

碱性过氧化氢酶高产菌的筛选、鉴定及发酵条件优化*

赵志军^{1,2} 华兆哲^{1,2,*} 刘登如¹ 堵国成^{1,2} 陈 坚^{1,2}

(江南大学生物工程学院 无锡 214036) (江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要 从纺织厂的车间污水分离获得菌株 WSHDZ-01,其产过氧化氢酶酶活为 600 U/mL,酶活的 pH 范围为 5.0~12.0。根据对该过氧化氢酶生产菌的形态和生理生化特征的分析 and 16S rDNA 序列分析,鉴定该菌为枯草芽孢杆菌。通过对该菌株发酵培养基中碳氮源的优化,其最佳碳源为 10 g/L 的葡萄糖,氮源为 5 g/L 的 NaNO₃,在此条件下产酶达 3258 U/mL。此外,该菌株所产过氧化氢酶的最适反应 pH 为 11.0,最适温度为 55℃,在 pH11.0 和 50℃下保持 15min 后,剩余酶活仍达 98% 以上。

关键词 枯草杆菌,筛选,鉴定,发酵优化,酶学性质

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0667-05

Screening, Identification and Fermentation Optimization of a Alkaline Catalase-Producing Strain*

ZHAO Zhi-Jun^{1,2} HUA Zhao-Zhe^{1,2,*} LIU Deng-Ru² DU Guo-Cheng^{1,2} CHEN Jian^{1,2}

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education in Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract A strain named as WSHDZ-01 with high capability of producing alkaline catalase(CAT) was isolated from the wastewater discharged from a textile factory. The catalase from this strain was active in the range of pH 5.0-pH12.0, and the highest enzyme activity was observed as 600 U/mL at pH 7.0. According to the physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence of WSHDZ-01, the strain was identified as *Bacillus subtilis*. The optimal carbon source and nitrogen source were also determined as 10 g/L glucose and 5 g/L NaNO₃, respectively. The highest enzyme activity of 3258 U/mL was achieved after the optimization. The resultant catalase reacted best at 55℃ and pH 11.0, and had activities > 98% after 15 min maintenance under 50℃ and pH 11.0.

Key words :*Bacillus*, Screening, Identification, Fermentation optimization, Enzymatic properties

过氧化氢酶(Catalase,简称CAT)是一种能够高效催化分解过氧化氢的酶,广泛用于食品消毒、临床分析、医学诊断以及纺织、造纸、制浆等工业。随着环保意识的加强,在纺织染整工艺中采用酶替代传统的强碱高温工艺对棉织物进行前处理已得到了广泛的应用。CAT在棉织物前处理过程中的主要作用是去除织物漂白废液中残余的H₂O₂,以消除对后续染色工序的影响^[1~5]。

CAT来源丰富,几乎存在于所有好氧生物中,来自动物脏器以及一些微生物(如溶壁微球菌、球形红假单孢菌、大肠杆菌、芽孢杆菌、黑曲霉等)的CAT均有报道^[6~14]。目前,国外文献中已经出现了

耐碱、耐热、CAT酶活较高的菌株^[13~14],但国内很少有报道。江南大学正在进行工业化放大研究的嗜热子囊菌所产过氧化氢酶虽然在耐碱和耐高温方面有了很大的改善,但仍存在着发酵周期长(>7d)的问题^[15~16]。本研究以筛选新的适用于纺织清洁生产工艺的高产过氧化氢酶菌株为目的,进行了菌株筛选、鉴定、发酵优化以及应用酶学性质方面的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 从无锡市纺织企业的车间污水及污泥中采样40余份,从中分离微生物菌种。

* 国家高技术研究发展计划“863”项目资助(No. 2003AA322050)

** 通讯作者 Tel: 0510-85881811, E-mail: huazz@sytu.edu.cn

收稿日期 2006-10-30, 修回日期 2007-02-12

1.1.2 培养基 :菌种分离和筛选培养基 :麦芽汁培养基(g/L) 糖度为 6°P 的天然麦芽汁 ,pH 7.5。基本发酵培养基 :葡萄糖 15 g ,蛋白胨 10 g ,酵母膏 5 g , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g , Na_2HPO_4 9.52g , KH_2PO_4 0.907g , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g ,定容至 1L ,pH 7.5。

1.2 过氧化氢酶产生菌的筛选方法

取 10g 水样或泥样到 4 种初筛培养基(肉汁培养基、蔗糖硝酸盐培养基、麦芽汁培养基、马铃薯培养基) 中增殖培养 20 h 后 ,稀释涂布于各种固体初筛培养基平板形成单菌落 ,点滴 5% 的 H_2O_2 于单菌落及周围 ,根据产气泡的强度进行初筛。选择产生气泡强度大的菌落进行相应类别筛选培养基的摇瓶发酵复筛 ,测定发酵液过氧化氢酶活力。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面及平板培养 37℃ 培养 30 h。

1.3.2 复筛发酵培养 :筛选培养基 70mL 盛于 250mL 三角瓶中 ,接种后在旋转式摇床上 37℃ ,转速 200 r/min ,发酵培养 35 h。

1.3.3 发酵条件研究 :基本发酵培养基 50mL 盛于 250mL 三角瓶中 ,按 6% 的接种量接种种子培养基后在旋转式摇床上 37℃ 200r/min 培养 35 h。

1.4 菌种鉴定

1.4.1 细菌染色体 DNA 的提取 :参照文献 [17]。

1.4.2 引物 :细菌 16S rDNA 通用引物 ,序列如下 :引物 BSF8/ : 5' ACTCCTACGGGAGG 3' ,引物 BSR1541/20 5' CATCTCACGACACG 3'。

1.4.3 16S rDNA 基因的 PCR 扩增和测序 :PCR 反应体系为 :50 μL 反应体系中加入 ddH₂O 34.5 μL ,10 \times PCR 缓冲液 5 μL ,2.5mmol/L dNTP 4 μL ,0.5pmol/ μL 引物 A 和 B 各 1 μL ,模板 DNA 1 μL ,Pyrobest™ (5 U/ μL) 0.5 μL 。扩增实验 PCR 按下述反应条件进行 :94℃ 5min ,94℃ 60s ,50℃ 90s ,72℃ 60s 循环 30 次 ;72℃ 10min。扩增产物用琼脂糖电泳鉴定 ,证明已扩增到一条 0.8kb 左右的扩增片段 ,扩增片段用小量胶回收纯化试剂盒(上海华舜生物工程有限公司) 进行纯化回收 ,上海华诺生物技术有限公司进行测序。

1.4.4 16S rDNA 基因序列比较分析 :将获得的菌株 WSHDZ-01 的 16S rDNA 基因序列 ,通过 Blast 程序在 GenBank 中与已经收录的核酸序列进行搜索比对 ,比较该菌株与已知细菌相应序列的相似程度。

1.4.5 生理生化实验 :按照伯杰氏细菌鉴定手册 (第八版) 方法进行。

1.5 生物量的测定

取 40mL 发酵液于 4000r/min、4℃ 下离心 10min ,收集湿菌体 ,用蒸馏水洗涤 1 次后 ,置 105℃ 下恒温干燥至恒重 ,用称重法测定生物量。

1.6 酶液样品的制备

取一定量发酵液 4000 r/min 离心 10 min ,上清液作为胞外过氧化氢酶测定的样品 ,菌泥以 50mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液(pH 7.0)洗涤 1 次 ,以适量相同的缓冲液重悬后冰浴预冷 ;超声波破碎 10min ,镜检破碎效果 ;7000 r/min 离心 15 min ,上清液即为胞内过氧化氢酶测定样品。

1.7 酶活测定

采用分光光度法在 37℃ 测定^[15,18]。

1.8 酶的初步纯化

取粗酶液 20 mL ,加入浓度为 42% 的乙醇进行预沉淀 ,取上清液 ;调整乙醇的浓度至 70% 振荡数分钟 ,4500r/min 离心 10 min 去上清液 ;将沉淀溶于 pH 7 的磷酸盐缓冲液中用于酶学性质的研究。

1.9 酶学性质研究

1.9.1 最适 pH 及 pH 稳定性 :经初步纯化的过氧化氢酶在不同 pH(pH3.0 ~ pH12.0)缓冲液^[19] 中进行酶促反应以测定其最适 pH ,由于过氧化氢酶催化专一性很强 ,在纺织工业中 CAT 酶的处理时间仅为 8min ~ 20min^[5] ,因此将酶液在不同 pH 值的缓冲液中于 37℃ 下分别处理 15min 和 30min ,在 37℃、pH 7.0、0.1mol/L 的 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液条件下测定酶活性以研究酶的 pH 稳定性。

1.9.2 酶反应最适温度及热稳定性 :最适温度的测定在 pH7.0、0.1mol/L 的 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲体系及不同温度(37℃ ~ 70℃) 下进行酶促反应。耐热性测定为在不同温度(40℃ ~ 80℃) 下将酶液分别处理 30min ,再进行酶活性测定。

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选

从各纺织厂车间附近采集污水和活性污泥 40 余份 ,通过初筛发现在近 2000 个菌株中有 200 多株能产过氧化氢酶 ,挑取气泡产生迅速且持久的 140 个菌株进行摇瓶发酵复筛 ,经反复复筛得到 45 株

产酶较稳定的菌株,其中 WSHDZ-01 菌株产酶最高且稳定。该菌株发酵培养 35 h 后,总酶活达到 600 U/mL,其中胞内酶活约为 400U/mL。最后选取 WSHDZ-01 菌株作为下一步研究的菌株,且由于胞内酶活和胞外酶活均占有总酶活一定的比例,因此在考察发酵条件优化时,统一考察总酶活的变化。

2.2 菌株 WSHDZ-01 的鉴定

2.2.1 菌株 WSHDZ-01 的形态特征:革兰氏阳性短杆状,运动,有芽孢,孢子圆形或近圆形,菌落圆形,有褶皱,乳白色,生长后期产酱黄色素,其扫描电镜照片见图 1。

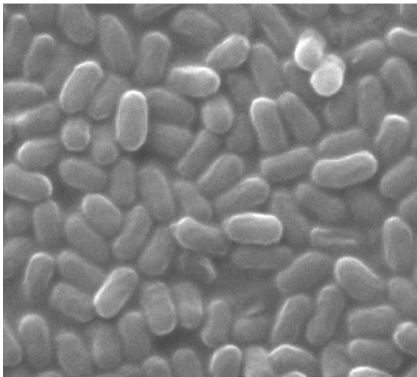


图 1 菌株 WSHDZ-01 的扫描电镜照片(10000×)

2.2.2 菌株 WSHDZ-01 的 16S rDNA 基因序列比较分析:PCR 扩增产物测序后,得到该菌株长度为 726bp 的 16S rDNA 序列。通过比较,该菌株与枯草芽孢杆菌模式株 168 的 16S rDNA 序列完全一致。

2.2.3 菌株 WSHDZ-01 的生理生化实验结果:将该菌株的生理生化实验结果和 *B. subtilis* 的生理生化特征进行比较,结果如表 1 所示。根据 16S rDNA 序列分析和生理生化实验结果,确定菌株 WSHDZ-01 属于芽孢杆菌属中的 *B. subtilis*。

表 1 WSHDZ-01 菌株的生理生化特性

Characteristics	WSHDZ-01	<i>B. subtilis</i> ^[20]
Gram staining	+	+
Anaerobic fermentation	-	-
Temperature		
Maximum	65℃~75℃	45℃~55℃
Minimum	5℃~15℃	5℃~20℃
NO ₃ ⁻ →NO ₂ ⁻	+	+
VP	+	+
Gelatine hydrolysis	+	+
Hydrolysis of starch	+	+
Indole production	-	-
Citrate	+	+

+ Positive reaction; - Negative reaction;

2.3 菌株 WSHDZ-01 产生碱性过氧化氢酶的条件

2.3.1 不同碳源对产酶的影响:在总碳摩尔数相同(以 15 g/L 的葡萄糖为基准)的条件下,在产酶基础培养基中改用了不同碳源,考察不同碳源对菌株 WSHDZ-01 产 CAT 的影响。由图 2 的结果可见,葡萄糖作为碳源最有利于产酶,总酶活最高可达 764U/mL。

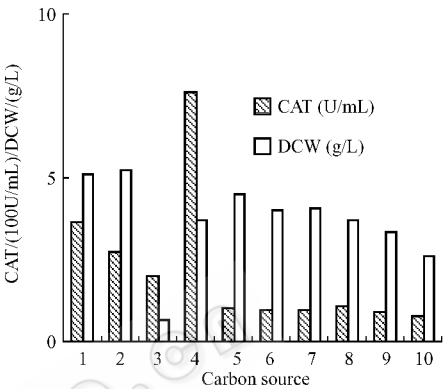


图 2 不同碳源对菌体生长和产酶的影响

1 lactose, 2 maltose, 3 ethanol, 4 glucose, 5 sucrose, 6 dextrin, 7 soluble starch, 8 corn starch, 9 glycerol, 10 sodium acetate

2.3.2 不同氮源对菌体产酶的影响:在总氮摩尔数相同(以 15 g/L 的蛋白胨 + 5g/L 酵母膏为基准)的条件下,在产酶基础培养基中改用了不同氮源,考察不同氮源对菌株 WSHDZ-01 产 CAT 的影响。图 3 结果显示,硝酸钠作为氮源最有利于产酶,总酶活最高可达 1168U/mL,但不利于菌体生长。

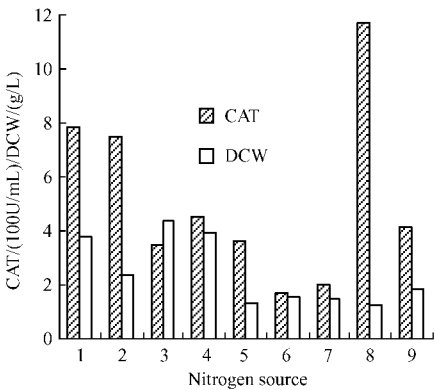


图 3 不同氮源对菌体生长和产酶的影响

1 peptone + yeast power, 2 peptone, 3 yeast power, 4 corn syrup, 5 urea, 6 (NH₄)₂SO₄, 7 NH₄NO₃, 8 NaNO₃, 9 (NH₄)₂CO₃

2.3.3 不同碳氮源浓度对产酶的影响:在最佳碳源定为葡萄糖的基础上,考察了不同浓度的葡萄糖对发酵的影响。图 4 结果显示当葡萄糖浓度为 10g/L 时,对发酵产酶最有利;同样在最佳碳氮源(葡萄糖

、硝酸钠)的基础上考察了不同硝酸钠浓度对发酵的影响,图5结果显示当硝酸钠浓度为5g/L时对发酵产酶最有利,总酶活最高可达3258U/mL,其中约80%为胞内酶活。

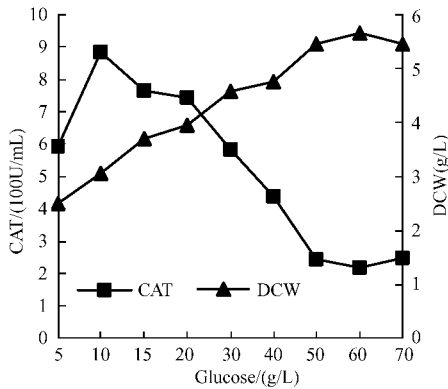


图4 不同碳源浓度对菌体生长、产酶的影响

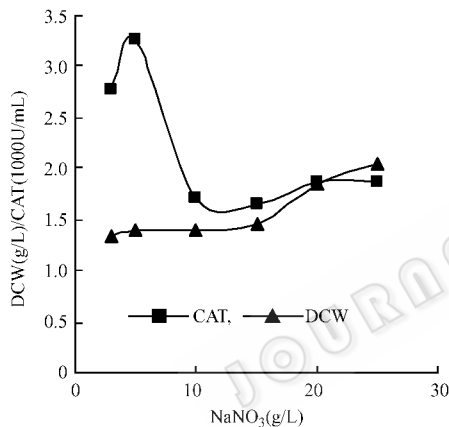


图5 不同氮源浓度对菌体生长、产酶的影响

2.4 菌株 WSHDZ-01 的酶学特性

2.4.1 最适 pH 及 pH 稳定性:初步纯化后的 CAT 在不同 pH 的缓冲体系、37℃测定的酶活(图6)。结

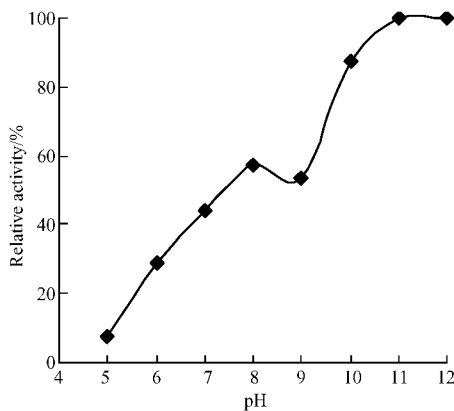


图6 该菌株产过氧化氢酶最适用 pH

果表明,即时酶活最高峰出现在 pH12 处,显示此 pH 最适宜该酶发生作用,此外酶活在 pH9 处出现一个小低谷。CAT 在一系列不同 pH 缓冲液中 37℃下处理 15min ~ 30min,再测定剩余酶活(图7)。结果显示该酶在 pH8 ~ pH11 范围内比较稳定,放置 30min 后除 pH12 的缓冲液中酶活损失很大外,其它的 pH 范围内剩余酶活仍在 98% 以上。

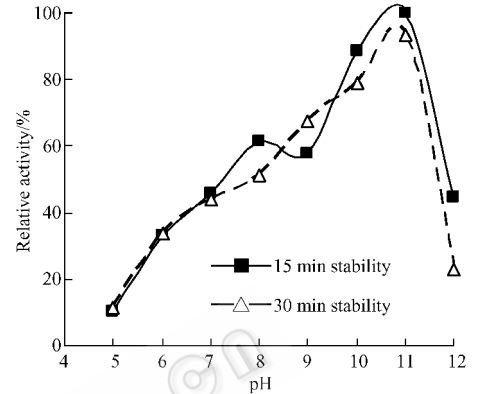


图7 该菌株产过氧化氢酶 pH 稳定性

2.4.2 酶反应的最适温度及热稳定性:酶反应最适温度测定结果表明(图8),该酶在 40℃ ~ 60℃ 范围内的即时酶活较高,最适酶促反应温度为 55℃。酶的热稳定性实验表明(图9),该酶在 50℃ 以下相当稳定,保温 30min 后的酶活基本保持不变,但当温度升至 60℃、保温 30min 后,酶活急剧下降,仅剩余原酶活的 6%。

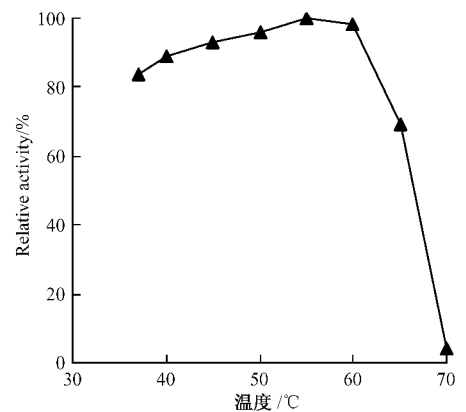


图8 该菌株产过氧化氢酶最适用温度

2.4.3 最优酶作用温度及 pH 条件下酶的稳定性:采用 50℃、pH11 的酶促反应最优条件,在不同时间下测定酶液的剩余酶活(图10)。结果表明,在 30min 以内,菌株 WSHDZ-01 产 CAT 表现出良好的稳定性,20min 时酶活基本没有损失,30min 时剩余酶活仍达 80% 以上,保温 4h 后剩余酶活降为 20%。

以下。

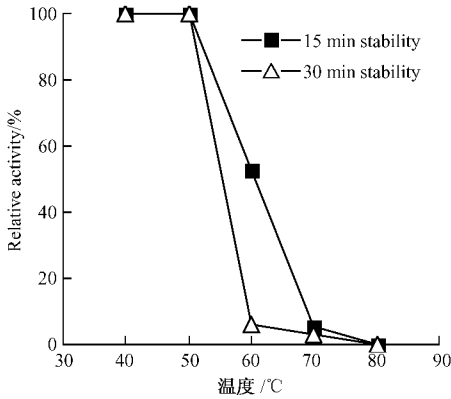


图 9 该菌株产过氧化氢酶热稳定

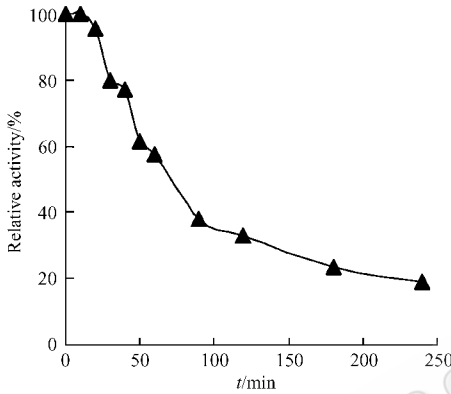


图 10 该菌株产过氧化氢酶在 50℃ pH11 条件下的稳定性

3 结 论

据现有文献报道^[6~14],产 CAT 的微生物种类很多,其中国内以嗜热子囊菌^[12]所产酶活最高,摇瓶水平上最高可达 2763U/mL。本实验筛选得到的一株产 CAT 的枯草芽孢杆菌 WSHDZ-01,在优化的发酵培养基条件下,即分别以 10g/L 葡萄糖和 5g/L NaNO₃为碳氮源,摇瓶发酵培养 35h,总酶活最高可达 3258U/mL,不仅在酶活上高于嗜热子囊菌,且发酵时间比其缩短了约 50h。

通过对菌株 WSHDZ-01 产 CAT 的应用酶学特

性研究,发现该菌株所产 CAT 与文献中的 CAT 相比,虽然在耐热性方面相近,但在耐碱性方面有显著的优势,CAT 的最适 pH 达到 10 以上。结合发酵周期短、节省能耗、酶活高等优点,该菌株具有较大的开发应用潜力。

参考文献

- [1] 刘昌龄. 印染译丛, 2001, 5: 50 ~ 53.
- [2] 许红恩. 纺织信息周刊, 2004, 43: 19.
- [3] 董云舟, 陈 坚, 堵国成, 等. 印染, 2002, 增刊, 53 ~ 57.
- [4] 徐 刚. 纺织科技进展, 2005, 2: 29 ~ 30.
- [5] 何照兴, 袁 军. 印染, 2001, 5: 29 ~ 30.
- [6] 黄文涛译. 酶应用手册. 上海: 上海科技出版社, 1989. pp. 419.
- [7] 周 一, 严自正, 卢运玉, 等. 微生物学报, 1990, 30(3): 223 ~ 227.
- [8] 刘建忠, 翁丽萍, 计亮年, 等. 微生物学通报, 2002, 29(5): 17 ~ 21.
- [9] 洪海军, 许贇荣. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(6): 85 ~ 89.
- [10] 段绪果, 沈 微, 李艳丽, 等. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 74 ~ 78.
- [11] Allgood G S, Perry J J. J Bacteriol, 1986, 168(2): 563 ~ 567.
- [12] Isao Y, Yoshihiro F, Tateo Y. J Biochem, 1990, 108: 583 ~ 587.
- [13] Isao Y, Koji Y, Kosei K, et al. J. Ferment. Bioeng, 1998, 85(1): 113 ~ 116.
- [14] Parr A, Costa S, Tzanov T, et al. J Biotechnol, 2001, 89: 147 ~ 153.
- [15] 方 芳, 李 寅, 堵国成, 等. 生物工程学报, 2004, 20(3): 423 ~ 428.
- [16] 王明星, 李 寅, 方 芳, 等. 过程工程学报, 2005, 5(3): 337 ~ 340.
- [17] 黄培堂. 分子克隆. 北京: 北京科学技术出版社, 2002. pp. 485 ~ 486.
- [18] Bergmeyer H U, Bergmeyer J, Grabl M, et al. Methods of Enzymatic Analysis. 3rd ed, Vol 3, Weinheim: Verlag Chemie Press, 1983. pp. 257 ~ 259.
- [19] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. pp. 682 ~ 688.
- [20] 中国科学院微生物研究所翻译组. 伯杰细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1984. pp. 732 ~ 734.