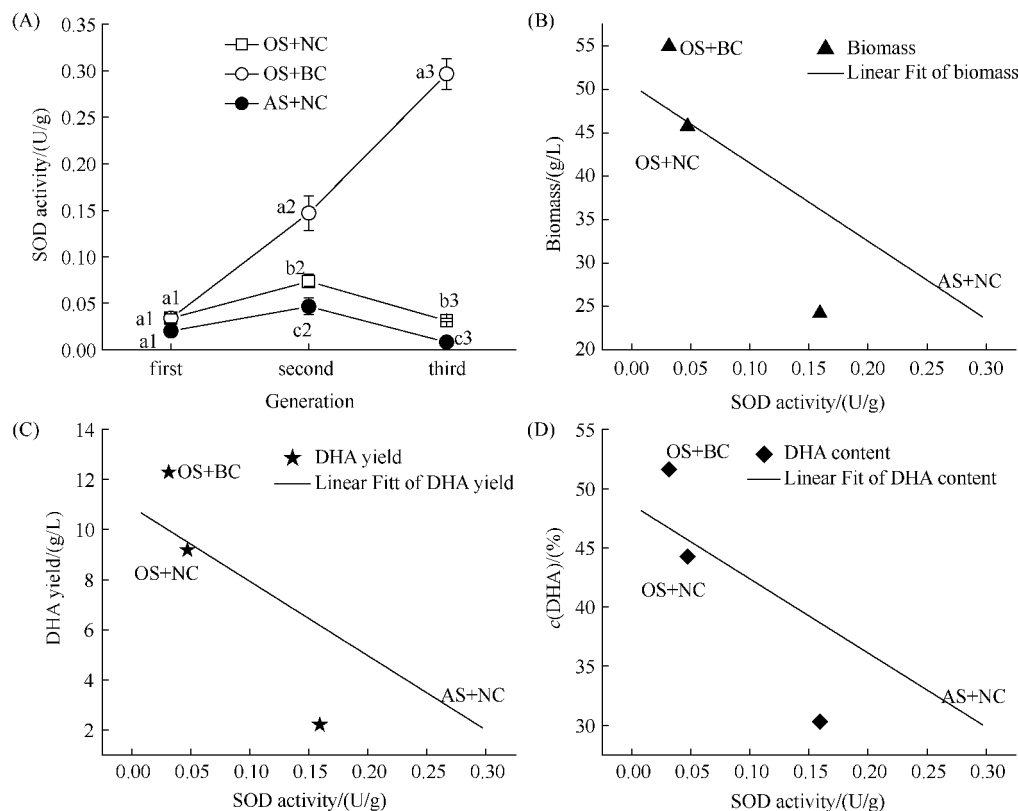


图2 SOD酶活在不同*Schizochytrium sp.* HX-308菌株种子时期的变化以及与最终发酵参数之间的关系

Fig. 2 The changes of SOD activity in different *Schizochytrium sp.* HX-308 of seed period, the relationship between the fermentation indexes. OS + NC: Orignial Strain + Normal Condition; OS + BC: Orignial Strain + Bad Condition; AS + NC: Adapted strain + Normal Condition. Codes on the top left corner of each graph represent the certain kind of SOD changes. A: The changes of SOD activity in different *Schizochytrium sp.* HX-308 of seed period (first: the first generation seed period, second: the second generation seed period, third: the third generation seed period); B: The relationship between SOD activity and biomass; C: The relationship between SOD activity and DHA yield; D: The relationship between SOD activity and DHA content (DHA yield/lipid yield). Means with different letters are significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$).

2.4 MDA含量与不同*Schizochytrium sp.* HX-308菌株性能相关性分析

不同*Schizochytrium sp.* HX-308菌株在3代种子期MDA含量的变化和发酵性能的相关性如图3所示。随着代数的增加,营养饥饿菌株的MDA含量呈上升趋势,由最初的21.91 mmol/g·Fw升高到第3代的84.19 mmol/g·Fw,而驯化菌株的MDA含量升高最缓慢,3代过后仅为39.39 mmol/g·Fw。从图3中我们可以看出,3个菌株的MDA含量在整个

3代种子期都具有显著性差异($P < 0.05$)。将最终第3代MDA含量数据与常规发酵指标中的生物量、DHA产量、DHA占总脂肪酸比例进行相关性分析,拟合方程的 $r < 0$,显示它们之间呈负相关性。

2.5 Pro含量与不同*Schizochytrium sp.* HX-308菌株性能相关性分析

不同*Schizochytrium sp.* HX-308菌株在3代种子期Pro含量的变化和发酵性能的相关性如图4所示。随着增值代数的增加,营养饥饿菌株的Pro含

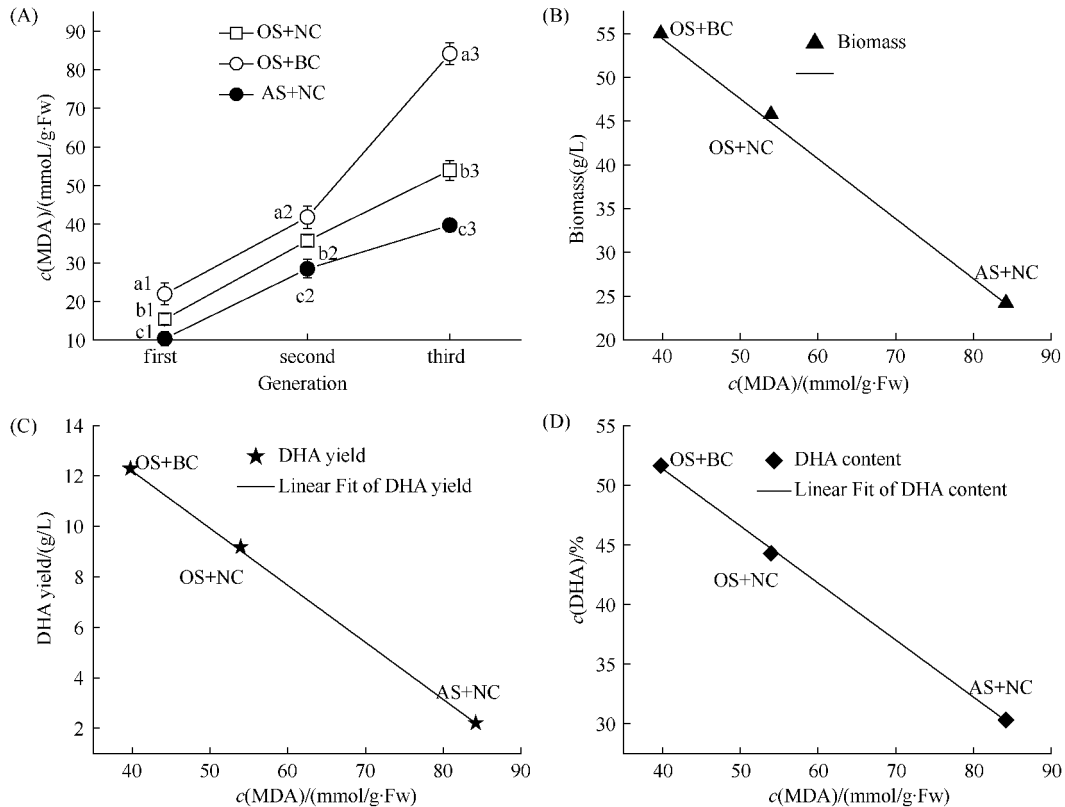


图3 MDA含量在不同 *Schizochytrium sp. HX-308* 菌株种子时期的变化以及与最终发酵参数之间的关系

Fig.3 The changes of MDA content in different *Schizochytrium sp. HX-308* of seed period, the relationship between the fermentation indexes. OS + NC: Original Strain + Normal Condition; OS + BC: Original Strain + Bad Condition; AS + NC: Adapted strain + Normal Condition. Codes on the top left corner of each graph represent the certain kind of MDA changes. A: The changes of MDA content in different *Schizochytrium sp. HX-308* of seed period (first: the first generation seed period, second: the second generation seed period, third: the third generation seed period); B: The relationship between MDA content and biomass; C: The relationship between MDA content and DHA yield; D: The relationship between MDA content and DHA content (DHA yield/lipid yield). Means with different letters are significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$).

量呈现不断升高的趋势,由最初的 $0.0963 \text{ mg/g}\cdot\text{Fw}$ 升高到第3代的 $0.242 \text{ mg/g}\cdot\text{Fw}$,而驯化菌株的Pro含量呈降低趋势,最终到第3代时仅为 $0.0747 \text{ mg/g}\cdot\text{Fw}$ 。在第1代种子期,原始菌株和营养饥饿菌株的Pro含量无显著性差异,而驯化菌株与它们之间具有显著性差异($P < 0.05$);但在第2代和第3代时,3个菌株的Pro含量存在显著性差异($P < 0.05$)。将最终第3代Pro含量数据与常规发酵指标中的生物量、DHA产量、DHA占总脂肪酸比例进行相关性分析,拟合方程的 $r < 0$,显示它们之间呈负相关性。

3 讨论

本实验发现,整个种子期,营养饥饿原始菌株的

SOD酶活,MDA和Pro含量都明显高于驯化菌株,但最终驯化菌株的发酵油产量、油含量和DHA产量却分别是营养饥饿菌株的4.10倍、1.80倍和5.56倍。这说明,裂殖壶菌的发酵性能和菌株种子期的SOD酶活、MDA和Pro含量呈负相关关系。有研究表明,部分抗氧化基因表达的增加可以提高菌株的抗性。Gupta等^[17]研究认为,在烟草中Cu/Zn-SOD基因的过量表达可提高其对环境胁迫的忍耐力;黄建忠^[18]等研究认为,在裂殖壶菌中,SOD mRNA过表达的裂殖壶菌不仅具有更强的抗冷性,而且还含有较高的DHA含量。SOD作为生物体内抗氧化系统的第一道防线,能清除氧自由基,降低氧化胁迫对细胞膜脂的损害^[19]。在本试验中,营养饥饿原始菌株的SOD酶活明显要高于驯化菌株。如图5所示,营养饥饿菌株在不利于菌株生长的条件下,菌体代

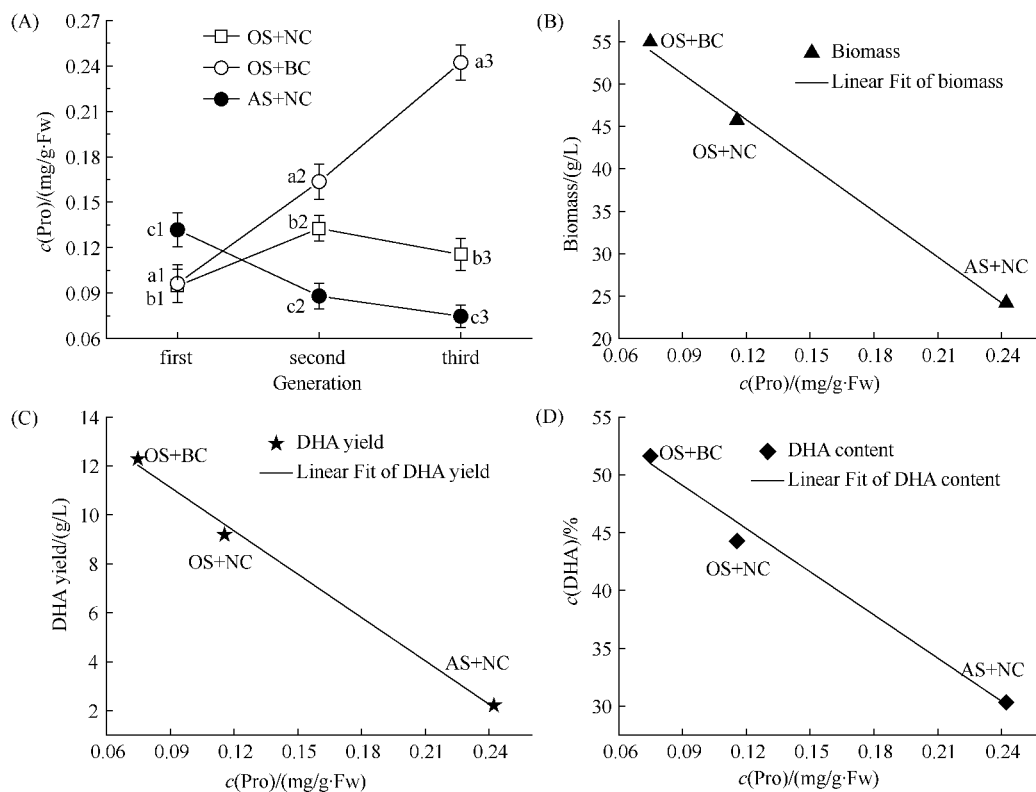


图4 Pro 含量在不同 *Schizochytrium sp.* HX-308 菌株种子时期的变化以及与最终发酵参数之间的关系

Fig.4 The changes of Pro content in different *Schizochytrium sp.* HX-308 of seed period, the relationship between the fermentation indexes. OS + NC: Original Strain + Normal Condition; OS + BC: Original Strain + Bad Condition; AS + NC: Adapted strain + Normal Condition. Codes on the top left corner of each graph represent the certain kind of Pro changes. A: The changes of Pro content in different *Schizochytrium sp.* HX-308 of seed period (first: the first generation seed period, second: the second generation seed period, third: the third generation seed period); B: The relationship between Pro content and biomass; C: The relationship between Pro content and DHA yield; D: The relationship between Pro content and DHA content (DHA yield/lipid yield). Means with different letters are significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$).

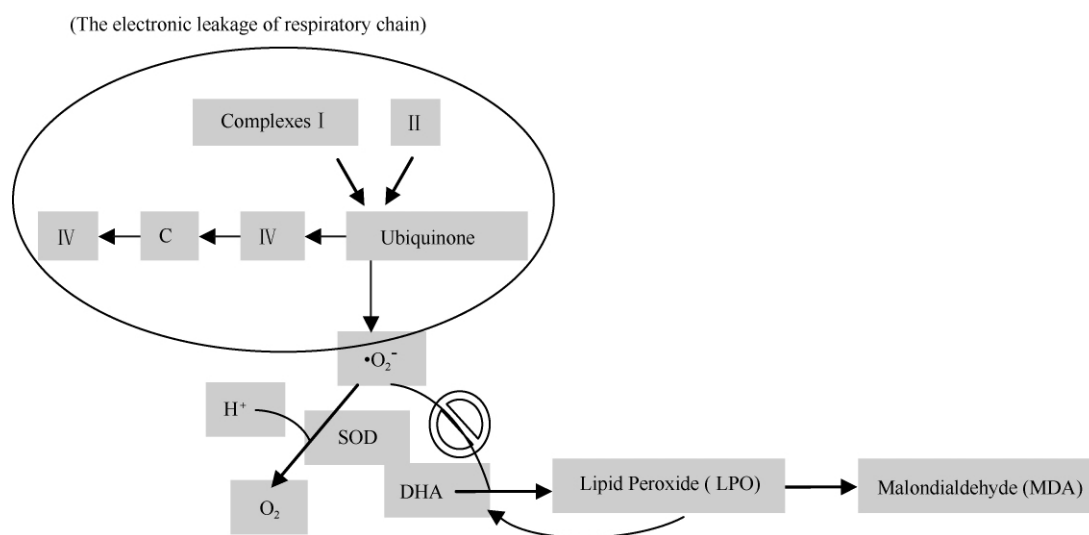


图5 *Schizochytrium sp.* HX-308 菌株的产物 DHA 被氧化过程

Fig.5 The oxidation process of DHA the product of *Schizochytrium sp.* HX-308.

谢过程中的呼吸作用降低,菌株就处在一个相对高氧的环境中,导致呼吸链中有大量 $\cdot\text{O}_2^-$ 泄漏,同时细胞内一些酶促反应,就以环境中过量的 O_2 为H受体,从而胞内产生大量的 $\cdot\text{O}_2^-$ ^[20]。在这种环境下,SOD作为生物体内天然的自由基清除剂,活性不断升高,以减轻 $\cdot\text{O}_2^-$ 对细胞的毒害作用。SOD作为一种恶劣条件应激酶,在没有外界特异条件诱导的情况下,胞内自身SOD的活性越高,说明该细胞产生了较多的活性氧自由基,需要SOD来清除以维持细胞的正常生长,这也表明该细胞处于较不理想的生理状态下。

本试验中的营养饥饿原始菌株MDA和Pro含量分别高达50 mmol/g·Fw和0.166 mg/g·Fw。MDA是细胞膜脂以及不饱和脂肪酸的过氧化的重要产物之一,可以利用它作为脂质过氧化指标。同时也有一些研究认为,逆境下Pro含量的提高是一种受害症状的表征^[21]。钱丽华^[22]等通过高温胁迫下,发现三叶青的MDA和Pro含量明显升高;Alia^[22]等也探讨了胞内Pro积累提高了细胞承受单线态氧环境。通过F. Susca^[23]等的研究表明,细胞内的不饱和脂肪酸在 $\cdot\text{O}_2^-$ 的作用下,被氧化成过氧化脂,而过氧化脂又可进一步使脂肪酸氧化,产物DHA大量地转化为脂质过氧化物MDA。在不利于菌株生长的氮源缺乏及低转速的条件下,菌株为了抵抗这种不利环境,胞内不断地产生大量的Pro。

综合上述分析,我们发现,当菌株处于较佳的生理状态下时,细胞内产生的 $\cdot\text{O}_2^-$ 较少,对细胞的毒害作用以及产物DHA的过氧化作用也小,所以胞内SOD活性和MDA含量也会较低。在没有本质上提高菌株产DHA的能力基础上,大大降低了后期已产生的DHA的被氧化作用,这从另一个方面来讲,减少了已产生的DHA的损失,相对地提高了该菌株产DHA的能力。因此,在没有外界特异条件诱导的情况下,低SOD、MDA和Pro的菌株具有更高的产DHA的能力。

而传统评价筛选得到的菌株发酵性能优劣的方法是通过考察最后的发酵参数^[24-25],但此种方法在种子期就可通过这3个指标来判断菌株的发酵性能,与传统评价方法比周期短,工作量少。最终表明,SOD、MDA和Pro这3个指标可以作为评价裂殖壶菌菌株质量优劣的新指标。因此,本研究可为高效筛选优良菌株提供一种新的评价方法。

参考文献

- [1] Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF. The essentiality of long chain n - 3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in Lipid Research*, 2001, 40 (1-2) : 61-94.
- [2] Nordoy A, Marchioli R, Arnesen H, Videbaek J. n - 3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Lipids*, 2001, 36 (1) : 127-129.
- [3] Zhu LY, Zhang XC, Wang SF, Chang LR. Analysis of Nutritional Components of a Marine Fungus: *Schizochytrium limanium*. *Food Science*, 2009, 30 (24) : 272-275. (in Chinese)
朱路英,张学成,王淑芳,常林瑞. 一种海洋真菌-裂殖壶菌的营养成分分析. *食品科学*, 2009, 30 (24) : 272-275.
- [4] Fedorova-Dahms I, Marone PA, Bailey-Hall E, Ryan AS. Safety evaluation of Algal Oil from *Schizochytrium* sp. . *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49 (1) : 70-77.
- [5] Lian M, Huang H, Ren LJ, Ji XJ, Zhu JX, Jin LJ. Increase of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. through mutagenesis and enzyme assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 162 (4) : 935-941.
- [6] Li M, Robinson E, Tucker C, Manning B, Khoo L. Effects of dried algae *Schizochytrium* sp. , a rich source of docosahexaenoic acid, on growth, fatty acid composition, and sensory quality of channel cat fish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 2009, 292 (3-4) : 232-236.
- [7] Eze JI, Anene BM, Chukwu CC. Determination of serum and organ malondialdehyde (MDA) concentration, a lipid peroxidation index, in *Trypanosoma brucei*-infected rats. *Comparative Clinical Pathology*, 2008, 17 (2) : 67-72.
- [8] Tosi S, Kostadinova N, Krumova E, Pashova S, Dishliiska V, Spasova B, Vassilev S, Angelova M. Antioxidant enzyme activity of filamentous fungi isolated from livingston island, maritime Antarctica. *Polar Biology*, 2010, 33 (9) : 1227-1237.
- [9] Wang YQ, Tao T. Compatible solutes of osmotic regulation process in microorganism. *Microbiology China*, 1994, 21 (5) : 293-296. (in Chinese)
王颖群,陶涛. 微生物渗透压调节过程中的相容性溶质. *微生物学通报*, 1994, 21 (5) : 293-296.

- [10] Ren LJ, Wei P, Feng Y, Ji XJ, Huang H. Effect of biotin and cerulenin addition on DHA production by *Schizochytrium* sp.. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2012, 10 (1) : 42-45. (in Chinese)
任路静, 魏萍, 冯云, 纪晓俊, 黄和. 添加生物素和浅蓝菌素对裂殖壶菌发酵产 DHA 的影响. 生物加工过程, 2012, 10 (1) : 42-45.
- [11] Martínez, Rosa. Effects of ultraviolet radiation on protein content, respiratory electron transport system (ETS) activity and superoxide dismutase (SOD) activity of Antarctic plankton. *Polar Biology*, 2007, 30 (9) : 1159-1172.
- [12] Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry*, 1995, 232 (2) : 243-248.
- [13] Zhou Q, Liang YX. The improvement of the MDA determine in animal livers. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2010, 21 (1) : 224-225. (in Chinese)
周琪, 梁运祥. 动物肝组织中丙二醛含量测定方法的改进. 时珍国医国药, 2010, 21 (1) : 224-225.
- [14] Zhang HB, Zeng YL, Lan HY, Zhang FC. Physiological Responses of *Betula halophila* (Betulaceae) to Salt Stress. *Acta Botanica Yunnanica*, 2009, 31 (3) : 260-264. (in Chinese)
张海波, 曾幼玲, 兰海燕, 张富春. 盐胁迫下盐桦生理响应的变化分析. 云南植物研究, 2009, 31 (3) : 260-264.
- [15] Ren LJ, Huang H, Xiao AH, Lian M, Jin LJ, Ji XJ. Enhanced docosahexaenoic acid production by reinforcing acetyl-CoA and NADPH supply in *Schizochytrium* sp. HX-308. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2009, 32 (6) : 837-843.
- [16] Ren LJ, Ji XJ, Huang H, Qu L, Feng Y, Tong QQ, Ouyang PK. Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87 (5) : 1649-1656.
- [17] Gupta AS, Heinen JL, Holaday AS. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that over-express chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90 (4) : 1629-1633.
- [18] Liu J, Gao YY, Jiang XZ, Mao RY, Tian BY, Ke CR, Wu SG, Huang JZ. Effects on Docosahexaenoic Acid Biosynthesis and Expression of Superoxide Dismutase in *Schizochytrium* at Low Temperature. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 17 (1) : 50-55. (in Chinese)
刘静, 高媛媛, 江贤章, 毛若雨, 田宝玉, 柯崇榕, 吴松刚, 黄建忠. 低温胁迫对裂殖壶菌 DHA 生物合成及 SOD 表达的影响. 药物生物技术, 2010, 17 (1) : 50-55.
- [19] Amanatidou A, Bennik MH, Gorris LG, Smid EJ. Superoxide dismutase plays an important role in the survival of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen. *Archives of Microbiology*, 2001, 176 (1-2) : 79-88.
- [20] Amanatidou A, Bennik MH, Gorris LG, Smid EJ. Superoxide dismutase plays an important role in the survival of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen. *Archives of Microbiology*, 2001, 176 (1-2) : 79-88.
- [21] Alia, Mohanty P, Matysik J. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, 2001, 21 (2) : 195-200.
- [22] Qian LH, Ruan SL, Dai DL, Xin Y. The effect of temperature on the indexes of SOD and MDA in *Radix Tetrastigmae*. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2010, 2 (5) : 972-974. (in Chinese)
钱丽华, 阮松林, 戴丹丽, 忻雅. 温度对三叶青组培苗 SOD、MDA 等指标的影响. 浙江农业科学, 2010, 2 (5) : 972-974.
- [23] Susca F, Sangalli L, Rossi CAS, Biondi PA, Dell'Orto V. Determination of Malonaldehyde in Bovine Plasma During the Receiving Period and Effects of Phytoderivative Diet Supplementation. *Veterinary Research Communications*, 2006, 30 (1) : 391-393.
- [24] Lian M, Huang H, Ren LJ, Ji XJ, Zhu JY, Jin LJ. Increase of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. through mutagenesis and enzyme assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 162 (4) : 935-941.
- [25] Lian M, Huang H, Ren LJ, Zhu JY, Jing LJ, Xiao AY. Stain improvement of docosahexaenoic acid producing by protoplast mutagenesis. *Food Science and Technology*, 2010, 35 (5) : 24-27. (in Chinese)
练敏, 黄和, 任路静, 朱婧瑶, 金立晶, 肖爱华. DHA 生产菌的原生质体诱变. 食品科技, 2010, 35 (5) : 24-27.

Superoxide dismutase, malondialdehyde and proline as new quality criteria for *Schizochytrium* sp. Fermentation

Li Zhang, Lujing Ren, Yuanwei Hu, Liang Qu, He Huang*

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: [Objective] The aim of our study was to find a novel method to evaluate the strain quality of *Schizochytrium* sp. HX-308. [Methods] An acclimatized strain and an original strain were cultivated under normal condition. Meanwhile, the same acclimatized strain was cultured under two different conditions, the optimum condition and the harsh condition. We detected the activity of superoxide dismutase and the contents of malondialdehyde and proline by WST-1 method, thiobarbituric acid test and colorimetry, respectively. The relationship between the three criteria and the fermentation performance of *Schizochytrium* sp. HX-308 was studied. [Results] The acclimatized strain cultured under the optimal fermentation condition had the lowest superoxide dismutase activity (0.025 U/g protein), malondialdehyde (26.20 mmol/g·Fw) and proline contents (0.098 mg/g·Fw). In contrast, the superoxide dismutase activity of the original strain cultured in the harsh conditions was 5 times higher than that of the acclimatized strain, the malondialdehyde and proline contents were both 2 times as high as the acclimatized strain. [Conclusion] The three criteria were correlated negatively with the fermentation performance. Thus, they could be used to evaluate quality and fermentation performance of *Schizochytrium* sp.

Keywords: *Schizochytrium* sp., superoxide dismutase, malonaldehyde, proline, evaluation criteria

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Technologies Research and Development Program of China (2011BAD23B03), by the National Basic Research Program of China (2011CB200906), by the National High Technology Research and Development Program of China (SS2012AA021704) and by the Jiangsu Province Natural Science Fund (BK2012424)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-83172094; E-mail: biotech@njut.edu.cn

Received: 29 August 2012 / Revised: 21 November 2012

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2013 年 2 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008 - 2012	月刊	48 - 52	1 - 12
2013	月刊	53	2