

# 一株海洋过氧化氢酶高产菌的鉴定 及产酶条件优化\*

陈世建<sup>1,2</sup> 王 伟<sup>1</sup> 孙 谧<sup>1①</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海洋酶工程重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

**摘要** 对来自青岛近海海域底泥的一株产过氧化氢酶菌株 YS0810 进行形态学观察、16S rDNA 序列同源性分析及生理生化特性的鉴定,在 250 ml 摇瓶中进行发酵产酶条件优化。初步确定该菌属于不动杆菌属 *Acinetobacter*。发酵培养的最佳碳、氮源分别为蔗糖 20 g/L 和蛋白胨 15 g/L,无机盐  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、NaCl、 $KH_2PO_4$  最佳浓度分别为 0.9、5.0 和 1.0 g/L; 菌株在培养基起始 pH=7.0、4%接种量、50 ml 装液量和 25℃的条件下发酵 24 h 获得较高的酶产量。在最佳培养条件下酶产量为 2469 U/ml,是优化前的 5 倍。

**关键词** 海洋微生物;过氧化氢酶;不动杆菌属;鉴定;培养条件优化

中图分类号 S932 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0103-07

微生物过氧化氢酶(EC 1.11.1.6),又称触酶(Catalase, CAT),普遍存在于好氧微生物体内。作为一种酶类清除剂,其主要功能是催化过氧化氢分解成氧气和水,防止体内羟基自由基的过量积累。基于其高效的催化活性,现已被广泛应用于临床分析、食品加工、纺织、造纸、医械器具的消毒及抗肿瘤药物的研究。近年来,过氧化氢酶由于其在纺织工业中的应用而倍受关注。多数的过氧化氢酶的应用是在碱性、高温条件下进行的,而商品化的过氧化氢酶很少具有这一特性,因而限制了过氧化氢酶更多的推广应用,仍需开发更适高温和碱性的过氧化氢酶(张东旭等, 2010)。

目前,市售的过氧化氢酶主要来源于动物组织提取和部分微生物发酵,其生产主要由几家外企和合资公司所控制。尽管国内外已有许多关于微生物过氧化氢酶的报道(张东旭等, 2010; 赵志军等, 2007; Paar *et al*, 2001; Wang *et al*, 2008; Zeng *et al*, 2011), 国内目前商品过氧化氢酶以动植物源和微生物发酵为主,

其研究主要集中在菌株的筛选,培养基和培养条件的优化。张增祥等(2010)从保存的水样中筛选出一株过氧化氢酶高产菌株,酶活性达 1356.2 U/ml。洪海军等(2004)通过对溶壁微球菌培养基和发酵工艺的优化,过氧化氢酶生产水平由 290 U/ml 提高到 1100 U/ml。陆挺等(2001)采用摇瓶发酵法优化溶壁微球菌的产过氧化氢酶活性,发酵 12 h 获得酶浓度 292 U/ml。国内微生物过氧化氢酶仍处于应用开发阶段,目前还没有高产过氧化氢酶菌株在规模化生产中获得广泛应用,开发新型、性质优良的微生物过氧化氢酶迫在眉睫。随着人们对微生物过氧化氢酶的日益关注,以及研究技术和方法的不断完善成熟,微生物过氧化氢酶必将成为过氧化氢酶工业化发展的重要方向,过氧化氢酶产生菌的筛选及应用研究应持续开展。

本研究以实验前期已筛选获得的一株过氧化氢酶产生菌为出发菌,对其进行鉴定,并进一步研究其发酵产酶工艺,为后续研究开发奠定基础。

\* 国家“十二五”863 项目(2011AA090703)和国家自然科学基金(41006119)共同资助。陈世建, E-mail: csjworld123@126.com

通讯作者: 孙 谧, 研究员, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-03-19, 收修改稿日期: 2014-02-22

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养基

2011年3月从山东青岛近海采集的多份活性底泥样本中分离微生物菌种并由本实验室保存。

活化培养基：蛋白胨 1%、牛肉膏 0.3%、NaCl 0.5%，pH=7.0；基础发酵培养基：蛋白胨 1%、牛肉膏 0.3%、NaCl 0.5%，pH=7.0。固体培养基添加 2% 琼脂粉。

### 1.2 菌株的鉴定

**1.2.1 形态特征观察及生理生化试验** 将活化后的菌株适当稀释，涂布于含基础培养基的平板上，30℃倒置培养，每隔一定时间进行一次形态学观察，待培养至 24 h，插片法(姜云等，2007)制备样品后，送中国科学院海洋研究所进行扫描电镜观察并拍照。生理生化实验按照文献(东秀珠等，2001；Bouvet *et al.*, 1986)进行。

#### 1.2.2 16S rDNA 基因扩增及系统发育树的构建

细菌总 DNA 的提取及 16S rDNA 分析参考文献(Rousseaux *et al.*, 2001)进行。PCR 扩增采用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAG-3')和 1492R(5'-CGGCTACCTTGTACGAC-3')。PCR 反应条件：95℃ 5 min；95℃ 40 s，55℃ 1 min，72℃ 1.5 min，循环次数 30；最后 72℃ 10 min。扩增产物用琼脂糖电泳鉴定，获得一条 1.5 kb 的条带。PCR 产物送生工生物工程(上海)有限公司完成纯化与测序工作。在 EzBioCloud 网站的 EzTaxon 数据库中检索与 PCR 测序结果相似度较高的菌株(Chun *et al.*, 2007)，下载对应菌株的 16S rDNA 序列，用 MEGA 5.1 软件按照最大似然法(Maximum-likelihood method)构建系统发育树(Tamura *et al.*, 2011)。

### 1.3 培养方法

在 250 ml 三角瓶中进行单因素实验，分别考察氮源、碳源、无机盐、接种量、装液量、培养基起始 pH、发酵温度和发酵时间对发酵产酶的影响。

### 1.4 酶活的测定

取适量的发酵液，10000 r/min 离心 10 min，沉淀重悬于预冷的 pH=7.0 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中，冰浴中超声波间歇破碎 10 min，镜检破碎效果，10000 r/min 离心 10 min，上清液即为胞内酶活(曾化伟等，2011)。酶活的测定在 25℃ 条件下进行，采用紫外分光光度法(Beers *et al.*, 1952)。反应体系为 50 mmol/L

pH 7.0 的磷酸钾缓冲液，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度 20 mmol/L。活性以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 240 nm 处分解速率计算。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 摩尔吸光系数为 43.6 L/(mol·cm)。

## 2 结果与分析

### 2.1 高产过氧化氢酶菌株的鉴定

**2.1.1 菌株 YS0810 的形态特征** 菌株 YS0810 为革兰氏阴性杆菌，无芽孢，无运动性，平板培养 24 h 形成 2-3 mm 乳白色的菌落，表面光滑，边缘规则，有粘性，易挑起。从该菌扫描电镜图(图 1)可以明显看出，该菌为短杆菌，菌体体型较小，长度在 1 μm 左右，宽度在 0.5 μm 左右。

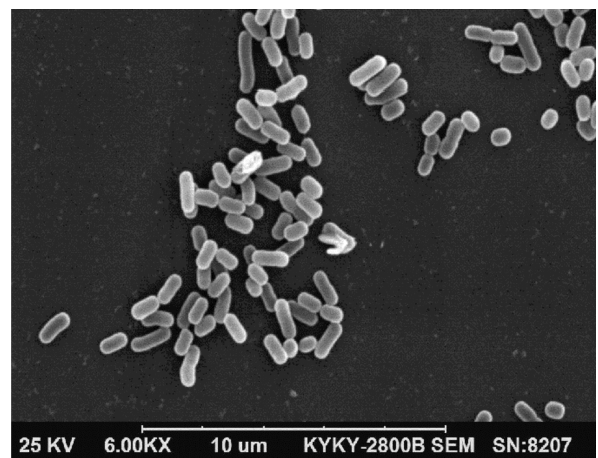


图 1 扫描电子显微镜下的菌株 YS0810

Fig.1 Scanning electron microscope photograph of strain YS0810

**2.1.2 系统发育树** PCR 产物测序获得菌株 YS0810 的 16S rDNA 部分序列，长度为 1443 bp，GenBank 登录号为 JX221556。应用 BLAST 程序与 EzTaxon 数据库(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)中已有细菌的 16S rDNA 序列进行相似性比较，发现菌株 YS0810 与溶血不动杆菌 *Acinetobacter haemolyticus* 具有很高的相似性(98.68%)，选取了相似性较高的 16 株菌，以 *Pseudomonas reinekei* Mt-1<sup>T</sup>(AM293565)作为属外细菌，应用 MEGA 5.1 软件进行系统发育树分析(图 2)，结合形态学观察结果，可初步确定该菌属于不动杆菌属。

**2.1.3 菌株 YS0810 的生理生化特征** 由表 1 结果显示，菌株 YS0810 与溶血不动杆菌的分类学特征不完全一致，结合菌株的形态学观察和 16S rDNA 序列分析结果，可确定菌株 YS0810 属于不动杆菌属。

### 2.2 产酶条件初步研究

#### 2.2.1 氮源对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

从基础发酵培养基出发，研究不同氮源(10 g/L)

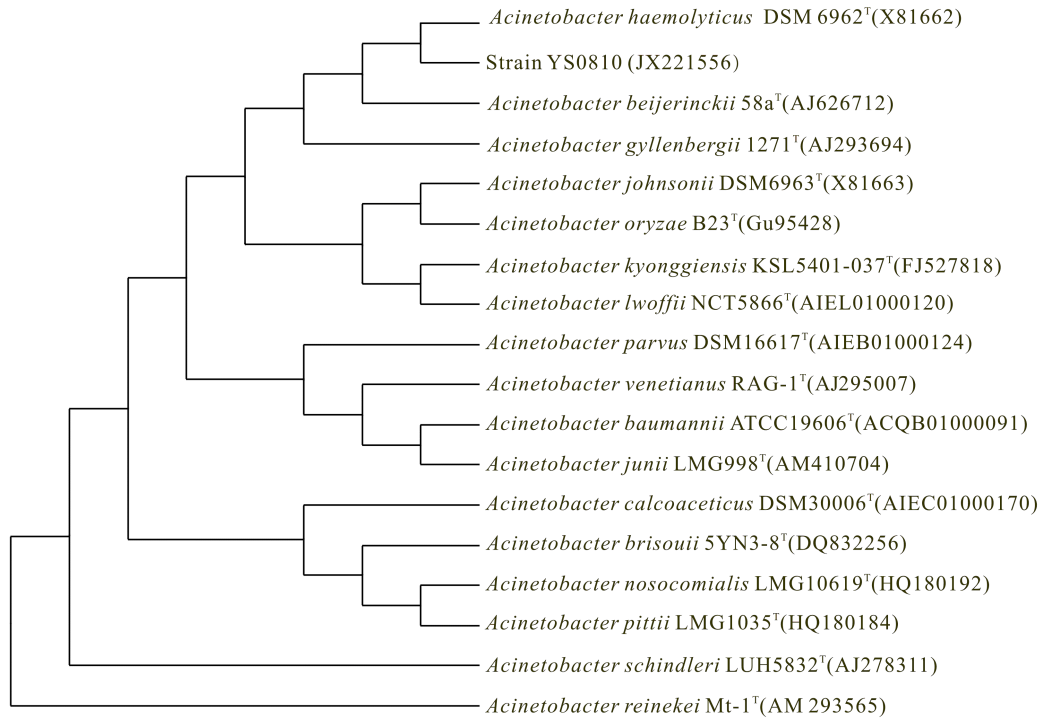


图 2 菌株 YS0810 16S rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA sequence of strain YS0810 and other species within the *Acinetobacter* genus

表 1 菌株 YS0810 与不动杆菌属各个种的分类学特征比较(东秀珠等, 2001)

Tab.1 Comparison of taxonomic characteristics between strain YS0810 and *Acinetobacter* sp.

特性 Characteristics	鲍氏不动杆菌 <i>A. baumannii</i>	乙酸钙不动杆菌 <i>A. calcoaceticus</i>	溶血不动杆菌 <i>A. haemolyticus</i>	约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i>	琼氏不动杆菌 <i>A. junii</i>	鲁氏不动杆菌 <i>A. lwoffii</i>	YS0810
生长温度 44℃	+	-	-	-	-	-	+
Growth temperature 41℃	+	-	-	-	90	-	+
37℃	+	+	+	-	+	+	+
明胶水解 Gelatin hydrolysis	-	-	96	-	-	-	-
溶血性 Hemolysis	-	-	+	-	-	-	-
柠檬酸盐 Citrate test	+	+	91	+	82	-	+
葡萄糖产酸 Acid from glucose	95	+	52	-	-	6	+
利用 乳酸钠 Utilization Sodium lactate	+	+	-	+	+	+	+
L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	87	+	-	-	-	-	+
L-组氨酸 L-Histidine	98	+	96	-	+	ND	+
D-苹果酸钠 D-Malate	98	-	96	22	+	76	+
L-天冬氨酸 L-Aspartate	+	+	64	61	40	-	-
L-亮氨酸 L-Leucine	97	38	96	-	11	-	+

续表 1  
Continued Tab.1

特性 Characteristics	鲍氏不动杆菌 <i>A. baumannii</i>	乙酸钙不动杆菌 <i>A. calcoaceticus</i>	溶血不动杆菌 <i>A. haemolytius</i>	约氏不动杆菌 <i>A. johnsonii</i>	琼氏不动杆菌 <i>A. junii</i>	鲁氏不动杆菌 <i>A. hwoffii</i>	YS0810
L-酪氨酸 L-Tyrosine	+	+	5	70	60	3	+
β-丙氨酸 β-Alanine	95	+	-	-	-	-	-

+, 阳性; -, 阴性。数值为阳性百分比; ND, 未测

+, positive; -, negative. The numbers are percentages of positive strains; ND, not determined

对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响, 结果如图 3A 所示。其发酵产酶的最佳氮源为蛋白胨, 随后, 进行了不同浓度的蛋白胨对产酶的影响(图 3B), 当蛋白胨在较低浓度(15 g/L)时, 相对酶活力最高。

2.2.2 碳源对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

在氮源为蛋白胨(15 g/L)的基础上, 研究不同碳源(10 g/L)对产酶的影响。由图 4A 可以看出, 在相同条件下, 蔗糖作为碳源时, 产酶效果最好。其后的浓度单因素结果(图 4B)显示, 当蔗糖浓度为 20 g/L 时, 获得较高的酶活。

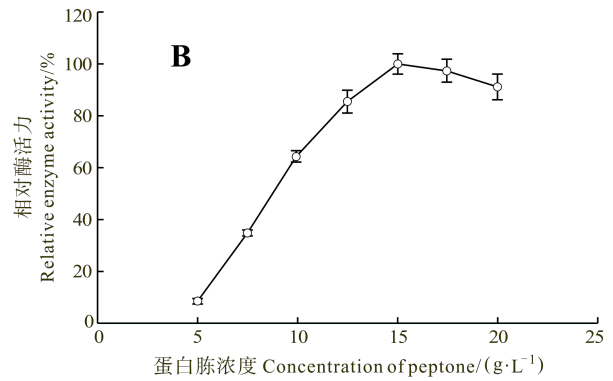
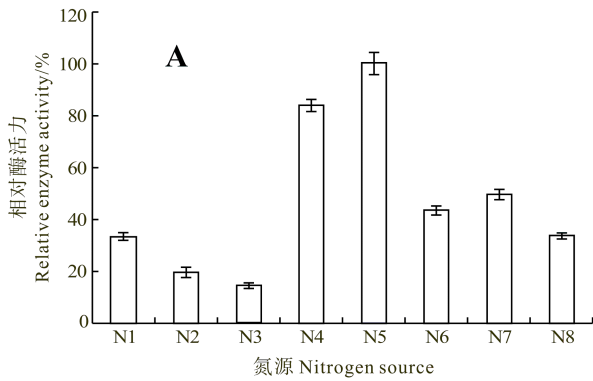


图 3 不同氮源对产酶的影响

Fig.3 Effects of different nitrogen sources on the production of catalase

N1: 酵母抽提物, N2: 牛肉膏, N3: 尿素, N4: 玉米浆, N5: 蛋白胨, N6: KNO<sub>3</sub>, N7: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N8: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
N1: yeast extract, N2: beef extract, N3: urea, N4: corn paste, N5: peptone, N6:KNO<sub>3</sub>, N7: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N8: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

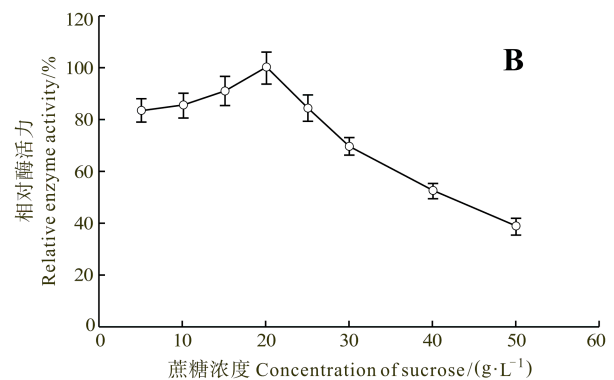
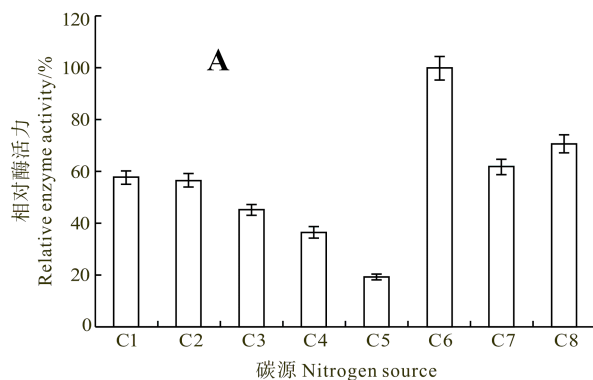


图 4 不同碳源对产酶的影响

Fig.4 Effects of different carbon sources on the production of catalase

C1: 麦芽糖, C2: 可溶性淀粉, C3: 葡萄糖, C4: β-环糊精, C5: 乙醇, C6: 蔗糖, C7: 甘油, C8: 麦麸  
C1: maltose, C2: soluble starch, C3: glucose, C4: β-cyclodextrin, C5: ethanol, C6: sucrose, C7: glycerol, C8: bran

### 2.2.3 无机盐对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

主要考察  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $KH_2PO_4$ 、 $NaCl$  不同添加量对产酶量的影响。由图 5-图 7 可知,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $KH_2PO_4$ 、 $NaCl$  分别在添加量为 0.9、1.0、5.0 g/L 时, YS0810 产酶量达到最高; 高浓度  $NaCl$  对 YS0810 产酶具有抑制作用。

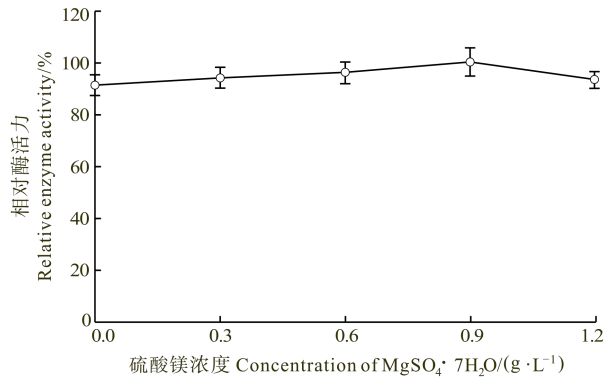


图 5 硫酸镁浓度对产酶的影响

Fig.5 Effects of  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  on the production of catalase

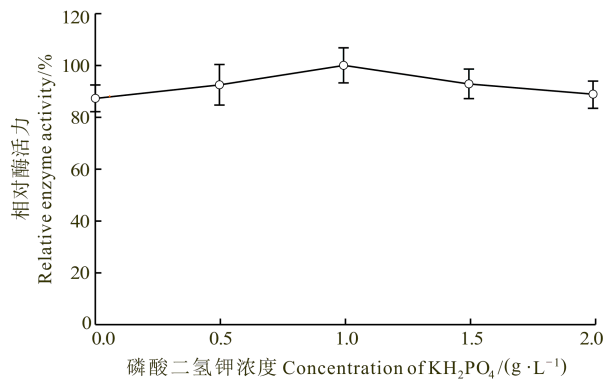


图 6 磷酸二氢钾浓度对产酶的影响

Fig.6 Effects of  $KH_2PO_4$  on the production of catalase

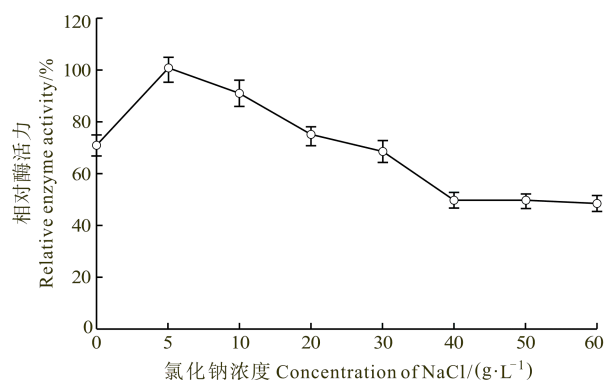


图 7 氯化钠浓度对产酶的影响

Fig.7 Effects of  $NaCl$  on the production of catalase

2.2.4 接种量对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响  
在 250 ml 的发酵培养基中分别按照体积分数 2%、

4%、6%、8%、10%、12% 接入种子培养液, 酶产量在接种量 2%–4% 之间呈上升趋势, 在 4%–12% 时呈现下降趋势, 由图 8 可知, 发酵最佳接种量为 4%。

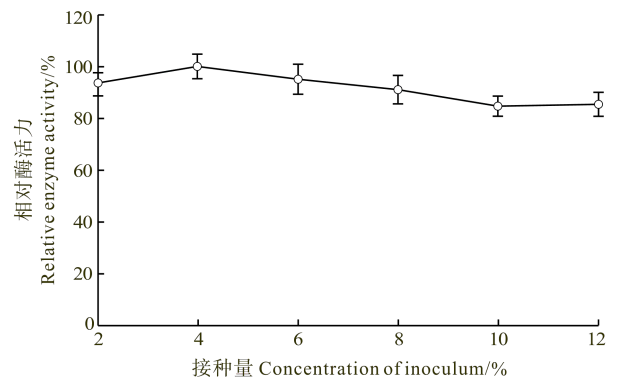


图 8 接种量对产酶的影响

Fig.8 Effects of amount of inoculum on the production of catalase

### 2.2.5 装液量对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

在 250 ml 三角瓶中考察不同装液量对 YS0810 产酶的影响。由图 9 可知, 装液量对酶产量的影响相对较小。在较低装液量水平( 50 ml), 酶产量相对稳定; 在较高的装液量水平时, 酶产量减少, 这主要是由于溶氧较低、供氧不足而造成的。

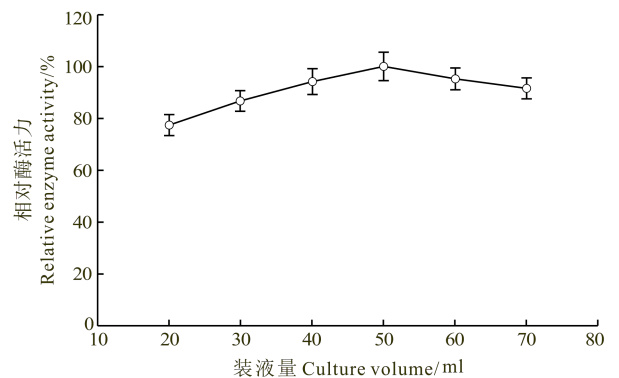


图 9 装液量对产酶的影响

Fig.9 Effects of culture volume on the production of catalase

### 2.2.6 起始 pH 对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

其他条件不变, 考察发酵培养基的起始 pH 对菌株产酶的影响。由图 10 可知, 起始 pH 为 7.0 时, 酶产量相对较高。

### 2.2.7 发酵温度对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

考察不同温度(25℃、30℃、33℃、37℃和 40℃)对产酶的影响, 从图 11 可以看出, 该菌在相对较低温度(25℃)下, 产酶较高; 较高温度条件下(>33℃), 产酶量明显下降。这与菌株 YS0810 来自海洋环境并长期适应低温环境有关。

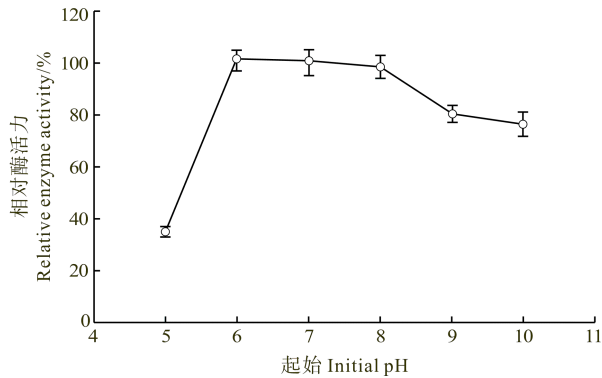


图 10 起始 pH 对产酶的影响

Fig.10 Effects of initial pH on the production of catalase

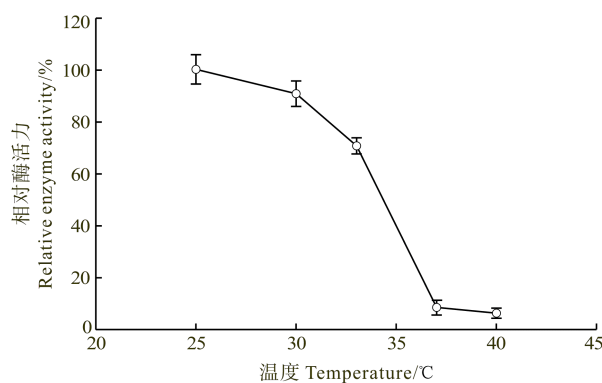


图 11 发酵温度对产酶的影响

Fig.11 Effects of temperature on the production of catalase

### 2.2.8 发酵时间对菌株 YS0810 产过氧化氢酶的影响

从种子培养液中按 2%(v/v)接种入 50 ml/250 ml 三角瓶中, 25°C、200 r/min 培养, 每 4 h 取样测定过氧化氢酶活力。结果如图 12 所示, YS0810 在培养 24 h 后, 过氧化氢酶产量达到最大。因此, 在实验条件下, YS0810 最佳培养时间为 24 h。与此同时, 可以看到 YS0810 在培养 24–48 h 内活性稳定、产量较高, 培养 48 h 后酶产量为 24 h 的 65%。

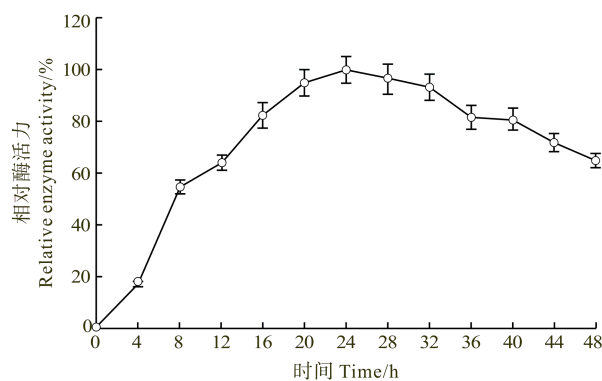


图 12 发酵时间对产酶的影响

Fig.12 Effects of culturing time on the production of catalase

### 3 结语

本研究对已筛选的野生菌菌株 YS0810 进行鉴定, 经 16S rDNA 分析和菌株的部分生理生化实验, 可确定其为不动杆菌属 *Acinetobacter*。通过摇瓶发酵对其培养基和培养条件的考察, 确定了发酵培养的最佳碳氮源蔗糖和蛋白胨的浓度分别为 20 g/L 和 15 g/L, 无机盐  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、NaCl 和  $KH_2PO_4$  最适浓度分别为 0.9、5.0 和 1.0 g/L; 在培养基起始 pH=7.0、4%接种量、50 ml 装液量和 25°C 的条件下发酵 24 h 获得较高的酶产量。在最适培养条件下, 获得的酶产量为 2469 U/ml, 与未优化的 560 U/ml 相比, 优化效果显著。目前实验室正在进行 YS0810 过氧化氢酶的产酶胁迫诱导、分离纯化、序列分析和酶学性质的研究工作。从现有的研究结果看, 该酶具有在工业中获得应用的潜力, 有进一步研究的价值。这也为下一步该酶的异源表达(为获得高产、耐受高温、高 pH 的酶)、产酶过程数学模型的建立和该酶的放大生产及利用奠定基础。

### 参 考 文 献

- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 2001. 北京: 科学出版社, 188–189
- 张东旭, 堵国成, 陈坚. 微生物过氧化氢酶的发酵生产及其在纺织工业的应用. 生物工程学报, 2010, 26(11): 1473–1481
- 张增祥, 王伟, 郝建华, 等. 产过氧化氢酶菌株 CE-1 的筛选与鉴定. 海洋科学, 2010, 34(11): 54–58
- 陆挺, 汪成富, 戴英, 等. 过氧化氢酶发酵性能的研究. 苏州大学学报(自然科学), 2001, (3): 95–97
- 赵志军, 华兆哲, 刘登如, 等. 碱性过氧化氢酶高产菌的筛选、鉴定及发酵条件优化. 微生物学通报, 2007, 34(4): 667–671
- 姜云, 黄丽丽, 陈长卿, 等. 一株拮抗番茄叶霉病菌的放线菌筛选、鉴定及发酵条件研究. 微生物学报, 2007, 47(4): 622–627
- 洪海军, 许赣荣. 产过氧化氢酶菌株培养条件的优化. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(6): 85–89
- 曾化伟, 张峰, 蔡宇杰, 等. 菌株 *Serratia marcescens* SYBC08 产过氧化氢酶液态发酵工艺的优化及酶性质研究. 食品与生物技术学报, 2011, 30(3): 410–416
- Beers RJ, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem, 1952, 195(1): 133–140
- Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter*

- lwoffii*. Int J Syst Bacteriol, 1986, 36(2): 228–240
- Chun J, Lee JH, Jung Y, *et al.* EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(10): 2259–2261
- Paar A, Costa S, Tzanov T, *et al.* Thermo-alkali-stable catalases from newly isolated *Bacillus* sp. for the treatment and recycling of textile bleaching effluents. J Biotechnol, 2001, 89(2–3): 147–153
- Rousseaux S, Hartmann A, Soulas G. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 36(2–3): 211–222
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731–2739
- Wang W, Sun M, Liu W, *et al.* Purification and characterization of a psychrophilic catalase from Antarctic *Bacillus*. Can J Microbiol, 2008, 54(10): 823–828
- Zeng H, Cai Y, Liao X, *et al.* *Serratia marcescens* SYBC08 catalase isolated from sludge containing hydrogen peroxide shows increased catalase production by regulation of carbon metabolism. Eng Life Sci, 2011, 11(1): 37–43

(编辑 冯小花)

## Identification of a Marine Bacterium Producing High-Level Catalase and Optimization of Its Fermentation Conditions

CHEN Shijian<sup>1,2</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, SUN Mi<sup>1</sup>①

- (1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;  
2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Catalases are a type of enzymes that can effectively decompose hydrogen peroxide into water and oxygen. Because of their ubiquitous distribution in all aerobic microorganisms, plants and animals, they are widely used in food, pharmaceutical, chemical industries and environmental protection. In this study we examined the bacterial strain YS0810 collected from the sediment in Yellow Sea that produces catalase at a high level. We determined the growth conditions of this strain which is optimal for the catalase production. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of this strain was applied to determine its taxonomic rank. The conventional morphological, physiological and biochemical methods of taxonomy were also applied to differentiate the YS0810 from its phylogenetic relatives. We used 250 ml shake flasks to carry out the single factor experiments to identify the important growth factors for the strain YS0810. The phylogenetic tree indicated that strain YS0810 belonged to the genus *Acinetobacter*, with the highest sequence similarity to *Acinetobacter haemolyticus* DSM 6962<sup>T</sup> (98.7%). However, YS0810 was not a strain of *A. haemolyticus*. This was consistent with the results of the comparison between YS0810 and other *Acinetobacter* species in terms of their morphological, physiological and biochemical characteristics. Peptone and sucrose were determined as the optimal nitrogen and carbon sources from several candidates. Our experimental results indicated that the maximum yield of the catalase was generated by YS0810 under the conditions shown below: peptone 15 g/L, sucrose 20 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.9 g/L, NaCl 5.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L, broth content at 50 ml, the inoculum at 4%, initial pH 7.0, the temperature at 25°C and the culture time of 24 h. The verification experiment carried out in the optimal conditions above showed that the highest catalase activity was 2469 U/ml, which is five-time higher than before the optimization. In conclusion, the yield of catalase was markedly raised in the optimized fermentation conditions.

**Key words** Marine microorganism; Catalase; *Acinetobacter*; Identification; Culture optimization