

产过氧化氢酶菌株 CE-1 的筛选与鉴定

张增祥^{1,2}, 王伟¹, 郝建华¹, 牛瑞¹, 孙谧¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程实验室, 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 经过含 H_2O_2 的平板初筛和摇瓶发酵复筛, 从保存的水样中筛选到一株过氧化氢酶高产菌株 CE-1, 其所产过氧化氢酶活性和比活分别为 1 356.2 U/mL 和 3 401 U/mg。菌株 CE-1 为革兰氏阴性杆状细菌, 根据其形态特征、16S rRNA 基因序列系统进化树分析和生理生化特性, 以及属内不同种间性状差异等因素的综合分析, 将菌株 CE-1 鉴定为气单胞属(*Aeromonas*)细菌。

关键词: 过氧化氢酶; 分离; 鉴定; 系统发育学分析

中图分类号: Q554+.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)11-0054-05

过氧化氢酶(hydroperoxidase, catalase, 过氧化氢氧化还原酶, EC1.11.1.6)是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的末端氧化酶, 能够高效催化过氧化氢分解, 具有清除生物体内自由基, 保护细胞免受损害等作用^[1]。由于其高效催化的能力, 近年来广泛用于食品、医学诊断以及纺织、造纸等工业领域^[2]。近几十年来过氧化氢酶一直是国内外研究的热点^[3], 而目前国内对微生物过氧化氢酶的研究主要集中在其发酵生产、酶学性质和应用方面^[2,4-11]。本实验是在对实验室所保存的水样进行广泛筛选的基础上, 筛选分离出一株高过氧化氢酶活性的菌株并对其进行了分类鉴定以及系统发育学分析, 为下一步的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

基础培养基: 蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.3%, NaCl 0.5%, pH 7.0~7.5。

1.2 主要试剂和仪器

考马斯亮蓝 G250, USB 公司; ExTaq DNA 聚合酶, 大连宝生物工程有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

Nikon 50i 型显微镜: 日本 Nikon 公司; Sonics VCF1500 超声破碎仪: 美国 Sonics 公司; 日立高速冷冻离心机: 日本 HITACHI 公司; 752N 紫外可见分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司; PCR 仪: 德国 Whatman Biometra 公司。

1.3 水样

所用水样为中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程实验室保存。

1.4 产过氧化氢酶菌株的筛选和分离

1.4.1 初筛

含 2% (w/v) 琼脂的基础培养基灭菌后冷却至 50℃ 加入 H_2O_2 , 使终浓度达 1 mmol/L。倒平板。以 200 μ L 样品涂布, 25℃ 培养 24 h。生长出的单菌落划斜面保藏。

1.4.2 复筛

初筛获得的菌株从斜面接入含 50 mL 基础培养基的 250 mL 摇瓶。200 r/min, 25℃ 条件下培养 24 h。离心收菌体, 以 pH 7, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液重悬菌体并在冰浴中超声破碎。离心后取上清测过氧化氢酶活性和蛋白含量。

1.5 酶活力和蛋白含量的测定

过氧化氢酶酶活力采用紫外分光光度法^[12]。测无菌体的发酵液和破碎后上清的活性。酶活性以 H_2O_2 在 240 nm 处分解速率进行计算。反应体系为 50 mmol/L pH 7 磷酸盐的钠盐缓冲液, H_2O_2 浓度 20 mmol/L。取一定量样品加到 1 mL 磷酸盐缓冲液中,

收稿日期: 2009-12-10; 修回日期: 2010-04-20

基金项目: 国家高技术研究发展(863)计划项目(2007AA091602); 国家自然科学基金项目(41006119); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项资金项目(2010-gy-01)

作者简介: 张增祥(1984-), 男, 山东安丘人, 硕士研究生, 主要从事微生物过氧化氢酶研究, 电话: 0532-85833961; E-mail: zhangzengxiang@yeah.net; 孙谧, 通信作者, 电话: 0532-85819525, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

在比色杯中混匀,再迅速加入以磷酸盐缓冲液配制的 40 mmol/L 的 H_2O_2 1 mL 起始反应。以时间(x)对吸光度(y)作图,直线回归计算出斜率即反应速率。将 25 分钟内消耗 $1\mu\text{mol}$ H_2O_2 的酶量定义为一个活力单位。

蛋白含量测定采用 Bradford 法^[13]。过氧化氢酶比活力计算公式:

$$\text{比活力(U/mg)} = \frac{\text{酶活力(U/mL)}}{\text{蛋白含量(mg/mL)}}$$

1.6 形态特征的观察

将经过筛选所确定的菌株,平板划线,25℃培养 24 h,观察菌落形态并进行革兰氏染色^[14]。

1.7 16S rDNA 的 PCR 扩增和测序以及系统发育树分析

提取细菌总 DNA,以 16S rDNA 通用引物: 27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAG-3')和 1492r(5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3')扩增,PCR 反应体系和扩增程序参考文献^[15]。

PCR 产物送上海生工测序。将所测定菌株的 16S rDNA 序列通过 BLAST 检索已有序列,进行相似性比较分析,下载与实验菌株亲缘关系较近的序列,用 Clustal X 软件进行多序列比对,采用 MEGA4 软件的邻接法(neighbor-joining method)进行系统发育分析。

1.8 产过氧化氢酶菌株的生理生化鉴定

根据菌株培养特征,细胞形态,革兰氏染色和氧化酶反应选择法国梅里埃公司 API 20E 试剂条,测定菌株生理生化反应,并参照《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

2.1.1 初筛结果

用含高浓度过氧化氢的平板进行初筛,25℃培养 24 h 后初筛平板上出现肉眼可见的菌落,说明在水样中存在过氧化氢酶活性较高的菌株。将生长出的菌落分别划线分离,共筛选到 14 株高活性菌株,斜面培养基 4℃保藏。

2.1.2 复筛结果

上述 14 株菌株经过摇瓶发酵培养后,测定酶活性和蛋白质含量。结果显示,比活力大于 1 200 U/mg 的菌株仅有 7 株。这 7 株菌分别经 8 次摇瓶传代培

养后,仅有 1 株的产酶稳定性较好,酶活力和比活分别达到 1 356.2 U/mL 和 3 401 U/mg,是第一代菌株酶活性的 90.2%,而其他菌株均低于 80%。故确定该菌为下一步的实验菌株,并命名为 CE-1。

2.2 菌株鉴定结果

2.2.1 形态特征

菌株 CE-1 在基础培养基平板上 25℃培养 24 h,菌落为乳白色、微凸、易挑取,表面光滑湿润、边缘整齐。菌体大小约为 $0.2 \sim 0.5 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 4.4 \mu\text{m}$;革兰氏染色阴性;呈杆状,圆端,单个或短链状排列。

2.2.2 菌株 CE-1 的 16S rDNA 序列和系统发育树分析

产过氧化氢酶菌株 CE-1 的 16S rDNA PCR 产物测序,获得长度为 1384 bp 的序列(登录号 GQ161962)。与 GenBank 已有序列进行比较,菌株 CE-1 的 16S rDNA 与豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)的序列(登录号 X74674)完全一致。用 MEGA4 软件的邻接法构建系统发育树(图 1),可见 CE-1 是气单胞属细菌。

2.2.3 生理生化特征

将菌株 CE-1 和系统发生学相关的气单胞菌属菌株的特性进行比较,可见存在明显差别(表 1)。

16S rDNA 序列分析一般应用于区分和确定属之间的关系,通常不能以此作为定种的依据,而且在相似度达到 97%及以上时会大大降低鉴定的可靠性^[16,17]。而在气单胞菌属中各菌种的 16S rDNA 相似度都很高,根据 16S rDNA 相似性无法确认 CE-1 是豚鼠气单胞菌。菌株 CE-1 的生理生化性状同 16S rDNA 相似菌株(包括豚鼠气单胞菌)的性状的比较中,产半乳糖苷酶、产精氨酸双水解酶、产明胶酶、使山梨醇氧化/发酵、产细胞色素氧化酶、使葡萄糖氧化和使苦杏仁苷氧化/发酵等指标中存在很大的差异,这些生化指标的差别会影响将 CE-1 鉴定到种的准确性,因此将其鉴定为气单胞菌属细菌。

3 结论

采用添加 H_2O_2 的平板培养基,从实验室所保存的水样中筛选到具有高效产生过氧化氢酶能力的菌株 CE-1,并用 API 20E 试剂条和 16S rDNA 序列进行综合分析,将这株细菌鉴定为气单胞属细菌。菌株 CE-1 产酶稳定性良好,经过摇瓶发酵测得酶活力和相对酶活分别达到 1 356.2 U/mL 和 3 401 U/mg,这与国内外报道的产过氧化氢酶菌株相比有一定的优势(表 2)。本实验再次证明 H_2O_2 平板法筛选高活性

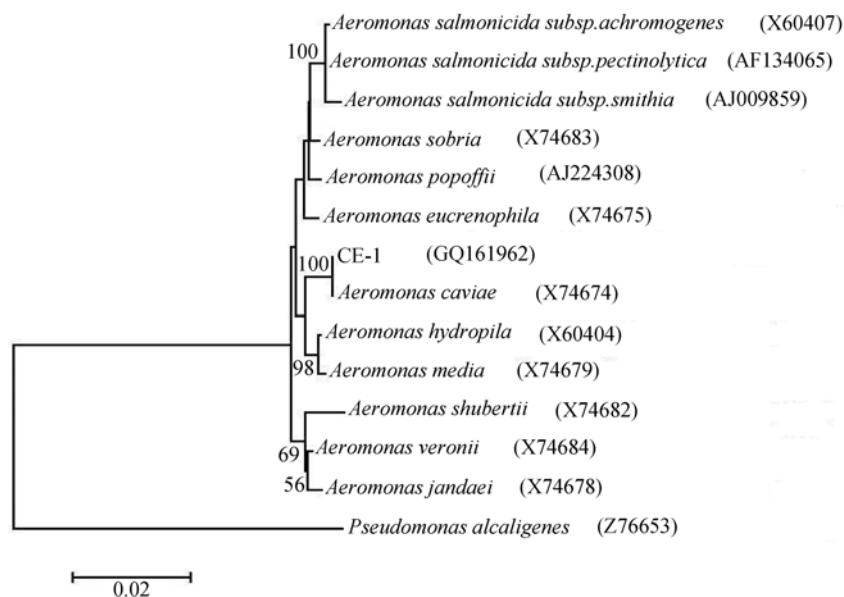


图 1 菌株 CE-1 的系统发育学地位

Fig. 1 Phylogenetic Status of strain CE-1

图中括号内为 Genbank 的登录号; 比例尺表示序列间差异 2%; 分枝结数值表示经过 1 000 次重复计算后的 bootstrap 百分值
Genbank accession numbers of the strains are given in the brackets. Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) greater than 50% are given at the nodes. Bar, 2% nucleotide substitution

表 1 菌株 CE-1 和系统发生学相关的气单胞菌属菌株的生理生化特征比较
Tab. 1 Comparison of physiological characteristics of strain CE-1 with related *Aeromonas* species

生理生化特性	菌株 CE-1	豚鼠气 单胞菌	嗜水气 单胞菌	中间气 单胞菌	嗜泉水 单胞菌	温和气 单胞菌	波波夫气 单胞菌	维隆气 单胞菌
运动性	+	d	+	d	+	-	+	+
产半乳糖苷酶	-	+	+	+	+	+	+	+
产精氨酸双水解酶	-	+	+	d	d	-	+	-
产赖氨酸脱羧酶	-	-	+	-	-	+	-	+
产鸟氨酸脱羧酶	-	-	-	-	-	-	-	+
利用柠檬酸盐	+	+	d	d	-	+	+	+
产 H ₂ S	-	-	+	-	d	+	+	d
产吲哚	+	+	+	+	+	+	d	+
产乙酰甲基甲醇	+	-	+	-	-	-	d	d
产明胶酶	-	+	+	d	d	-	+	+
使葡萄糖氧化/发酵	+	-	+	-	d	d	+	d
使山梨醇氧化/发酵	+	-	-	-	-	-	d	-
使鼠李糖氧化/发酵	-	-	d	-	d	-	-	-
使蔗糖氧化/发酵	+	+	+	+	d	+	-	+
使苦杏仁苷氧化/发酵	+	d	-	-	-	-	-	-
使阿拉伯糖氧化/发酵	+	+	d	+	d	-	d	-
产细胞色素氧化酶	-	+	+	+	+	+	+	+
使葡萄糖氧化	+	-	d	-	-	-	-	d
革兰氏染色	-	-	-	-	-	-	-	-
产脲酶	-	-	-	-	-	-	-	-
产生 NO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+
使甘露醇氧化/发酵	+	+	+	+	+	+	+	+
使肌醇氧化/发酵	-	-	-	-	-	-	-	-
使蜜二糖氧化/发酵	-	-	-	-	-	-	-	-
在 MacConkey 培养基上生长	+	+	+	+	+	+	+	+

注: “+”表示 90%~100%的菌株为阳性;“-”表示 90%~100%的菌株为阴性; d 表示 11%~89%的菌株为阳性^[16]

表 2 一些菌株产过氧化氢酶水平比较
Tab. 2 Comparison of catalase production by different strains quantitated by activity in medium

菌种	过氧化氢酶水平	参考文献
菌株 CE-1	1 356.2 U/mL	本研究
菌株 TL012	98.04 U/mL	[18]
构建基因工程菌 JM109	131 U/mL	[4]
嗜热链霉菌 T485 (<i>Thermosreptomyces</i> sp.T485)	140 U/mL	[19]
溶壁微球菌 (<i>Micrococcus lysodeikticus</i>)	292 U/mL	[5]
枯草芽孢杆菌 WSHDZ-01	600 U/mL	[20]
重组大肠杆菌 UM2-1	30 000 ~ 35 000 U/L	[6]
变幻青霉 <i>Penicillium variable</i> P16	735 U/mL	[21]
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	78 U/mL	[22]

过氧化氢酶菌株是方便有效的^[12]。而且在目前产过氧化氢酶菌株的大量研究中, 尚未见气单胞菌属细菌高产过氧化氢酶的报道, 该菌株的成功分离提供了新的产过氧化氢酶微生物资源, 同时也丰富了对气单胞菌的认识。

目前从 *Aspergillus niger* 分离纯化得到的过氧化氢酶已经进行了工业生产和商业应用, 其所产过氧化氢酶活力为 4000 U/mg^[23], 本实验所筛选得到的菌株 CE-1 所产过氧化氢酶的比活可达 3 401 U/mg, 对比可见 CE-1 具有较大的开发应用潜力, 是一株值得深入研究的菌株。下步的工作将对该菌株诱变育种以及最佳培养条件进行优化, 同时, 本实验的开展为后续酶的分离纯化以及性质研究等提供了必要的基础, 也对下一步的研究具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Schriener S E, Linford N J, Martin G M, *et al.* Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria[J]. *Science*, 2005, **308**(5 730): 1 909-1 911.
- [2] 曹翔宇, 华兆哲, 燕国梁, 等. 过氧化氢酶发酵生产条件优化及在染整清洁生产中的应用研究[J]. *工业微生物*, 2006, **36**(4): 7-12.
- [3] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展[J]. *中国农学通报*, 2005, **21**(5): 223-232.
- [4] 段绪果, 沈微, 李艳丽, 等. 耐热过氧化氢酶基因工程菌的构建及其发酵条件[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, **25**(2): 74-78.
- [5] 陆挺, 汪成富, 戴英, 等. 过氧化氢酶发酵性能的研究[J]. *苏州大学学报(自然科学)*, 2001, **17**(3): 95-97.
- [6] 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[J]. *食品与发酵工业*, 2002, **28**(2): 11-14.
- [7] 刘建忠, 刘杰, 翁丽萍, 等. 巯基乙酸对过氧化氢酶的激活及其机制研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2001, **40**(6): 39-41.
- [8] 王凡强, 王正祥, 邵蔚蓝, 等. 重组大肠杆菌热稳定性过氧化氢酶的纯化及性质研究[J]. *微生物学报*, 2002, **42**(3): 348-353.
- [9] 刘昌龄, 王国庆. 细菌过氧化氢酶的分离、结晶及性质[J]. *生物化学与生物物理进展*. 1990, **17**(5): 380-383.
- [10] 冷晒祥, 钱国祗, 华兆哲, 等. 过氧化氢酶的棉针织物漂染工艺研究[J]. *印染*, 2006, **32**(19): 1-3.
- [11] 花慧, 黄松, 沈国强, 等. 不同防腐剂对过氧化氢酶防腐效果的研究[J]. *食品添加剂*, 2005, **26**(1): 167-169.
- [12] WANG Wei, SUN Mi, LIU Wan-shun. Isolation and characterisation of H₂O₂-decomposing bacteria from Antarctic seawater[J]. *Annals of Microbiology*, 2008, **58**(1): 29-33.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72** (1-2): 248-254.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 353-388.
- [15] Rousseaux S, Hartmann A, Soulas G. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **36** (2-3): 211-222.
- [16] George M. Garrity, Don J. Brenner, *et al.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition[M]. New York: Springer, 2005: 556-571.
- [17] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, **44**(4): 846-849.
- [18] 唐丹玲, 唐文胜. 产过氧化氢酶的乳酸菌的筛选和产酶条件的研究[J]. *食品与发酵工业*, 1992, **6**: 30-33.
- [19] 周一, 严自正, 卢运玉, 等. 耐热过氧化氢酶产生菌

- 的筛选和发酵条件的研究[J]. 微生物学报, 1990, 30(3): 223-227.
- [20] 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[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 667-671.
- [21] Petruccioli M, Fenice M, Piccioni P, *et al.* Effect of stirrer speed and buffering agents on the production of glucose oxidase and catalase by *Penicillium variabile*(P16) in benchtop bioreactor[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, 17(4): 336-339.
- [22] Fiedurek J, Gromada A. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89(1): 85-89.
- [23] Yumoto I, Yamazaki K, Kawasaki K, *et al.* Isolation of *Vibrio* sp. S-1 exhibiting extraordinarily high catalase activity[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 85(1): 113-116.

Isolation and identification of catalase-producing strain CE-1

ZHANG Zeng-xiang^{1, 2}, WANG Wei¹, HAO Jian-hua¹, NIU Rui¹, SUN Mi¹

(1. Laboratory of Marine Products and Enzyme Engineering, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Received: Dec., 10, 2009

Key words: Catalase; Isolation; Identification; Phylogenetic analysis

Abstract: Catalase-producing strain CE-1 was isolated from water samples using H₂O₂-containing plate screening and activity assay of the shake flask culture method. The values of the activity and specific activity were 1356.2 U/mL and 3401U/mg, respectively. CE-1 was Gram negative and rod in shape. Based on the comprehensive analysis of morphological and physiological characteristics, the 16S rDNA phylogenetic tree, and the differences among different species of *Aeromonas*, strain CE-1 was identified to be *Aeromonas*.

(本文编辑: 康亦兼)

(上接第 53 页)

Ultrastructure of *Micromonas pusilla* (Butcher) Manton et Parke

YIN Ming-yan, XIA Wa, HU Xiao-yan

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Jan., 11, 2010

Key words: *Micromonas pusilla*; ultrastructure; the Yellow Sea

Abstract: A strain of *Micromonas pusilla*, widely distributed in the Yellow Sea, was isolated from the coast area of Qingdao. Its morphology and fine structure were studied by electronic microscope. The cells were characterized by a laterally attached flagellum terminating in a long and slender hair-point. No cell wall or surface scales were observed outside the cell membrane. The internal structure was very simple, composed of a single plastid with a large central pyrenoid, a nuclear, a single mitochondrion, and a Golgi complex.

(本文编辑: 梁德海)