

文章编号:1009-038X(2004)06-0085-05

## 产过氧化氢酶菌株培养条件的优化

洪海军, 许贇荣

(江南大学 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 通过对溶壁微球菌培养基优化, 确定最佳发酵培养基, 并对发酵工艺条件进行了初步的优化。最适碳源是麦芽糖, 最适氮源是蛋白胨和酵母膏, 最近无机盐是  $\text{MnSO}_4$ ; 该菌株产酶的最佳培养基配方为: 60 g 麦芽糖, 13 g 蛋白胨, 8 g 酵母膏, 1 g  $\text{MnSO}_4$ , 5 g  $\text{NaCl}$ , 2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g  $\text{CaCl}_2$ , 1 000 mL 水。从该菌株发酵过程曲线发现, 该菌株大量产酶期在 12~14 h。摇瓶发酵最适初始 pH 值为 7.0, 250 mL 三角瓶装液量为 25 mL, 接种体积分数为 5%, 培养温度为 37 ℃。

**关键词:** 过氧化氢酶; 发酵; 溶壁微球菌; 培养基; 优化

**中图分类号:** TQ 920.6

**文献标识码:** A

## The Optimization of Culture Medium for Catalase Producer—*Micrococcus lysodeikticus*

HONG Hai-jun, XU Gan-rong

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

**Abstract:** This study mainly discussed the medium optimization for *Micrococcus lysodeikticus* fermentation, which can produce catalase. The results showed that the best carbon source for *Micrococcus lysodeikticus* fermentation is maltose, the best nitrogen source is peptone and yeast extract, and the best inorganic source is  $\text{MnSO}_4$ . The optimal medium was found as follows: maltose 6%, peptone 1.3%, yeast extract 0.8%,  $\text{NaCl}$  0.5%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.2%,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2%,  $\text{MnSO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{CaCl}_2$  0.05%. The fermentation curve of *Micrococcus lysodeikticus* showed that enzyme synthesis occurred at the time of 12~14 h. The optimal fermentation conditions were as follows: initial pH 7.0; medium loading ratio of 10% (25 mL medium in 250 mL flask); seeding 5% and fermentation at 37 ℃ for 12 h.

**Key words:** catalase; fermentation; *Micrococcus lysodeikticus*; optimal medium

过氧化氢酶(catalase)广泛分布于动植物组织中,溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)等细菌中含量也较多。该酶自1950年就广泛应用于生物、医药、临床和食品中的某些分析测定;在食品和乳

制品工业用于除去消毒和杀菌后残余的过氧化氢;在纺织工业用于去除氧漂时残留的过氧化氢;在制浆工业和造纸工业上用于替代  $\text{SO}_2$  和亚硫酸钠去除漂白后残余的过氧化氢;利用过氧化氢酶与过氧化

收稿日期:2004-01-13; 修回日期:2004-03-10.

作者简介:洪海军(1977-),男,江苏南通人,发酵工程硕士研究生.

氢同时使用放出氧气的机理,可用于橡胶成型,塑料及多泡性粘合剂等<sup>[1,2]</sup>.传统商品化的过氧化氢酶是从牛肝中提取,目前牛肝仍然是商品过氧化氢酶的主要来源,但越来越多的过氧化氢酶是通过发酵微生物如溶壁微球菌或丝状真菌黑曲霉生产得到.理想的酶源应该是来源容易,含量丰富,催化效能高,制取方便,稳定性好,又可以大量生产,相对其它来源,微球菌的过氧化氢酶比活性最高,因此可以把它作为过氧化氢酶的理想来源<sup>[3]</sup>.作者初步研究了微球菌产过氧化氢酶的培养特性,对摇瓶发酵培养基和培养条件进行了优化.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)SYH0209,作者所在实验室保藏.

1.1.2 斜面培养基 组分(g/dL):葡萄糖 0.1,蛋白胨 1,酵母膏 0.5,NaCl 1,琼脂 2. pH 7.0.

1.1.3 种子液培养基 组分(g/dL):葡萄糖 0.1,蛋白胨 1,酵母膏 0.5,NaCl 1. pH 7.0.

1.1.4 基础培养基 组分(g/dL):蛋白胨 1,酵母膏 1,NaCl 0.5, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.2, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  0.2.

1.1.5 培养条件 37℃,200 r/min 摇瓶培养 12 h.

1.1.6 主要试剂 麦芽糖,葡萄糖,蛋白胨,酵母膏,NaCl等.

1.1.7 主要设备 752分光光度计,HP1100 高效液相色谱仪,摇瓶培养箱,离心机等.

### 1.2 过氧化氢酶活力测定方法

将发酵液离心,去上清液,湿菌体恢复至原体积,采用超声波破碎 15 min,再离心取上清液作为粗酶液,然后用分光光度计法测定酶活力<sup>[4]</sup>.

酶活力单位定义为:在 pH 7.0,25℃下,每分钟分解 1  $\mu\text{mol}$   $H_2O_2$  的酶量为一个单位(CIU).

### 1.3 不同碳源对产酶的影响

在基础培养基中添加不同的碳源,其他成分不改变,在 37℃,200 r/min 条件下摇瓶发酵 12 h,测定过氧化氢酶活力.

### 1.4 不同氮源对产酶的影响

在优化的培养基中添加不同的氮源,其他成分不改变,在 37℃,200 r/min 条件下摇瓶发酵 12 h,测过氧化氢酶活力.

### 1.5 不同无机盐对产酶的影响

在优化的培养基中添加含不同金属离子的盐,

其他成分不变,在 37℃,200 r/min 条件下摇瓶发酵 12 h,测定过氧化氢酶活力.

### 1.6 最佳发酵培养基的设计

采用  $L_9(3^4)$  正交实验设计,选定麦芽糖、蛋白胨、酵母膏、硫酸锰 4 个因素,确定微球菌的最佳发酵培养基.

### 1.7 培养基优化后的产酶曲线测定

培养基:同最终优化培养基,pH 值 7.0.

对发酵培养液从发酵开始每隔 2 h 取样一次,分别测定麦芽糖质量分数、酶活、细胞浓度.

### 1.8 不同初始 pH 值对产酶的影响

将最终优化培养基的初始 pH 值分别用磷酸调整 5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,在 37℃,200 r/min 条件下摇瓶培养 12 h,测定过氧化氢酶活力.

### 1.9 不同装液量对产酶的影响

在 250 mL 三角瓶中分别装入 15,20,25,30,35,40,45,50 mL 最终优化培养基,在 37℃,200 r/min 条件下摇瓶培养 12 h,测定过氧化氢酶活力.

### 1.10 不同接种量对产酶的影响

从活化的斜面培养基上挑一环菌体接入种子培养基中,培养 12 h,在最终优化培养基中分别接入体积分数为 1%,2%,5%,10%,15% 的种子液,在 37℃,200 r/min 条件下摇瓶培养 12 h,测定过氧化氢酶活力.

### 1.11 不同发酵温度对产酶的影响

将优化培养基分别在 25,30,35,37,40,45℃,200 r/min 条件下摇瓶培养 12 h,测定过氧化氢酶活力.

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同碳源对产酶的影响

在基础培养基中加入不同质量浓度的碳源,在 37℃,200 r/min 条件下摇瓶发酵 12 h,测定过氧化氢酶活力,结果见图 1.

从图 1 可以看出,以基础培养基为空白,以 6 g/dL 的麦芽糖为碳源发酵产生的酶活最高,而对于淀粉、玉米粉和甘油,微球菌产过氧化氢酶的活力都较低.实验发现虽然葡萄糖能更有效地促进微球菌的生长,但不能有效地提高酶活,另外采用葡萄糖和麦芽糖混合碳源发酵产酶,其产酶的活力也没有单独采用麦芽糖作碳源得到的酶活高.由此可见,直接采用麦芽糖作碳源对提高过氧化氢酶的酶活有很大的促进作用,由于麦芽糖价格高,可考虑采用蔗糖进行工业化生产.

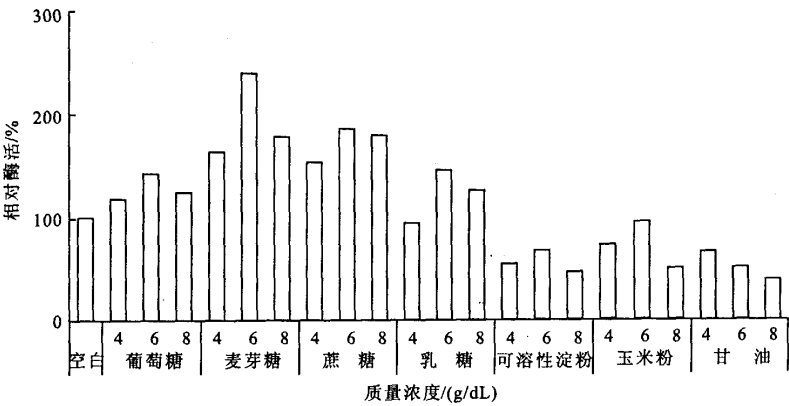


图 1 不同质量浓度碳源对产过氧化氢酶的影响  
Fig.1 Effect of carbon source on catalase activity

2.2 不同氮源对产酶的影响

在 2.1 优化培养基基础上更换氮源,加入 1 g/dL 的各种氮源进行发酵实验,结果见图 2. 由图 2 可以看出,不同氮源对过氧化氢酶的发酵产生以及细胞的生长有明显的差异. 其中蛋白胨和酵母膏对产酶以及细胞生长最为适合,可能是因为这两种物质营养较全面,有利于细胞的生长和酶的产生. 而 NaNO<sub>3</sub> 等无机氮源对细胞的生长有一定的抑制作用,发酵产酶的活力也很低,因此选择蛋白胨和酵母膏作为氮源进行下一步实验.

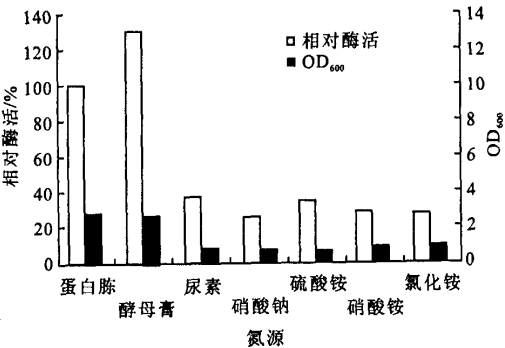


图 2 不同氮源对产酶以及细胞生长的影响  
Fig.2 Effect of nitrogen source on catalase activity

2.3 不同无机盐对产酶的影响

在 2.2 优化的培养基中更换无机盐,加入 0.05 g/dL 的各种无机盐进行发酵实验,结果见图 3. 由图 3 可以看出,MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、硫酸锰、氯化钙均对过氧化氢酶的产生有一定的促进作用,其中硫酸锰的促进作用特别明显,而硫酸亚铁和硫酸锌均抑制细胞生长及过氧化氢酶的产生,不宜添加到培养基中,因此选择添加 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、氯化钙以及硫酸锰作为培养基的无机盐成分.

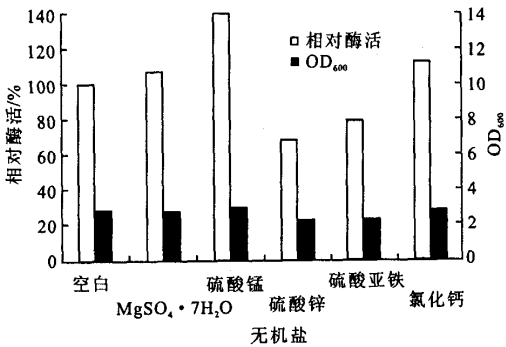


图 3 无机盐对产酶及细胞生长的影响  
Fig.3 Effect of inorganic source on catalase activity

2.4 培养基的优化

根据上述的实验结果,对发酵培养基中影响过氧化氢酶的主要成分麦芽糖、蛋白胨、酵母膏、硫酸锰进行 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验,结果见表 1,2.

表 1 正交因素水平表

| Tab.1 The levels of factors of perpendicular experiment design |                          |                          |                          |                          |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 水平                                                             | A 麦芽糖<br>质量浓度/<br>(g/dL) | B 蛋白胨<br>质量浓度/<br>(g/dL) | C 酵母膏<br>质量浓度/<br>(g/dL) | D 硫酸锰<br>质量浓度/<br>(g/dL) |
| 1                                                              | 5                        | 10                       | 6                        | 0.05                     |
| 2                                                              | 6                        | 13                       | 8                        | 0.1                      |
| 3                                                              | 7                        | 16                       | 10                       | 0.2                      |

通过正交试验,可以得出最佳方案为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即为 6 g/dL 麦芽糖,1.3 g/dL 蛋白胨,0.8 g/dL 酵母膏,0.5 g/dL NaCl,0.2 g/dL K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O,0.2 g/dL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O,0.1 g/dL MnSO<sub>4</sub>,0.05 g/dL MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O,0.05 g/dL CaCl<sub>2</sub>. 按照此方案进行摇瓶培养,最终发酵液中过氧化氢酶酶活达到 980 CIU,比原培养基产酶 290 CIU 提

高了 3 倍多.

表 2 正交试验结果

Tab. 2 The results of perpendicular experiment

| 实验号 | A     | B     | C     | D     | 相对酶活/% |
|-----|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1   | 1     | 1     | 1     | 1     | 100    |
| 2   | 1     | 1     | 2     | 2     | 114    |
| 3   | 1     | 2     | 3     | 1     | 109    |
| 4   | 2     | 2     | 1     | 3     | 127    |
| 5   | 2     | 3     | 2     | 1     | 135    |
| 6   | 2     | 3     | 3     | 3     | 95     |
| 7   | 3     | 1     | 1     | 3     | 106    |
| 8   | 3     | 2     | 2     | 2     | 167    |
| 9   | 3     | 3     | 3     | 2     | 87     |
| k1  | 107.6 | 106.7 | 111   | 114.7 |        |
| k2  | 119   | 143   | 138.7 | 122.7 |        |
| k3  | 70    | 105.7 | 97    | 109.3 |        |
| R   | 49    | 37.3  | 41.7  | 13.4  |        |

2.5 优化培养基的产酶曲线

优化后培养基产过氧化氢酶的曲线见图 4, 由图 4 可知, 该菌株产酶在发酵时间为 12~14 h 时达到最高. 产酶跟细胞的生长并不同步, 酶的合成属于延续合成型. 随着细胞的生长产酶开始, 但是细胞进入稳定期后, 酶仍可以继续产生. 在发酵时间为 14 h 时酶活下降较快, 原因可能是随着发酵时间的延长, 菌体老化自溶导致发酵液中菌体酶活下降.

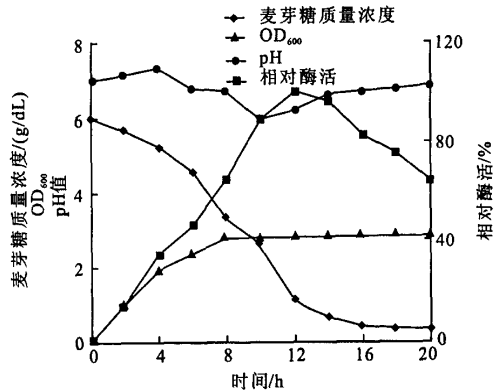


图 4 优化培养基产酶曲线

Fig. 4 Catalase producing curve when using the optimize medium

2.6 培养基初始 pH 值对产酶的影响

改变优化培养基的初始 pH 值进行发酵产酶,

结果见图 5. 由图 5 可知, 该菌株在 pH 7.0 时产酶活力最高, 初始 pH 值对发酵液的产酶活力影响较大, 这说明该菌株产酶的最适 pH 值范围在 7.0 左右.

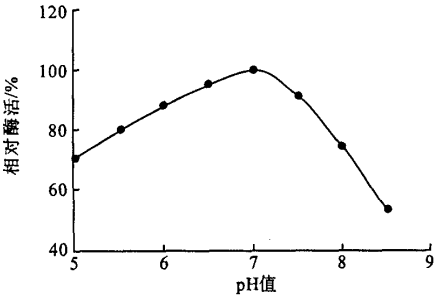


图 5 初始 pH 值对产酶的影响

Fig. 5 Effect of initial pH on catalase activity

2.7 发酵液装液量对产酶的影响

改变 250 mL 三角瓶的装液量进行发酵产酶, 结果见图 6. 由图 6 可知, 250 mL 三角瓶装液量为 25 mL 时产酶最高; 装液量减少时产酶有一定的减少, 装液量增大时产酶降低较大. 可见, 在溶氧偏低、供氧不足时产酶减低. 实验结果表明, 250 mL 三角瓶装液量为 25 mL 最合适.

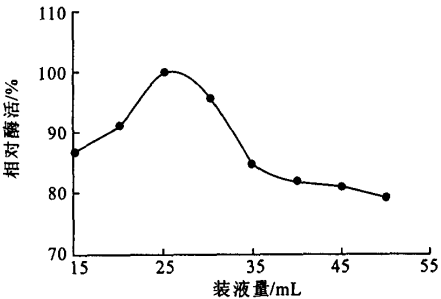


图 6 装液量对产酶的影响

Fig. 6 Effect of quantity of fermentation broth on catalase activity

2.8 接种量对产酶的影响

在发酵液中接入不同量的种子液进行发酵产酶, 结果见图 7. 由图 7 可知, 接种量过小时, 发酵液中初始菌体浓度过低, 产酶不多; 接种量过大时, 有可能导致发酵初期菌体过快生长, 造成酶合成阻遏现象. 结果表明, 采用体积分数为 5% 的接种量最合适.

2.9 发酵温度对产酶的影响

将发酵液在不同的温度下发酵培养产酶, 结果见图 8. 由图 8 可知, 温度过高或过低都不利于产酶, 最佳发酵产酶的温度是 37 ℃.

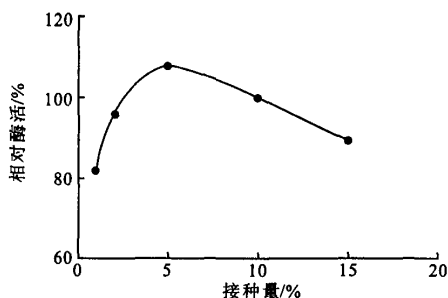


图7 接种量对产酶的影响

Fig. 7 Effect of seed amount catalase activity

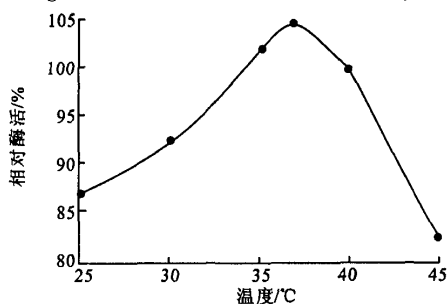


图8 温度对产酶的影响

Fig. 8 Effect of temperature on catalase activity

## 2.10 培养条件优化前后的结果对照

经培养条件优化后,最终的培养条件确定为:培养温度 37 ℃、初始 pH 7.0、250 mL 三角瓶装液量 25 mL、接种量 5%、发酵时间 12 h.

培养条件优化后,该菌株的产酶活力由优化前的 980 CIU 提高到 1 100 CIU.

## 3 小 结

1) 通过培养基优化实验表明,该菌株的最适碳源为麦芽糖,最适氮源为蛋白胨、酵母膏,最适无机盐为硫酸锰;该菌株产酶最佳培养基配方为:6 g/dL 麦芽糖,1.3 g/dL 蛋白胨,0.8 g/dL 酵母膏,0.5 g/dL NaCl,0.2 g/dL  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ,0.2 g/dL  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ,0.1 g/dL  $MnSO_4$ ,0.05 g/dL  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,0.05 g/dL  $CaCl_2$ .

2) 培养条件优化后为:培养温度 37 ℃,初始 pH 7.0,250 mL 三角瓶装液量 25 mL,接种体积分数 5%,发酵时间 12 h.

3) 产酶活力从 290 CIU 提高到 1 100 CIU,显著地提高了该菌株发酵产酶的能力.

## 参考文献:

- [1] 相尺孝亮. 酶应用手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989. 382—389.
- [2] 陆挺,汪成富,戴英子. 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.
- [3] 刘昌玲,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.
- [4] Sigma. Organic compounds for research and diagnostic reagents[J]. *Biochemical*, 1993,14(3):214—215.

(责任编辑:李春丽)