第10卷 第4期 2010年2月
1671－1815(2010)4-0868-06

科 学 技 术 与 工 程
Science Technology and Engineering

Vol. 10 No. 4 Feb. 2010
© 2010 Sci. Tech. Engng.

产耐热过氧化氢酶菌株的筛选和培养

刘灵芝[1,2] 常雁红[2] 罗 炜[3] 熊 莲[1,2] 肖宝清[2] 罗 晖[1]

(北京科技大学生物科学与技术系[1],环境工程系[2],北京 100083;江西中烟工业公司技术研发中心[3],南昌 330096)

摘 要 过氧化氢酶能催化过氧化氢的分解,在食品、环保、纸浆和造纸业、以及纺织行业具有重要的工业应用价值。研究从堆肥中分离了一株产过氧化氢酶的嗜热菌。该菌最适生长温度为55℃,最适生长pH值为7.0,最适NaCl浓度为1.5%。通过16S rDNA编码基因序列分析,该菌和环状芽孢杆菌有较高的同源性,命名为 *Bacillus sp.* SHT2。通过对培养基中的碳、氮源进行优化,酶活达到196.9 U/mL。酶学性质研究表明该菌产生的过氧化氢酶具有良好的热稳定性、pH稳定性和储存稳定性。

关键词 过氧化氢酶 嗜热菌 筛选

中图法分类号 Q814.2; **文献标志码** B

过氧化氢酶(Catalases,CAT)广泛存在于好氧微生物和动、植物体内,是在生物演化过程中建立起来的生物防御系统的关键酶之一,其生物学功能是催化细胞内过氧化氢分解,防止氧化。目前,随着整个人类社会对环境问题的关注,利用过氧化氢酶来清除工艺过程和废水中的过氧化氢的生物净化工艺将有广阔的推广和应用前景,因此过氧化氢酶在食品、环保、纸浆和造纸业、以及纺织行业具有重要的工业应用价值[1,2]。

传统上过氧化氢酶的生产是从人或动、植物组织中以及牛肝中提取的[3,4],该方法受来源、季节、原料以及成本的限制,容易污染,热稳定性也较差,不能满足工艺要求。而用微生物法制备酶制剂具有生产来源范围广、容易培养、生产周期短、价格便宜、可大规模生产等优点[5,6]。而过氧化氢酶作为一种具有重要应用价值的酶,尽管对其的研究已经持续了一个多世纪,但嗜热微生物过氧化氢酶的研究仍然较少[7,8]。因此开发热稳定性的过氧化氢酶是市场的需求,也是企业降低成本的需要。

本文从高温环境中分离产耐热过氧化氢酶的菌株,并对其菌株鉴定、培养条件和酶学性质进行了研究,以期为耐热过氧化氢酶在工业上的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样品

从实验室堆肥半成品中取三种不同的样品,从中分离产耐热过氧化氢酶的微生物菌株。

1.2 培养基

菌种筛选和分离培养基(g/L):酵母粉5,蛋白胨10,NaCl 10,琼脂20。

基础发酵培养基(g/L):蔗糖10,酵母粉5,牛肉膏10,NaCl 10,KH_2PO_4 0.28,$MgSO_4$ 0.25,$CaCl_2$ 0.074,琼脂20,pH7.0。

1.3 产过氧化氢酶菌株的筛选方法

分别称取不同材料样品1 g,加入装有20 mL无菌水的100 mL三角瓶中,摇床振荡摇匀(200 r/min、20 min,45℃),无菌操作下吸取液体样品10 mL加入20 mL液体分离培养基中,55℃ 200 r/min,过夜培养,稀释涂布于固体分离培养基中形成单菌落,点滴3%的H_2O_2于单菌落及周围,根据产气泡的速

2009年10月26日收到 国家科技支撑计划项目(2008BAD91B01)、北京市科技新星计划项目(2006B22)资助

第一作者简介:刘灵芝(1983—),河南人,女,硕士研究生,研究方向:生物化工。

*通讯作者简介:罗 晖,男,副教授,E-mail: luohui@ustb.edu.cn。

度和强度进行初筛，选择产气速度较快的菌落作为复筛的对象。采用贝尔斯－西策耳斯法[9]测定过氧化氢酶酶活。

1.4　菌株鉴定

根据菌株 16S rDNA 序列分析进行菌株鉴定。

16S rDNA 序列 PCR 扩增：吸取 200 μL 菌液，13 000 r/min离心 2 min，加 200μL 无菌水悬浮洗涤 2 次后，再加 200 μL 的无菌水悬浮，于沸水浴处理 2 min～3 min，13 000r/min 离心 4 min，吸取上清液作为为 PCR 扩增的模板。根据细菌 16S rDNA 扩增的通用引物[10]，设计 PCR 扩增上游引物（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）和下游引物 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3'）。PCR 扩增体系（25 μL）：1 μL 的 DNA 模板，0.5 μL 的 10 μmol/mL dNTP，0.5 μL 的 5 U/μL 的 Taq 酶，2.5 μL 的 10 × PCR 反应缓冲液，上下游引物各 0.5 μL（引物浓度 0.028 5 nmol/μL），用无菌水补充到 25 μL。反应条件：94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 1 min；55℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 2 min，30 个循环；最后 72℃ 延伸 10 min。扩增后的 16S rDNA 片段由北京三博远志公司进行纯化测序。

从 GeneBank 中通过 Blast 比对，选用与 SHT2 菌株的 16S rDNA 序列相似值大于 98% 的 10 株菌用于系统发育学分析，16S rDNA 全序列用 Clustal x（1.8）软件包排序，用 phylip 3.6 软件包中的 Kimuraz parameter 模型计算进化距离，用 Neighbor Joining 法构建系统发育树[11]。

2　结果与讨论

2.1　菌株筛选

以无菌牙签挑取培养的斜面菌种于洁净玻片上，在其上加一滴 3% 的 H_2O_2，观察气泡的产生情况，若立即出现大量气泡说明具有过氧化氢酶活性。根据气泡产生迅速和持久的菌株进行复筛，经多次复筛得到产酶较稳定的菌株，从多株菌中分离得到的 SHT2 菌株酶活最高且稳定。该菌株发酵培养 12 h 后，分别测定细胞内及培养液中的酶活，培养液中的胞外酶活占总酶活的 3.8%，总酶活达到 196.9 U/mL。

SHT2 菌株的生长温度范围是 45℃—70℃，低于 45℃ 和高于 60℃ 生长缓慢，最适的生长温度为 55℃，说明该菌属于高温菌，而且该菌具有在合适的温度下生长较快的特点，培养约 3 h 即进入对数生长期。因此选取 SHT2 菌株作为下一步研究的菌株。

2.2　菌株 SHT2 的鉴定

2.2.1　菌株的形态学特征

SHT2 菌株为浅黄色，透明，表面光滑，边缘整齐。分别从平板上挑取培养 8 h 的菌株，进行革兰氏染色后，证明该菌属于短杆状，阳性菌。

2.2.2　菌株 SHT2 的 16S rDNA 序列分析

PCR 扩增产物测序后，得到该菌株长度为 1 440 bp 的 16S rDNA 序列。将此序列在 GenBank 中进行 Blast 分析，显示与芽孢杆菌属有很强的同源性，SHT2 与 *Bacillus circulans* 同属一个类群，说明它属于芽孢杆菌属，因此将其命名为 *Bacillus sp.* SHT2。图 1 为与同源性较高的菌种构建的系统发育树。

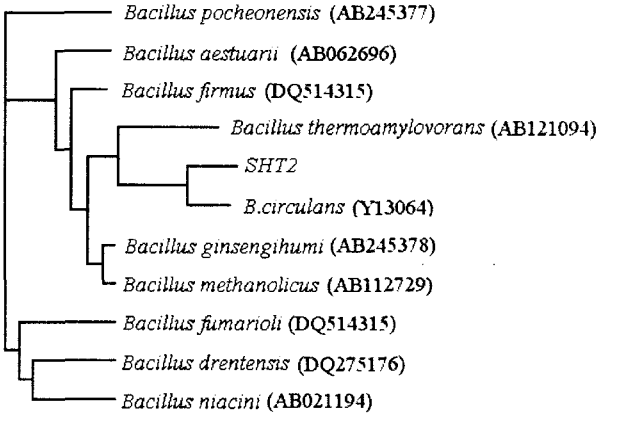

图 1　基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树

2.3　菌株 SHT2 产生过氧化氢酶的条件

2.3.1　不同碳源对产酶的影响

分别考察葡萄糖、蔗糖、乙酸钠、甘油、可溶性淀粉、酒精、柠檬酸、富马酸等不同的碳源对 SHT2 菌株产过氧化氢酶的影响（见图 2）。各种碳源的浓度

均为10 g/L,分别在55℃,200 r/min条件下摇瓶培养12 h和24 h后,测定不同碳源对菌体产酶的影响。

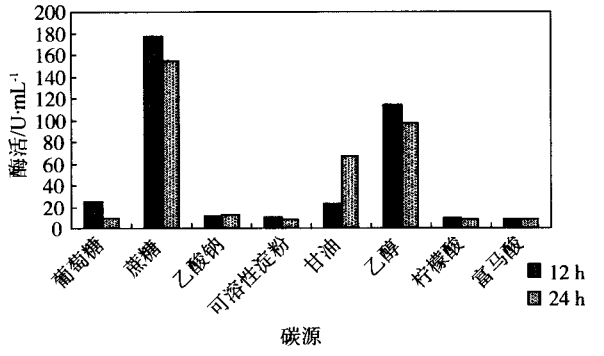

图2 不同碳源对菌体产酶的影响

从图2中可以看出,蔗糖对产酶有显著的影响,在培养12 h后,添加蔗糖与其它碳源相比,酶活较高,乙醇次之,虽然SHT2菌株利用其它碳源也可得到较高生物量,但酶活较低。

2.3.2 不同氮源对产酶的影响

在最优碳源的培养基中,分别在产酶培养基中加入尿素、胰蛋白胨、硫酸铵、蛋白胨、酵母浸粉、硝酸钠、牛肉膏、酵母粉、玉米浆等不同的氮源,其中有机氮源单独添加,无机氮源则与5 g/L的酵母粉一同添加,不同氮源的浓度均为10 g/L。分别在55℃,200 r/min条件下摇瓶培养12 h和24 h后,测定不同氮源对SHT2菌体产酶的影响。

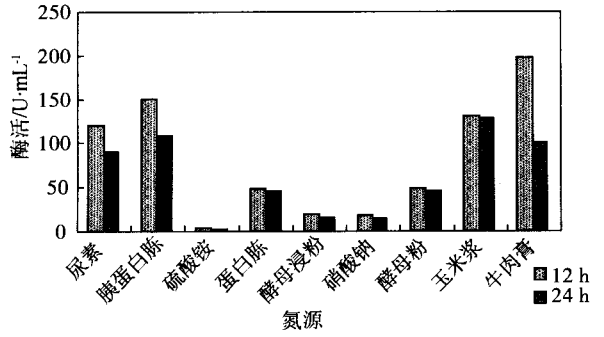

图3 不同氮源对菌体产酶的影响

从图3中可以看出,在相同浓度条件下,无机氮源(硫酸铵、硝酸钠)表现出的生物量和酶活均较低,有机氮源(尿素、胰蛋白胨、牛肉膏、玉米浆)表现出较高的生物量和酶活,其它有机氮源次之,其中以牛肉膏为氮源时产生的酶活最高。

2.3.3 不同培养温度对产酶的影响

本研究中考察了六个不同的培养温度(40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、70℃)对SHT2菌株产酶的影响。将SHT2菌株接种于产酶培养基,分别在不同温度下培养12 h后进行酶活的测定。

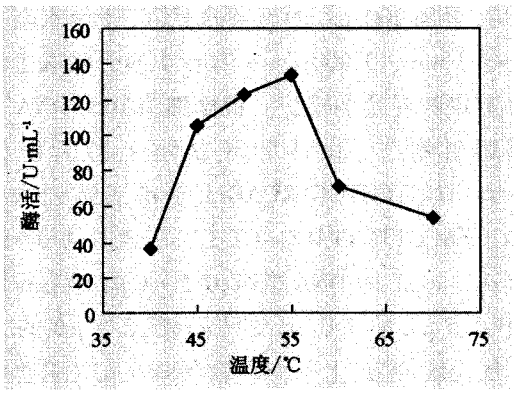

图4 不同培养温度对菌体产酶的影响

从图4中可以发现,在(40—55)℃的温度范围内,该菌产生的过氧化氢酶随温度升高而不断增加,在55℃时酶活达到最高,当温度继续升高时,该菌酶活和菌体生长均呈下降趋势。

2.3.4 不同起始pH值对产酶影响

分别用稀HCl和NaOH将培养基起始pH值调整到pH(5.0—9.0),培养12 h后,考察不同起始pH值对SHT2菌体生长和酶活的影响(见图5)。

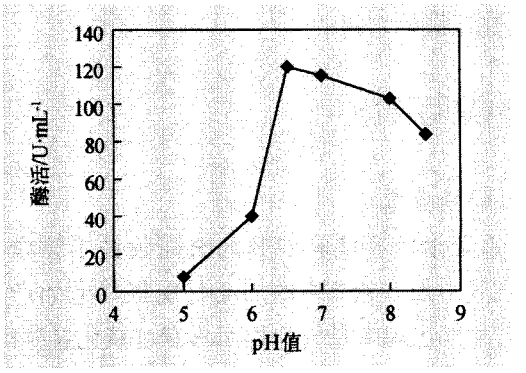

图5 不同pH对菌体产酶的影响

对该菌培养最适起始pH值的研究表明,起始pH值的大小对菌体生长和产酶均有一定的影响,在

pH 值为 6.5—9.0 时，菌体生长较快、产酶较高，当 pH 为中性 7.0 左右时，菌体量和酶活力均达到最高。在 pH 值低于 5.0 和高于 9.0 时，菌体生长非常缓慢，几乎不生长，而且产酶也较低。

2.3.5　不同 NaCl 浓度对产酶的影响

通过研究发现，NaCl、$MgSO_4$、$CaCl_2$ 等无机盐对 SHT2 菌株产酶均有不同程度的促进作用，其中 NaCl 对提高酶活力特别显著，在 NaCl 浓度低于 1.2% 和高于 3.5% 时，该菌生长十分缓慢，而 NaCl 浓度在 1.2%—3.5% 范围时，SHT2 菌体生长非常迅速，在 NaCl 浓度为 1.5% 生长最快，可见该菌对盐浓度有一定的依赖性。

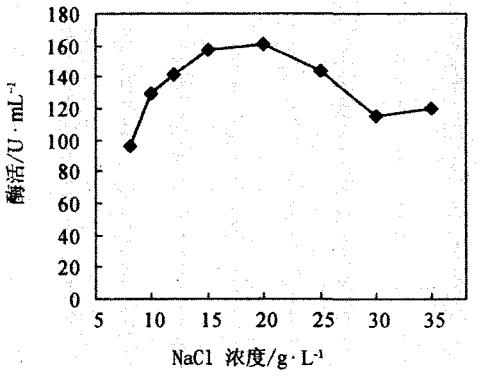

图 6　不同 NaCl 浓度对菌体产酶的影响

不同 NaCl 浓度对菌体产酶的影响见图 6。在 NaCl 在低浓度条件下，酶活力随 NaCl 浓度增加而增加，当 NaCl 浓度为 20.0 g/L 时，酶活力达到最大，此后，随着 NaCl 浓度的增加，酶活力反而减小，这个现象表明过高的离子强度会导致菌体合成过氧化氢酶的过程受到一定程度的抑制。

2.3.6　外源 H_2O_2 浓度及加入时间对酶活的影响

H_2O_2 是细胞合成 CAT 的诱导剂，它对微生物细胞的作用是双重的。一方面，外源 H_2O_2 能直接进入细胞，有可能通过诱导作用促进细胞合成 CAT；另一方面，H_2O_2 具有强氧化性，毫摩尔/升级的 H_2O_2 就会抑制微生物的生长，因此超过一定浓度时它就成为微生物的生长抑制剂。在 H_2O_2 添加量恒定在 0.5% 的情况下，考察其加入时间对该菌产酶的影响。

由图 7 可知，H_2O_2 的加入时间对过氧化氢酶的合成有较大的影响，在培养前期加入 H_2O_2 对过氧化氢酶合成的促进作用较小，当培养(4—8)h 时，也既是该菌生长的对数期，添加 H_2O_2 对过氧化氢酶的合成有明显的促进作用，8 h 时酶活达到最高。在培养前期加入 H_2O_2 抑制了细胞的生长，可能原因是 H_2O_2 对细胞生长及相关酶系的发育有较强的抑制作用，而过氧化氢酶可能主要是对数期的后期合成，因此在培养后期加入 H_2O_2 更加有利于诱导过氧化氢酶的合成。

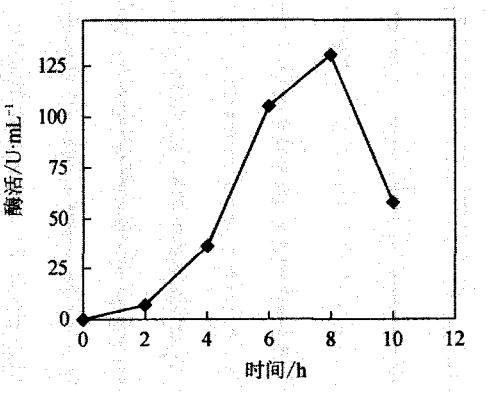

图 7　H_2O_2 添加时机对产酶的影响

分别将终浓度为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的 H_2O_2 加入到培养 8 h 的培养基中，培养 12 h 后进行酶活的测定。

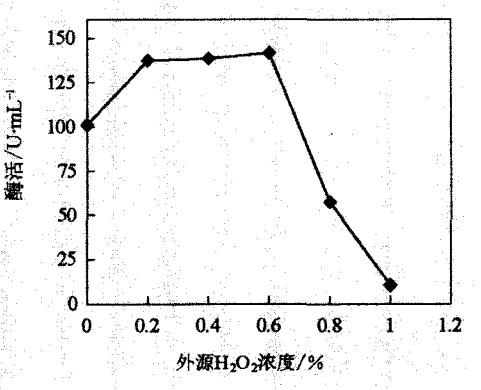

图 8　H_2O_2 添加量对产酶的影响

由图 8 可知，随着 H_2O_2 的加入量的增加，产酶逐步增加，当 H_2O_2 的加入量为 0.6% 时，过氧化氢酶的合成量提高幅度最大，比对照时提高了约 11.2%；继续增加 H_2O_2 的加入量，由于 H_2O_2 的强氧化性，酶活会迅速降低，因此最佳的 H_2O_2 添加量为 0.6%。

2.4 菌株 SHT2 的酶学特性

2.4.1 酶的热稳定性

在前述优化的培养条件下，*Bacillus sp.* SHT2 的酶活能达到 196.9 U/mL。将培养所获得的菌体进行超声破碎处理得到过氧化氢酶液。将酶液在(30—70)℃分别保温 0.5 h、1 h、2 h、3 h，然后按照常规方法测定酶活力，以最初的酶活力作为 100%，结果表明该酶在 60℃以下比较稳定，在 30℃、40℃和 50℃分别保温 3 h 过氧化氢酶酶活分别还剩余 78.8%、79.61%和 68.5%，在 60℃保温 2 h 酶活还剩下 75.3%，温度在 70℃以上失活较快，70 ℃保温 1 h 酶活尚有 35.5%，保温(2—3) h 酶活几乎损失殆尽。

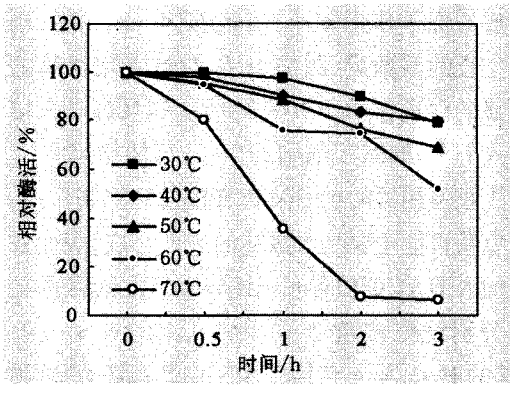

图 9 温度对酶稳定性的影响

2.4.2 酶的 pH 稳定性

将酶液与 pH 值为 4.0—8.0 的 Na_2HPO_4-柠檬酸缓冲液和 pH 值为 9.0 的甘氨酸-NaOH 缓冲液，室温(30℃)放置 12 h，按照常规方法测定酶活力。结果表明酶在 pH(4—7)的范围内是比较稳定的，且酶活损失较小。

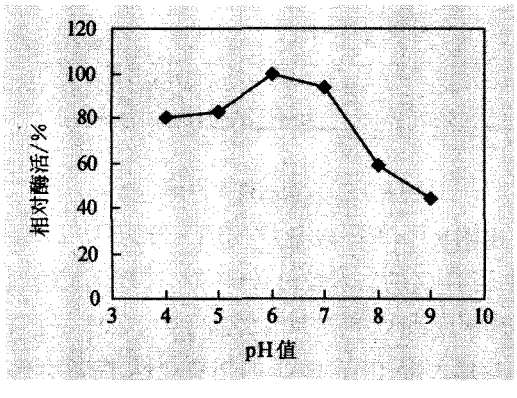

图 10 pH 对酶稳定性的影响

3 结论

本文筛选得到的一株产过氧化氢酶的 *Bacillus sp.* SHT2，该菌株具有生长迅速、酶活高的特点，在优化的发酵培养基条件下，即碳源为 10 g/L 的蔗糖，氮源为 10 g/L 的牛肉膏，酶活能达到 196.9 U/mL。通过酶学性质研究表明，该菌产生的过氧化氢酶具有良好的热稳定性和 pH 稳定性。因此，推测 *Bacillus sp.* SHT2 菌的过氧化氢酶将在工业上处理 H_2O_2 的过程中具有较好的应用潜力。

参 考 文 献

1 Trost E M, Fischer L. Minimization of by-product formation during D-amino acid oxidase catalyzed racemate resolution of D/L-amino acids. Journal of Molecular Catalysis, B: Enzymatic, 2002;19220: 189—195

2 Yoshimoto M, Miyazaki Y, Kudo Y, *et al.* Glucose oxidation catalyzed by liposomal glucose oxidase in the presence of catalase-containing liposomes. Biotechnol Prog, 2006;22 (3):704—709

3 Nakamura K, Watanabe M, Sasaki Y, *et al.* Purification and characterization of liver catalase in acatalasemic beagle dog: comparison with normal dog liver catalase. The International Journalof Biochemistry and Cell Biology, 2000;2 (1):89—98

4 Yumoto I , Ichihashi D , Iwata H , *et al.* Purification and characterization of a catalase from the facultatively psychrophilic bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1^T exhibiting high catalase activity. J Bacteriol, 2000;182(7):1903—1909

5 王凡强，王正祥，邵蔚蓝，等. 热稳定性过氧化氢酶工程菌株发酵条件的研究. 食品与发酵工业，2002;28(2):11—14

6 Gudelj M, Fruhwirth G O, Paar A, *et al.* A catalase-peroxidase from a newly isolated thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. with potential for the treatment of textile bleaching effluents. Extremophiles, 2001;5(6): 423—429

7 Kengen S W, Bikker F J, Hagen W R, *et al.* Characterization of a catalase-peroxidase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. Extremophiles, 2001;5(5):323—332

8 方 芳，李 寅. 一株嗜热子囊菌产生的碱性耐热过氧化氢酶及其应用潜力. 生物工程学报，2004;20(3):423—428

9 郭 勇，郑穗平. 酶在食品工业中的应用. 中国轻工业出版社，1996:186—194

10 William G W, Susan M B, Dale A P, *et al.* 16S ribosomal DNA

amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 1991; 173(2):697—703

11 李桂源, 钱　骏. 基于 WWW 的生物信息学应用指南. 长沙:中南大学出版社, 2004;194—202

Screening and Cultivation of a Thermal-stable Catalase Producing Strain

LIU Ling-zhi[1,2], CHANG Yan-hong[2], LUO Wei[3], XIONG Lian[1,2], XIAO Bao-qing[2], LUO Hui[1]

(Department of Biological Science and Technology[1], Department of Environmental Engineering[2], University of Science and Technology Beijing, Beijing 100008, P. R. China; Research and Development Center, China Tobacco Jiangxi Industrial Corporation[3], Nanchang 330096, P. R. China)

[**Abstract**] As one kind of oxidases, catalases can catalyse the decomposition of the cellular hydrogen-peroxide and thus is of important potential in the fields of food and dairy industry, environmental protection, paper pulp and paper making industry and textile industry. A thermophilic strain with high catalase activity designated SHT2 was isolated from the composting. The suitable cultivation temperature, pH and NaCl concentration for this bacterium is respectively 55℃, 7.0 and 1.5%. Based on the analysis of the 16S rDNA sequence, this strain was identified as *Bacillus sp* SHT2. Through optimization of C, N source in substrate, the catalase activity of the *Bacillus sp.* SHT2 reached 196.9 U/mL. The optimum conditions of this catalase are at temperature 50℃ and pH 7.0 respectively. The catalase is stable below 60℃ and at pH range of 4—7.

[**Key words**] catalase　　thermophiles　　screening

(上接第 862 页)

Synthesis and Antibacterial Activity Study of 2-Hydroxy-1-naphthaldehyde Thiosemicarbazone and Metal Complexes

HE Bing-jing, WU Bin

(School of Pharmaceutical and Chemical Engineering, Taizhou University, Linhai 317000, P. R. China)

[**Abstract**] Two new complexes of metal ions (Cu^{2+}, Ni^{2+}) with Schiff base 2-hydroxy-1-naphthaldehyde thiosemicarbazone are synthesized and characterized by IR, ^1H NMR. The antibacterial activities of schiff base and corresponding complexes are measured.

[**Key words**] 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde thiosemicarbazone　　metal complexes　　Schiff base