

文章编号: 1673-1689(2007)01-0077-07

枯草杆菌 *Bacillus* sp F26 产过氧化氢酶的 发酵条件

华兆哲^{1,2*}, 燕国梁^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:从内蒙古呼伦贝尔草原的盐碱湖中分离到的一株低度嗜盐嗜碱细菌 *Bacillus* sp F26, 能积累高水平过氧化氢酶(CAT)。对 *Bacillus* sp F26 发酵产过氧化氢酶的环境与营养条件的研究结果表明, 其积累高水平过氧化氢酶的适宜环境条件为: 温度 37 °C, 种龄 20~22 h, 接种量 5%, 装液量 50 mL/(250 mL 的摇瓶)。适宜发酵培养基组成(g/L)为: 葡萄糖 15, 牛肉膏 10, 玉米浆 10, 酵母膏 5, 磷酸二氢钾 1, 氯化镁 0.2, 氯化钠 50, 碳酸钠 10。采用上述条件进行摇瓶分批发酵实验, 发酵 20 h, 过氧化氢酶酶活达到 16.32 U/mL, 细胞干重为 4.12 g/L。进一步研究发现, 在对数生长后期(16 h)添加 2 mmol/L 的 H₂O₂ 可以明显刺激产酶, 在 5 L 的发酵罐上进一步以指数速率方式流加 H₂O₂, 由于该流加方式可降低 H₂O₂ 对细胞的毒害作用, 过氧化氢酶酶活达到 29.89 U/mL, 与分批发酵相比提高了 92.8%。

关键词:低度嗜盐嗜碱细菌 *Bacillus* sp F26 过氧化氢酶 发酵优化 过氧化氢 指数速率流加
中图分类号: TQ 920.1 文献标识码: A

Optimization of Catalase Production with a Halophilic and Alkaliphilic Bacterium *Bacillus* sp F26

HUA Zhao-zhe^{1,2}, YAN Guo-liang^{1,2}, DU Guo-cheng^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effects of culture conditions and medium compositions on the fermentative production of catalase (CAT) by a slight halophilic and alkaliphilic bacterium *Bacillus* sp F26, isolated from Haoji Soda Lake, P. R. China, were investigated. The optimal culture conditions were obtained as following: temperature 37 °C, age seed 20~22 h, inoculum size 5% and volume 50 mL in 250 mL shaking-flask. The optimal fermentation medium contained 15 g/L of glucose, 10 g/L of beef extract, 10 g/L of corn liquid, 5 g/L of yeast extract, 1 g/L of KH₂PO₄, 0.2 g/L of MgCl₂, 50 g/L of NaCl and 10 g/L of Na₂CO₃. High CAT activity (16.32 U/mL) and dry cell weight (4.12 g/L) were observed at 20 h in shaking-flask culture. It was also found that addition of H₂O₂ (2 mmol/L in the medium) at later

收稿日期: 2006-05-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20676056); 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(No. 2003AA322050); 江苏省创新人才(学术)基金资助项目(BK2004401).

作者简介: 华兆哲(1969-)男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 主要从事环境生物技术研究. E-mail: huazz@sytu.edu.cn.

exponential phase greatly induced the synthesis of CAT. The maximum CAT activity (29.89 U/mL) was obtained by using exponential H_2O_2 feeding strategy in 5 L fermentor, which was 92.8% higher than that in batch fermentation.

Key words: *Bacillus* sp F26; catalase; optimization of fermentation; hydrogen-peroxide; exponential fed-batch model

过氧化氢酶(hydrogen-peroxidase or hydrogen-peroxidase oxidoreductase, EC 1.11.1.6), 又称触酶(Catalase, CAT), 催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 的反应, 几乎存在于所有好氧生物体内, 具有清除自由基, 保护细胞免受 $O_2^- \cdot$ 损害等生理功能^[1]。过氧化氢酶广泛用于生物、医药、临床医学和食品领域中的某些成分测定以及纺织、制浆和造纸工业。商品化的过氧化氢酶主要来源于牛肝、微球菌和黑曲霉。近年来, 由于环保和能源意识的增强, 对嗜热菌^[2]、嗜碱菌^[3]或嗜热嗜碱菌^[4]产生的有特殊性质的 CAT 成为过氧化氢酶研究的热点, 包括极端微生物的筛选、基因工程菌的构建以及酶学性质的研究。

作者对一株前期研究^[5]中筛选得到的低度嗜盐嗜碱细菌 *Bacillus* sp F26 发酵产过氧化氢酶的营养与环境条件进行了研究, 考察了添加过氧化氢对细胞生长和产 CAT 的影响, 在小型发酵罐中, 进一步比较了几种 H_2O_2 流加方式对 CAT 合成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 枯草杆菌(*Bacillus* sp F26), 从内蒙古呼伦贝尔草原的盐碱湖中分离得到, 属低度嗜盐嗜碱细菌(slight halophilic alkaliphile), 由江南大学环境生物技术研究室保存。

1.1.2 培养基

1) 斜面培养基(g/L): 聚蛋白胨 15, 葡萄糖 10, 酵母膏 5, KH_2PO_4 1, $MgCl_2$ 0.2, NaCl 50, Na_2CO_3 10(分消), 琼脂 20, 初始 pH 9.5。

2) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, KH_2PO_4 1, $MgCl_2$ 0.2, NaCl 50, Na_2CO_3 10; 初始 pH 9.5。

3) 基础发酵培养基(g/L): 葡萄糖 15, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, KH_2PO_4 1, $MgCl_2$ 0.2, NaCl 50, Na_2CO_3 10, 初始 pH 9.5。在进行碳源试验时, 将基础发酵培养基中的碳源葡萄糖换成本试验的碳源。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

1) 摇瓶培养: 接两环生长良好的斜面培养物至装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 的三角瓶中培养 22 h。吸取种子培养液, 按 5% 的接种量接种于发酵培养基中(装液量同上)培养 20 h, 培养温度均为 37 °C, 摇瓶转速为 200 r/min。

2) 发酵罐培养: 5 L 的全自动控制发酵罐(KFT-5 L 韩国造)中装液量 3.0 L, 接种量 5%, 温度 37 °C, 搅拌转速 12 h 前控制在 300 r/min, 12 h 后至发酵结束控制在 350 r/min, 气体积流量 3.0 mL/min, 培养时间 24 h。pH 值通过自动流加 3 mol/L H_2SO_4 或 3 mol/L NaOH 溶液控制在 8.8 ~ 9.3 范围内。

1.2.2 测定方法

1) 过氧化氢酶活性测定: 采用分光光度法在 30 °C 下测定^[6]。25 mL 培养液于 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 重悬于 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中, 超声波破碎, 4 °C 下 10 000 r/min 离心 10 min, 所得上清液即粗酶液。取 0.1 mL 酶液至 2.9 mL 含有 10 mmol/L H_2O_2 的 50 mmol/L 的磷酸氢二钾和磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.0)中, 于 30 °C 下反应。 H_2O_2 的分解速率用 752 型紫外-可见分光光度计在 240 nm 下测定。酶活力定义为: 在 30 °C 下, 每分钟分解 1 μ mol H_2O_2 所需的酶量为 1 个酶活力单位。

2) 生物量测定: 取 25 mL 发酵液离心, 蒸馏水洗涤 2 次后置 60 °C 下恒温干燥至恒重重。

3) 还原糖测定: 3,5-二硝基水杨酸法^[7]。

4) H_2O_2 测定: 过氧化物酶法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 发酵培养基的碳、氮源优化

2.1.1 最适碳源的选择 图 1 为不同的单一碳源对 CAT 合成的影响, 包括单糖(葡萄糖、果糖), 二糖(麦芽糖、蔗糖), 多糖(糊精、可溶性淀粉)和乙醇, 添加量为 15 g/L。以基础发酵培养基为对照。结果表明 CAT 合成较适宜的碳源为葡萄糖、麦芽

糖,而葡萄糖、果糖和糊精是细胞生长较适宜的碳源。综合考虑,采用葡萄糖为发酵碳源。在此基础上,进一步考察了不同质量浓度的葡萄糖对产酶的影响(图 2),可以看出,在所考察的范围内,葡萄糖质量浓度的改变对菌体生长的影响并不显著,残留葡萄糖质量浓度 RSC(Residual sugar concentration)随着初糖质量浓度的增加而逐渐升高,当质量浓度从 15 g/L 升高到 20 g/L 时,糖利用率从 89.6% 下降到 78.9%,同时 CAT 的合成明显降低。根据有关报道^[9],这一现象可能是由于葡萄糖分解代谢物的阻遏作用造成的。

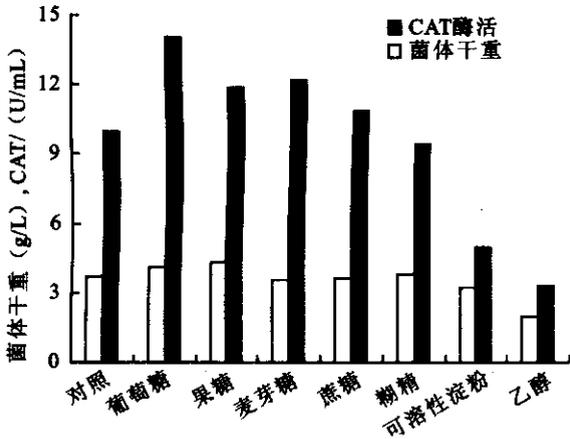


图 1 碳源种类对 *Bacillus* sp F26 合成 CAT 的影响
Fig. 1 Effect of different carbon source on CAT synthesis by *Bacillus* sp F26

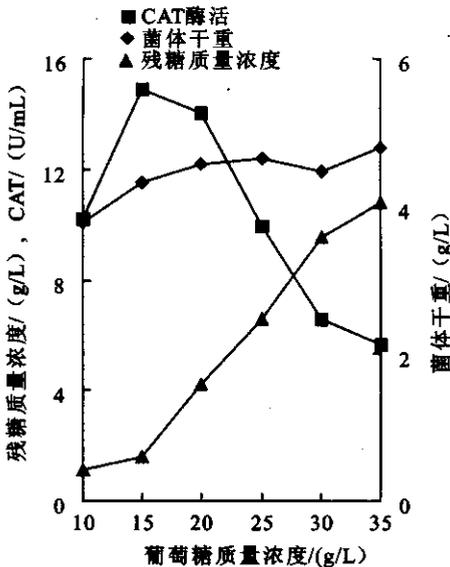


图 2 葡萄糖质量浓度对 *Bacillus* sp F26 合成 CAT 的影响
Fig. 2 Effect of different concentration of glucose on CAT synthesis by *Bacillus* sp F26

2.1.2 最适氮源的选择 在氮源初步实验中发现 *Bacillus* sp F26 对有机氮源的利用情况要好于无机氮源,玉米浆和牛肉膏是菌体生长和产酶适宜的

氮源。为此,在葡萄糖质量浓度为 15 g/L 时进一步考察了初始玉米浆和牛肉膏质量浓度对 CAT 发酵的影响。实验结果见图 3。

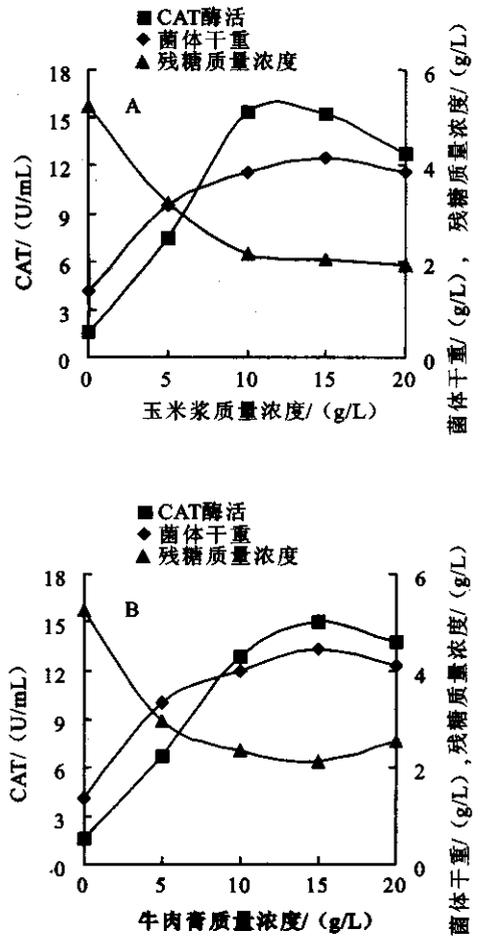


图 3 玉米浆 (A)和牛肉膏 (B)质量浓度对 *Bacillus* sp F26 合成 CAT 的影响
Fig. 3 Effect of different concentration of corn steep liquor and beef extract on CAT synthesis by *Bacillus* sp F26

玉米浆质量浓度为 10 g/L 时可以获得较高的 CAT 酶活 (15.32 U/mL)。随着质量浓度的继续升高,CAT 酶活逐渐降低,细胞干重 DCW 随着玉米浆质量浓度的提高逐渐增加,在 15 g/L 时达到最高 (4.15 g/L),而菌体对糖的利用率在 10 g/L 时达到最大,质量浓度继续升高时,利用率变化不大。在低质量浓度范围内,随着牛肉膏质量浓度的提高,DCW 和 CAT 酶活逐渐升高,当质量浓度为 15 g/L 时,DCW 和 CAT 酶活同时达到最大值,分别为 4.43 g/L 和 15.02 U/mL,此时 RSC 也最低 (2.12 g/L)。从以上结果可知,玉米浆是合成 CAT 较适宜的氮源,而牛肉膏是菌体生长较适宜的氮源。进而考察了混合氮源(玉米浆 + 牛肉膏)对产酶的影响。具体实验设计和结果如表 1 所示。由表 1 可知,当玉

米浆和牛肉膏的质量浓度都为 10 g/L 时, CAT 酶活达到最高, 为 15.66 U/mL, 与对照相比提高了 39.4%。玉米浆显著提高酶活的原因可能是其提供了 CAT 合成必需的多种氨基酸, 如硫氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸等。考虑到发酵培养基成本的因素, 又进行了混合氮源(玉米浆 10 g/L + 牛肉膏 5 g/L) 的实验, 其结果与玉米浆 10 g/L + 牛肉膏 10 g/L 的结果相近, 因此确定采用玉米浆 10 g/L + 牛肉膏 5 g/L 作为混合氮源。

表 1 玉米浆和牛肉膏对 *Bacillus* sp F26 合成 CAT 的影响
Tab. 1 Effect of corn steep liquor and beef extract on CAT synthesis by *Bacillus* sp F26

氮源质量浓度/ (g/L)	菌体 干重/ (g/L)	残糖 质量浓度/ (g/L)	CAT 酶活/ (U/mL)
玉米浆(20)	3.76	1.95	12.99
牛肉膏(20)	4.24	2.63	14.20
玉米浆(5)+牛肉膏(15)	4.18	2.21	14.67
玉米浆(10)+牛肉膏(10)	4.11	2.18	15.66
玉米浆(15)+牛肉膏(5)	3.86	2.52	14.17
对照	3.60	3.86	11.23

2.2 环境因素的影响

分别考察了 pH 值、摇瓶装液量、温度对 *Bacillus* sp F26 产 CAT 的影响。考察结果为: *Bacillus* sp F26 在 pH 8.5 ~ 9.5 的范围内生长较好, pH 为 9.0 时菌体量达到最大值, 同时偏碱性的环境也有利于 CAT 的合成, 当 pH 为 8.5 时 CAT 的合成情况较好; 装液量的变化对细胞生长及 CAT 合成影响较大, 生物量和糖的利用率随着装液量的升高而逐渐降低, 说明较高的溶氧(低装液量)有利于菌体的生长, 较低的装液量(50 mL)有利于 CAT 的合成; *Bacillus* sp F26 对温度的变化比较敏感, 低于或高于 37 °C 都不利于细胞生长和产酶, 特别是高于 37 °C 时生物量和 CAT 酶活迅速下降。

根据以上结果得出的适宜环境条件为: 初始 pH 9.0, 装液量为 50 mL/(250 mL 的摇瓶) 培养较适宜温度 37 °C。

2.3 产酶诱导剂 H₂O₂ 对细胞的生长和产酶的影响

H₂O₂ 作为 CAT 的作用底物, 能够诱导 CAT 的合成^[10]。但 H₂O₂ 对微生物的作用是双重的。一方面, 外源 H₂O₂ 直接进入细胞, 诱导细胞合成 CAT; 另一方面, H₂O₂ 具有的强氧化性, 在超过一定质量浓度时则抑制微生物的生长, 从而影响产酶。Venkateshwaran 等^[11] 研究发现, 在发酵初期添加质量分

数 0.1% 的 H₂O₂ 能够促进 *S. cerevisiae* 细胞的生长和刺激产酶, 但当质量分数过 0.5% 时, 菌体的生长和产酶都受到强烈的抑制。

在前期研究中发现, 发酵初期添加 H₂O₂ 不利于 CAT 的合成, 而且当 H₂O₂ 浓度超过 1.0 mmol/L 时, 菌体的生长还会受到强烈的抑制, 说明初始添加 H₂O₂ 不能起到诱导产酶的作用。为此, 有必要进一步研究 H₂O₂ 添加时间和浓度对 CAT 合成的影响。

2.3.1 H₂O₂ 添加时间与添加浓度对细胞生长和产酶的影响 细胞在生长的不同时期对 H₂O₂ 的敏感程度是不同的^[12], 另外, 不同浓度的 H₂O₂ 对 CAT 的诱导效果也不一样^[13]。根据前面的研究结果以及 CAT 的摇瓶发酵曲线, 确定分别在 12、16、18 h 一次性添加 H₂O₂, 研究在菌体生长的对数生长期、对数生长期后期和稳定期这 3 个重要时期添加 H₂O₂ 对 *Bacillus* sp F26 产 CAT 的影响, 发酵液中添加 H₂O₂ 的浓度分别为 2、4、6 mmol/L, 结果见表 2。

表 2 发酵不同时期添加不同质量浓度的 H₂O₂ 对细胞的生长和产酶的影响

Tab. 2 Effects of different concentration of H₂O₂ addition at different phase on cell growth and production of CAT

添加 时间/ h	浓度/ (mmol/L)	^a 菌体 干重/ (g/L)	残糖 质量浓度/ (g/L)	^b 菌体 干重/ (g/L)	CAT 酶活/ (U/mL)
对照	-	0.97	4.40	10.25	
12	2	2.48	3.28	3.30	10.36
	4	2.53	4.05	3.28	10.43
	6	2.58	4.32	2.44	8.27
16	2	4.28	1.70	3.68	13.80
	4	4.19	2.02	3.64	12.48
	6	4.25	1.57	3.60	11.23
18	2	4.68	1.23	3.44	11.01
	4	4.53	1.02	3.34	10.59
	6	4.62	1.42	3.04	10.18

a: 添加 H₂O₂ 时的 DCW; b: 培养结束时的 DCW

由表 2 可以看出, 不同时期添加不同浓度的 H₂O₂ 对细胞的生长和产酶的影响有很大的差异。添加 H₂O₂ 对细胞的生长有一定的抑制作用, 但却刺激了 CAT 的合成(与对照相比)。对数生长前期(12 h)添加 H₂O₂ 对细胞生长的影响要大于后期添加, 随着 H₂O₂ 浓度的增加, 抑制作用逐渐增强, 但 CAT 的酶活却逐渐增加, 说明此阶段的细胞对 H₂O₂ 比较敏感。对数生长后期(16 h)添加时, H₂O₂ 浓度变化对细胞的影响并不大, 由于细胞已合成一定量的抗

氧化酶 (CAT) 对 H_2O_2 具有一定的抵抗能力, 因此 H_2O_2 浓度对菌体生长的影响要小于其它两个时期。在 2 mmol/L 时 CAT 酶活达到最大, DCW 与其它添加时间相比也较高, 说明此时 H_2O_2 的诱导效果最佳。 H_2O_2 浓度对生长稳定期 (18 h) 菌体和产酶的影响与对数生长前期的情况相似。稳定期的细胞胞内 CAT 含量较高, 对 H_2O_2 起到了一定的分解作用, 同时细胞很快进入到衰亡期, 因此 H_2O_2 的诱导效果并不理想。

根据以上的分析结果, 可以认为 H_2O_2 诱导 CAT 合成的适宜浓度并非指将 H_2O_2 刻意控制在一个极低的浓度, 而是指加入到培养基中的 H_2O_2 的量应该与细胞的生长和细胞总量存在一个适宜的比值范围, 这是一种动态的关系, 即细胞对 H_2O_2 的忍耐存在一个浓度范围。在这个范围内, H_2O_2 对细胞生长的抑制是微弱的, 对 CAT 的诱导作用却是最大的。

流加发酵可以根据菌体生长和产物合成的不同需求即时调整流加物浓度, 较好地避免底物积累造成的抑制菌体生长作用, 解除高质量浓度的底物对菌体生长的抑制作用, 从而提高目的产物的产量。为此, 研究了不同的 H_2O_2 流加模式对 CAT 合成的影响。

2.3.2 H_2O_2 不同流加模式对 CAT 发酵的影响 为了对不同的 H_2O_2 流加模式进行比较, 分别考察了一次性添加 (B)、恒速流加 (C) 和指数速率流加 (D) 3 种流加 H_2O_2 的模式对 CAT 发酵的影响, 结果如图 4 所示。流加 H_2O_2 的培养过程为 0 ~ 16 h 为分批培养过程, 当细胞进入对数生长后期时 (16 h 左右), 采用不同的方式流 (添) 加 H_2O_2 。一次性添加时, 所添加的 H_2O_2 的终浓度为 2.0 mmol/L; 恒速流加时, 以 50 mL/h 的恒定流速流加浓度为 6 mmol/L 的 H_2O_2 至发酵结束 (24 h); 指数速率流加时, H_2O_2 的流加速率见方程 (1)。

根据指数速率流加方程式^[14], H_2O_2 的流加速率为:

$$F(t) = \frac{\mu(VX)_0}{k(S_0 - S)} \exp[\mu(t - t_0)] \quad (1)$$

式中 t 和 t_0 分别表示发酵时间和流加开始时间 (h), 因此 $t - t_0$ 表示流加时间;

- μ : 给定的细胞比生长速率 (h^{-1});
- S_0 : 流加液中 H_2O_2 的浓度 (mmol/L);
- S : 发酵液中 H_2O_2 的浓度 (mmol/L);
- $F(t)$: H_2O_2 流加体积流量 (mL/h);
- $(VX)_0$: 流加起始时罐内菌体量 (g);
- k : H_2O_2 降解率, 包括 CAT 催化 H_2O_2 分解率和

细胞对 H_2O_2 的利用率 (g/mmol)。

式 (1) 中的有关参数取值见表 3。考虑到 μ 值在对数生长后期不断降低, 参考生长过程中 μ 值的变化, 在本实验中 16 ~ 18 h 取 μ 值为 $0.08 h^{-1}$, 18 ~ 24 h 为 $0.05 h^{-1}$ 。在实际操作过程中, 培养液中 H_2O_2 的浓度 (S) 极低 (低于 0.012 mmol/L), 远小于流加液中的 H_2O_2 浓度 (S_0), 因此 $S_0 - S$ 近似等于 S_0 。 k 值较难测定, 参照文献 [15] 的计算方法确定为一固定值。由于式 (1) 中 $F(t)$ 是时间的指数函数, 实际控制流加速度较为困难, 为简化操作, 实验中采用了阶梯式递增流加方式, 每 0.5 h 改变一次流加速率, 并根据菌体的生长随时调整, 基本上达到了 H_2O_2 的指数流加函数的要求。

表 3 指数流加模型中有关参数值

Tab. 3 Values of parameters in exponential fed-batch model

参数	设定值	
	0.08 (16 ~ 20 h)	0.05 (20 ~ 24 h)
$(VX)_0/g$	13.5	
$F_0(t_0)/(mL/h)$	45	
$S_0/(mmol/L)$	6.0	
$k/(g/mmol)$	4	

由分批发酵曲线 (图 4A) 可以看出, CAT 的合成与 *Bacillus sp* F26 菌体细胞的生长过程相耦联。细胞在 10 h 左右进入对数生长期, 16 h 左右进入对数生长后期, 22 h 菌体量达到最大 (5.20 g/L), 而酶活在 20 h 达到最大值 (15.49 U/mL), 糖耗高峰出现在对数生长后期 (15 ~ 22 h)。从 3 种不同的 H_2O_2 添加模式看出, 16 h 开始添加 H_2O_2 , 均可以明显刺激产酶。

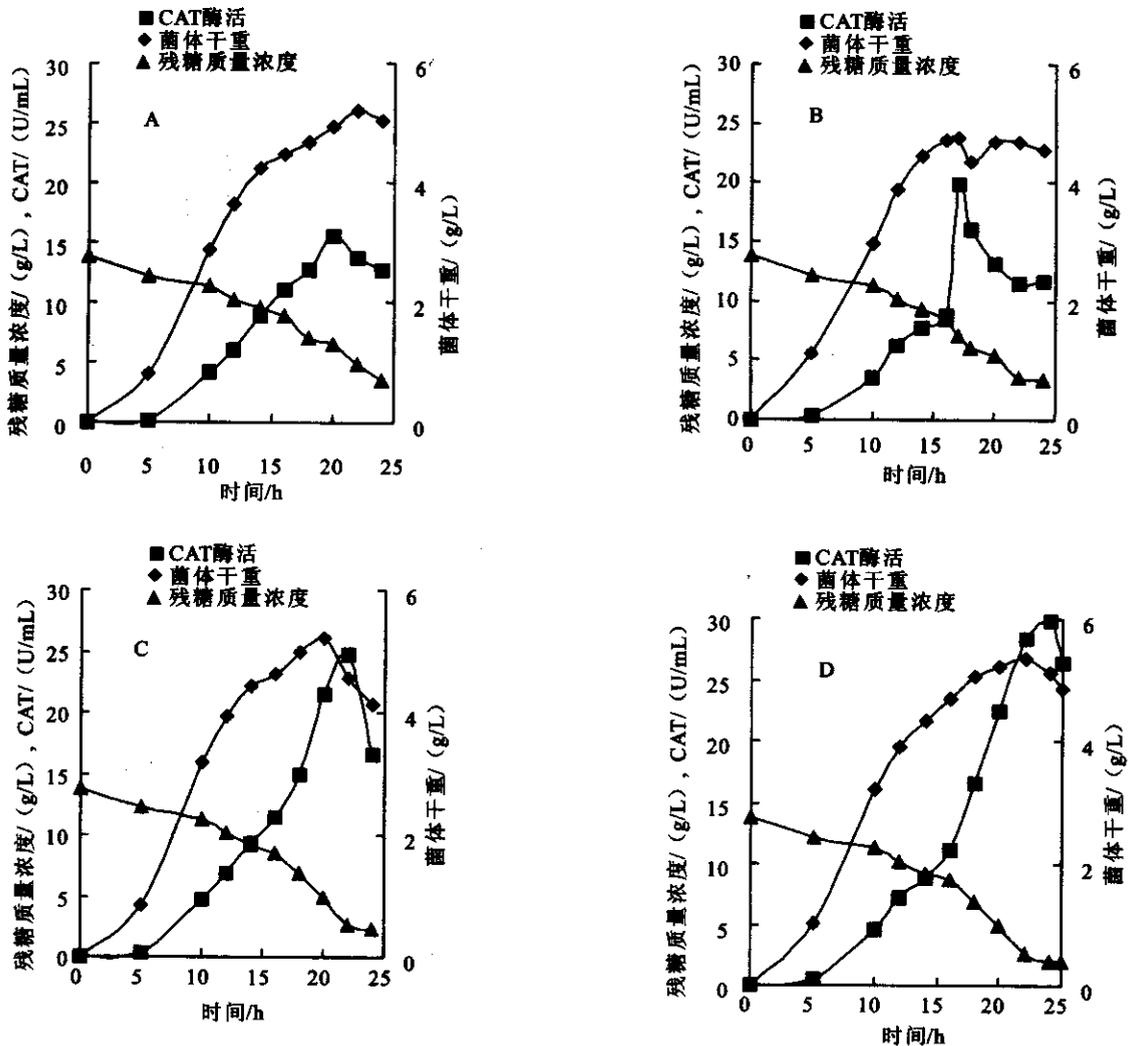
在一次性添加 H_2O_2 的 CAT 发酵中 (见图 4B), 发酵 17 h 最高酶活达到 19.82 U/mL, 与分批发酵相比提高了 28.0%, 但添加 H_2O_2 后, 菌体的生长受到了明显的抑制, 糖耗速率下降, 虽然 2 h 后 DCW 略有增加, 但酶活却迅速下降, 说明添加高浓度的 H_2O_2 对细胞产生了毒害作用, 影响了细胞的酶系发育和正常代谢。高浓度的 H_2O_2 除本身对细胞有毒害作用外, 还可在 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 等离子的参与下, 通过 Haber-Weiss 反应生成对细胞毒害更强的羟自由基 ($OH \cdot$), 引起蛋白质和脂类等物质的失活, 甚至引起细胞的死亡^[16]。

恒速流加 H_2O_2 时 (见图 4C), 随着 H_2O_2 的流加, DCW 和 CAT 酶活逐渐升高, 在 20 h 左右 DCW 达到最大值 5.18 g/L, 比到达酶活最大值 (24.77

U/mL)的时间(22 h)提前了2 h,这一点与分批发酵有所不同。与分批发酵相比,最高酶活提高了59.9%。但在发酵后期,随着流加的继续进行,DCW和CAT酶活又迅速下降,说明在恒速流加后期发酵液中 H_2O_2 浓度的增加速度超过了 H_2O_2 的消耗速率造成 H_2O_2 积累,影响了菌体的生长和产酶,对数生长后期对发酵液中 H_2O_2 浓度进行测定也证实了这一点(数据未列出)。

在 H_2O_2 的指数速率流加过程中(见图4D),发酵液中 H_2O_2 的浓度一直保持在一个较低的范围

(低于0.008 mmol/L)细胞长时间保持较高的生长速率,CAT酶活达到29.89 U/mL,与分批发酵相比分别提高了92.8%,与恒速流加相比也提高了20.7%。说明指数流加能够在一定程度上降低 H_2O_2 对细胞的毒害作用,是比较适宜的 H_2O_2 流加发酵模式。显然,如能进一步调整 H_2O_2 的指数流加速率,找到一个更加适宜的流加速度 $F(t)$,延长细胞生长时间和提高菌体量,可望进一步提高CAT的产量,有关这方面的研究正在进行中。



A: 分批发酵; B: 一次性加入; C: 恒速流加; D: 指数流加

图4 不同 H_2O_2 流加模式下*Bacillus sp F26*产CAT发酵过程曲线

Fig. 4 Time course of different H_2O_2 feeding model culture for CAT fermentation by *Bacillus sp F26*

3 结论

确定了*Bacillus sp F26*产过氧化氢酶最佳发酵培养基组成为:15 g/L葡萄糖,10 g/L牛肉膏,10 g/L玉米浆,5 g/L酵母膏,1 g/L磷酸二氢钾,0.2 g/L

氯化镁,50 g/L氯化钠,10 g/L碳酸钠。适宜环境条件为:初始pH 9.0,装液量50 mL/(250 mL的摇瓶),温度37℃。

在对数生长后期(16 h)添加2 mmol/L H_2O_2 对CAT的诱导效果最好。以指数速率方式流加 H_2O_2

可降低 H_2O_2 对菌体的毒害作用, 过氧化氢酶活达到 29.89 U/mL, 与分批发酵和恒速流加相比分别提

高了 92.8% 和 20.7%。表明指数流加 H_2O_2 是一种比较好的发酵产 CAT 的诱导方式。

参考文献:

- [1] Farr S , Kogoma T. Oxidative stress response in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*[J]. **Microbiol Rev** ,1991 , 55 (4) :561 - 585.
- [2] Allgod GS , Perry JJ. Characterization of a manganese-containing catalase from the obligate thermophile *Thermoleophilum album* [J]. **J Bacteriol** ,1986 , 168(2) 563 - 567.
- [3] Isao Y , Yoshihiro F , Tateo Y. Purification and characterization of catalase from a facultative alkalophilic *Bacillus* [J]. **J Biochem** ,1990 , 108 :583 - 587.
- [4] Parr A , Cosat S , Tzanov T , et al. Thermo-alkali-stable catalases from newly isolated *Bacillus* sp. for the treatment and recycling of textile bleaching effluents[J]. **J Biotechnol** ,2001 , 89 :147 - 153.
- [5] 张心齐, 薛燕芬, 赵爱民, 等. 嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp F26 过氧化氢酶的分离纯化及性质研究[J]. 生物工程学报, 2005 , 21 :71 - 77.
Zhang Xinqi , Xue Yanfen , Zhao Aimin. Purification and characterization of a monofunctional catalase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. F26[J]. **Chinese Journal of Biotechnology** 2005 , 21 :71 - 77.(in Chinese)
- [6] Bergmeyer Hu , Bergmeyer J , Grabl M , et al. Methods of Enzymatic Analysis[M]. Weinheim :Verlag Chemie Press ,1983.
- [7] Miller G L. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. **Anal Chem** , 1960 , 31 :426 - 428.[8] Shiraishi F , Nakasako T , Hua Z Z. Formation of hydrogen peroxide in photocatalytic reactions[J]. **J Phys Chem A** ,2003 , (107) :11072 - 11081.
- [9] Hassan H M , Fridovich I. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*[J]. **J Biol Chem** ,1978 , 253(8) :6445 - 6450.
- [10] Terzenbach D P , Blaut M. Purification and characterization of a catalase from the nonsulfur phototrophic bacterium *Rhodospira rubra* ATH 2. 4. 2 and its role in the oxidative stress response[J]. **Arch Microbiol** , 1998 , 169 :503 - 508.
- [11] Venkateshwaran G , Somashekar D , Prakash MH. et al. Production and utilization of catalase using *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Process Biochem** , 1999 , 34 :187 - 191.
- [12] Steel E L , Learmonth R P , Watson K. Heat and oxidative stress as a function of membrane lipid composition in yeasts[J]. **Proceeding of the Australian society for Biochemistry and molecular Biology** , 1991 , (23) :C46.
- [13] Yun E J , Lee Y N , Production of two different catalase-peroxidases by *Deinococcus radiophilus*[J]. **FEMS Microbiol Letters** , 2000 , 184 :155 - 159.
- [14] Chen J , Li Y , Song Q , et al. The study on bake-yeast cultivation and model of fed-batch[J]. **Medical biotechnology** , 1995 , 2(4) :37 - 42.
- [15] Ichise N , Morita N , Hoshino T , et al. A Mechanism of Resistance to hydrogen peroxide in *Vibrio rumoiensis* S-1[J]. **Appl Environ Microbiol** , 1999 , 65 :73 - 79.
- [16] Song D J , Li H , Yu Z L. Effect of N^+ ion implantation on SOD , CAT , POD activity of different radiosensitivity microorganisms [J]. **Acta Biophysica Sinica** , 1998 , 14(2) :325 - 330.

(责任编辑:李春丽)