

# 活性氧胁迫促进枯草芽孢杆菌 WSHDZ-01 过量合成过氧化氢酶

姚丹丹<sup>1,2</sup>, 刘立明<sup>1,2</sup>, 李江华<sup>1,2</sup>, 华兆哲<sup>1,2</sup>, 堵国成<sup>1,2</sup>, 陈坚<sup>1,2</sup>

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院, 无锡 214122

**摘要:** 研究了乙醇和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫对芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) WSHDZ-01 过量合成过氧化氢酶(Catalase, 简称 CAT)的影响。在 *Bacillus* sp.WSHDZ-01 培养体系中添加 2.0%(V/V)乙醇, 胞内过氧化氢酶活达到 11 151 U/mL, 是对照组的 2.5 倍。而在培养体系中添加 0.3%(V/V)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 则使胞内过氧化氢酶不断分泌到胞外, 胞外酶占总酶活比率增加至 27%。基于上述发现, 分别以不添加胁迫物(a)、乙醇胁迫(b)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫(c)为对照, 在培养体系中维持持续的乙醇和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫, 结果表明: 1) 胞外酶比例达到 82.5%; 2) 发酵周期缩短为 42 h, 比对照 a 延长了 6 h, 比对照 b 和 c 分别缩短了 8 h 和 6 h; 3) 生产强度达到 470 U/(mL·h), 比对照 a 提高了 18.6%, 为过氧化氢酶工业化生产奠定了基础。

**关键词:** 活性氧胁迫, 乙醇, 过氧化氢, 过氧化氢酶

## Overproduction of catalase by oxidative stress on *Bacillus subtilis* WSHDZ-01

Dandan Yao<sup>1,2</sup>, Liming Liu<sup>1,2</sup>, Jianghua Li<sup>1,2</sup>, Zhaozhe Hua<sup>1,2</sup>, Guocheng Du<sup>1,2</sup>, and Jian Chen<sup>1,2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** We studied the overproduction of catalase (CAT) by *Bacillus* sp.WSHDZ-01 by oxidative stress via the feeding of ethanol and the pulse addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. By adding 2.0% (V/V) ethanol to the culture broth, the intracellular CAT activity reached 11 151 U/mL, which was 2.5 times than that of the control (4 450 U/mL in flask). By adding 0.3% (V/V) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, more extracellular CAT secreted to the culture broth, and the ratio of extracellular CAT to the total CAT increased to 27%. Based on these results, an oxidative stress strategy combining the ethanol feeding and the pulse addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was developed. With this strategy, the ratio of extracellular CAT to the total CAT reached 82.5%, increased by 18.6% than that of the control (without ethanol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition). CAT production increased to 28 990 U/mL, which was 95.5% higher than the control (14 830 U/mL in 3 L fermentor). The fermentation time decreased to 42 h, which was much shorter than that of adding ethanol or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and CAT productivity reached 470 U/(mL·h) while the control achieved 396.4 U/(mL·h).

**Received:** December 10, 2008; **Accepted:** March 24, 2009

**Supported by:** National Outstanding Youth Foundation of China (No. 20625619), State Key Basic Research and Development Program of China (973 Program)(No. 2007CB714306), Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University(No. IRT0532), New Century Excellent Talents in University(No. NCET-07).

**Corresponding author:** Zhaozhe Hua. Tel: +86-510-85918309; E-mail: huazz@jiangnan.edu.cn

国家杰出青年基金(No. 20625619), 国家重点基础研究发展规划项目(973 项目)(No. 2007CB714306), 教育部长江学者和创新团队计划(No. IRT0532), 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-07)资助。

**Keywords:** oxidative stress, ethanol, hydrogen peroxide, catalase

过氧化氢酶(Catalase, 简称 CAT)通过催化  $H_2O_2$  分解为  $H_2O$  与  $O_2$  而作为一种酶类清除剂广泛应用于纺织、食品、医药、临床等行业, 具有反应条件温和、催化效率高等优点。前期研究中通过营养和环境条件优化, 显著提高了 *Bacillus* sp. WSHDZ-01 发酵生产过氧化氢酶的酶活, 但难以进一步提高酶活。出现这一现象的核心原因在于没有深入理解生物体系过量积累过氧化氢酶的机理。过氧化氢酶在生物体内以铁卟啉为辅基, 催化  $H_2O_2$  分解而清除体内的  $H_2O_2$ , 使细胞免受活性氧的毒害, 是生物防御体系的关键酶之一。基于此, 作者考虑: 能否将细胞置于活性氧胁迫的非正常生长环境下, 促使微生物细胞为了抵御这一胁迫而不断过量合成过氧化氢酶? 常见的思路是在培养体系中添加乙醇和  $H_2O_2$ <sup>[1,2]</sup>。*Bacillus* sp. WSHDZ-01 能利用乙醇为唯一碳源微弱生长, 并进而在体内生成活性氧<sup>[3]</sup>(图 1), 导致细胞体内微环境处于氧化环境, 细胞为了生存需不断地合成过氧化氢酶以清除乙醇所产生的活性氧。另一方面, 在发酵液中直接添加  $H_2O_2$  使细胞处于  $H_2O_2$  胁迫下的非正常生长环境, 同样能促进过氧化氢酶的生成。基于这一思路, 作者研究了乙醇(内源)和  $H_2O_2$  胁迫(外源)对 *Bacillus* sp. WSHDZ-01 过量合成胞内和胞外酶的影响, 并证实了同时采用内外源氧化胁迫的策略能有效地促进过氧化氢酶生产。

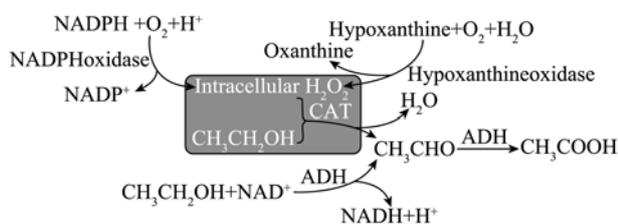


图 1 乙醇在微生物细胞内的代谢途径与产物<sup>[3]</sup>

Fig. 1 Metabolic pathway and related metabolites of ethanol in microorganism<sup>[3]</sup>.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

枯草芽孢杆菌 *Bacillus* sp. WSHDZ-01, 由武汉中国典型培养物保藏中心保藏, 保藏编号为 CCTCC

No. M206062。

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 斜面培养基

6°麦芽汁, 琼脂 2.0%, pH 7.5。

#### 1.2.2 液体种子培养基

6°麦芽汁, pH 7.5。

#### 1.2.3 基本发酵培养基(g/L)

葡萄糖 10,  $NaNO_3$  5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5,  $Na_2HPO_4$  9.52,  $KH_2PO_4$  0.6,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.0025, pH 7.5。

### 1.3 培养方法

#### 1.3.1 斜面培养方法

37°C 培养 18~24 h。

#### 1.3.2 液体种子培养方法

250 mL 三角瓶装 70 mL 种子培养基, 接种一环斜面种子后在旋转式摇床上 37°C、200 r/min, 振荡培养 12 h。

#### 1.3.3 发酵方法

基本发酵培养基 80 mL/500 mL 三角瓶中, 按 6%的接种量接种于种子培养基后在旋转式摇床上振荡培养 37°C, 200 r/min 培养 48 h。

### 1.4 测定方法

#### 1.4.1 生物量的测定

采用称重法测定生物量<sup>[4]</sup>。

#### 1.4.2 酶液样品的制备

取 20 mL 发酵液于 50 mL 离心管中, 10 000 r/min、4°C 下离心 10 min, 上清液作为胞外过氧化氢酶测定样品, 菌泥以 50 mol/L  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  缓冲液(pH 7.0)<sup>[4]</sup>洗涤沉淀 2 次, 以相同体积的缓冲液重悬后置冰浴预冷; 超声波破碎 9 min, 镜检破碎的效果; 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为胞内过氧化氢酶测定样品。

#### 1.4.3 过氧化氢酶酶活测定

酶活测定采用分光光度法<sup>[5]</sup>。

#### 1.4.4 还原糖的测定

还原糖测定采用 3,5-二硝基水杨酸法<sup>[6]</sup>。

#### 1.4.5 活性氧浓度的测定

细胞内活性氧(ROS)初级荧光测定试剂盒, 购自上海杰美基因医药科技有限公司。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乙醇促进胞内过氧化氢酶合成

发酵初始时(0 h)不同乙醇浓度(0.8%、1.0%、1.2%、1.5%、2.0% (V/V))对 *Bacillus* sp.WSHDZ-01 生长和合成过氧化氢酶的影响如图 2 所示。随着培养基中乙醇浓度的不断增加(2.0%, V/V), 过氧化氢酶总酶活也不断增加。当乙醇浓度为 2.0% (V/V), 与未添加的对照组比较, 过氧化氢酶总酶活和胞内酶活分别提高了 126%和 150%(图 2)。进一步分析添加 2.0%乙醇后每隔 20 min 胞内酶活和总酶活的变化情况(图 3)发现, 随着乙醇胁迫时间延长, 胞内酶活占总酶活的比例不断增加。乙醇促进 *Bacillus* sp.WSHDZ-01 过量合成过氧化氢酶的可能机制在于: 1) 作为碳源促进细胞生长<sup>[7,8]</sup>; 2) 在细胞内生成大量活性氧, 迫使细胞过量合成过氧化氢酶以清除活性氧所引起的毒性<sup>[9-11]</sup>。前期研究发现, *Bacillus* sp.WSHDZ-01 能利用乙醇为唯一碳源微弱生长<sup>[12]</sup>。然而, 图 2 表明, 细胞浓度随着乙醇浓度的增加而逐渐降低, 当乙醇浓度为 1.0%和 2.0%时, 细胞浓度分别下降 13%和 16.2%。

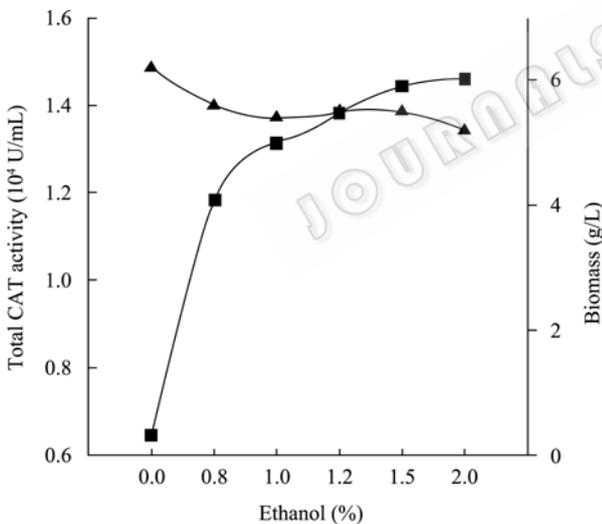


图 2 乙醇浓度对细胞生长和 CAT 合成的影响  
Fig. 2 Effect of ethanol concentration on cell growth(▲) and CAT production(■).

上述结果的原因可能是, 乙醇促进 *Bacillus* sp.WSHDZ-01 大量合成过氧化氢酶的机制在于细胞过量合成过氧化氢酶以清除因乙醇所引起的胞内活性氧浓度的增加, 而乙醇的添加对菌体生长有一定抑制作用。

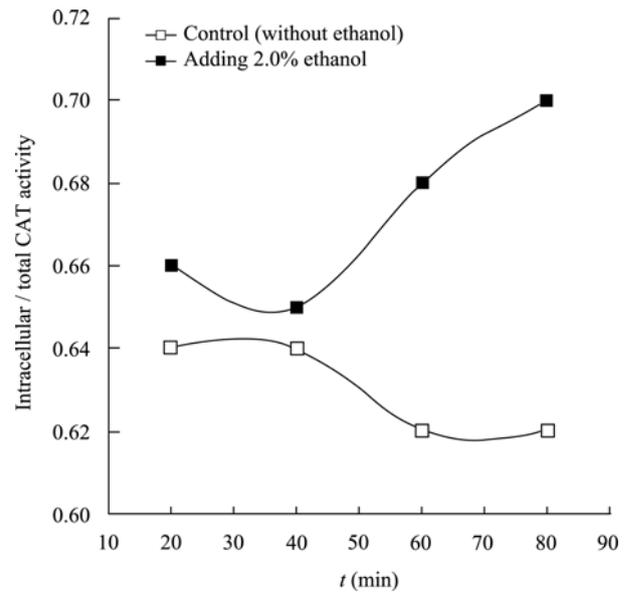


图 3 乙醇添加对胞内外酶活变化的影响  
Fig. 3 Effect of ethanol addition on the ratio of intracellular CAT activity to total CAT activity.

### 2.2 乙醇持续胁迫加强 CAT 的合成

前已述及, *Bacillus* sp. WSHDZ-01 为抵御乙醇代谢所生成的胞内活性氧引起的伤害而过量合成 CAT。那么, 在培养体系中持续添加乙醇能否更好促进过氧化氢酶的合成呢? 为了回答这一问题, 首先研究了在细胞生长的延滞期(0 h)、对数生长期后期(12 h)和稳定期(24 h)分别添加 2.0%(V/V)乙醇对过氧化氢酶合成的影响(图 4B), 发现与对照组(未添加)比较, 过氧化氢酶总酶活分别提高了 54%、37%和 16%; 类似地, 一个发酵周期中在上述 3 个时期各添加 2.0%(V/V)乙醇(总计 3 次), 则可使过氧化氢酶活达到 15 000 U/mL, 与对照组(未添加)和只添加一次的情况(0 h、12 h、24 h)相比总酶活分别提高了 132.6%、51%、70%和 100%。这一结果表明, 持续的乙醇胁迫能更有效地提高过氧化氢酶的合成效率。基于多次分批添加乙醇能明显提高 CAT 产量以及不同阶段乙醇的消耗速率(图 4A), 作者分阶段恒速流加乙醇以使 *Bacillus* sp.WSHDZ-01 处于持续活性氧胁迫下, 结果如图 5A、5B 所示, 过氧化氢酶总酶活(28 990 U/mL)和胞内酶活(9691 U/mL)均达到最大值。

### 2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 促进胞外过氧化氢酶合成

考虑到微生物细胞合成 CAT 的生理机制是抵御活性氧的伤害<sup>[12-14]</sup>, 为了进一步促进 CAT 的生成,

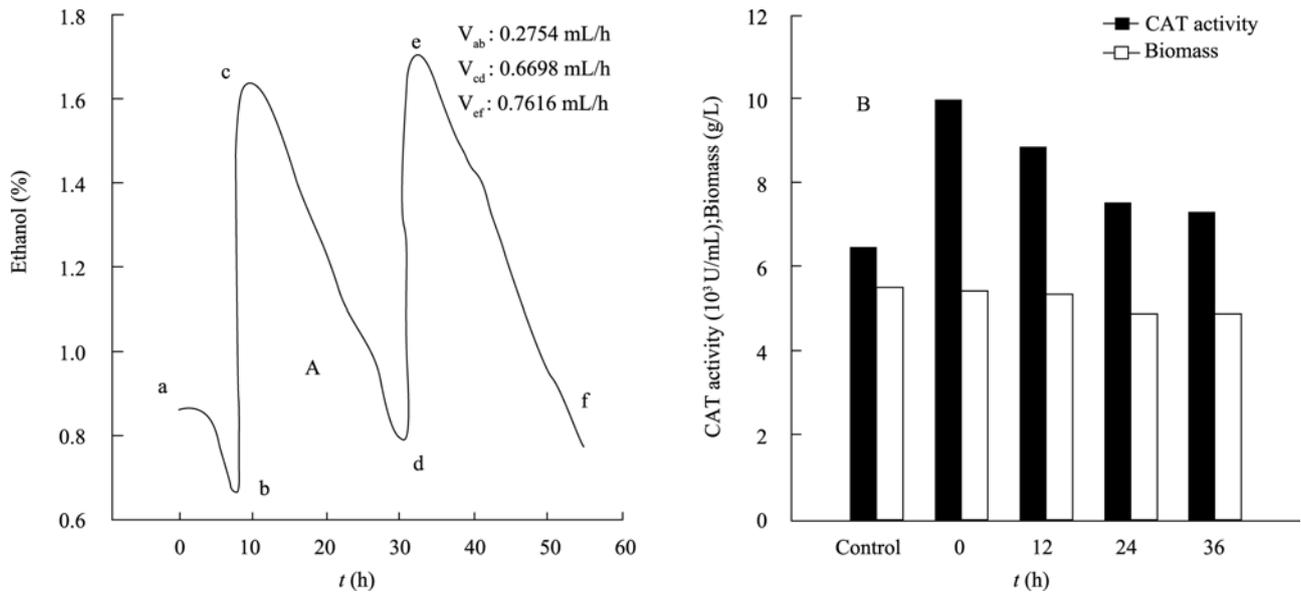


图4 乙醇消耗速率(A)与添加时间(B)对过氧化氢酶发酵的影响

Fig. 4 The consumption rate of ethanol under batch-adding (A) and the optimum of addition time(B). Control: without ethanol.

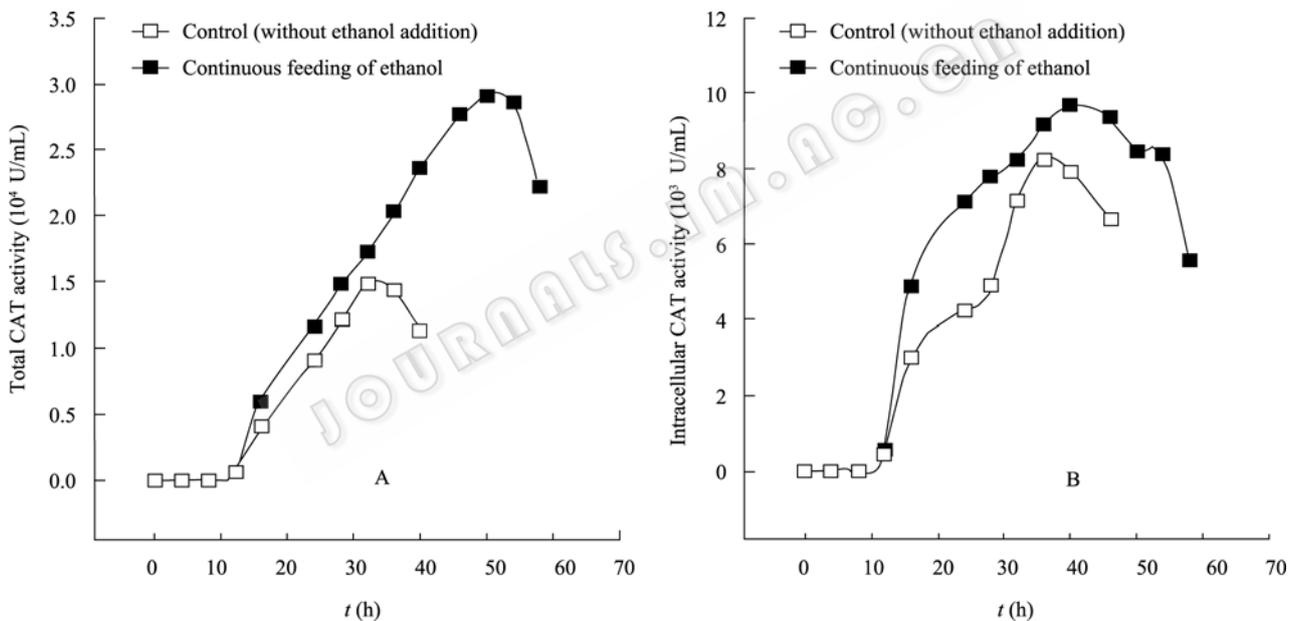


图5 乙醇胁迫对胞内(A)和胞外(B)过氧化氢酶合成的影响

Fig. 5 Effect of ethanol on intracellular(A) and extracellular(B) CAT production.

将对数生长后期(12 h)的 *Bacillus* sp.WSHDZ-01 细胞置于不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$ (0.1%、0.2%、0.3%、0.4%和0.5%(V/V))胁迫下,以研究培养体系中  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫对细胞生长和过氧化氢酶合成的影响,结果如图 6 所示。过氧化氢酶酶活和单位细胞产酶的能力均随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫浓度(0~0.3%, V/V)的增加而不断提高,而细胞浓度则呈下降趋势(图 6A)。添加 0.3%(V/V) $\text{H}_2\text{O}_2$  使总酶活提高到 9254 U/mL(图 6A),较对照组(未添

加  $\text{H}_2\text{O}_2$ )提高了 43.5%。继续增加  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度则导致总酶活不断下降。另一方面,  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫起始时间同样影响细胞合成过氧化氢酶的能力(图 6B): 1) 0 h  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫明显抑制细胞生长和产酶能力(数据未列出); 2) 对数生长后期(12 h)后,随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫时间的延迟,过氧化氢酶总酶活逐渐下降; 3)  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫的最佳时间为 12 h; 4)与乙醇类似,持续低剂量的  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫能有效地提高过氧化氢酶酶活。

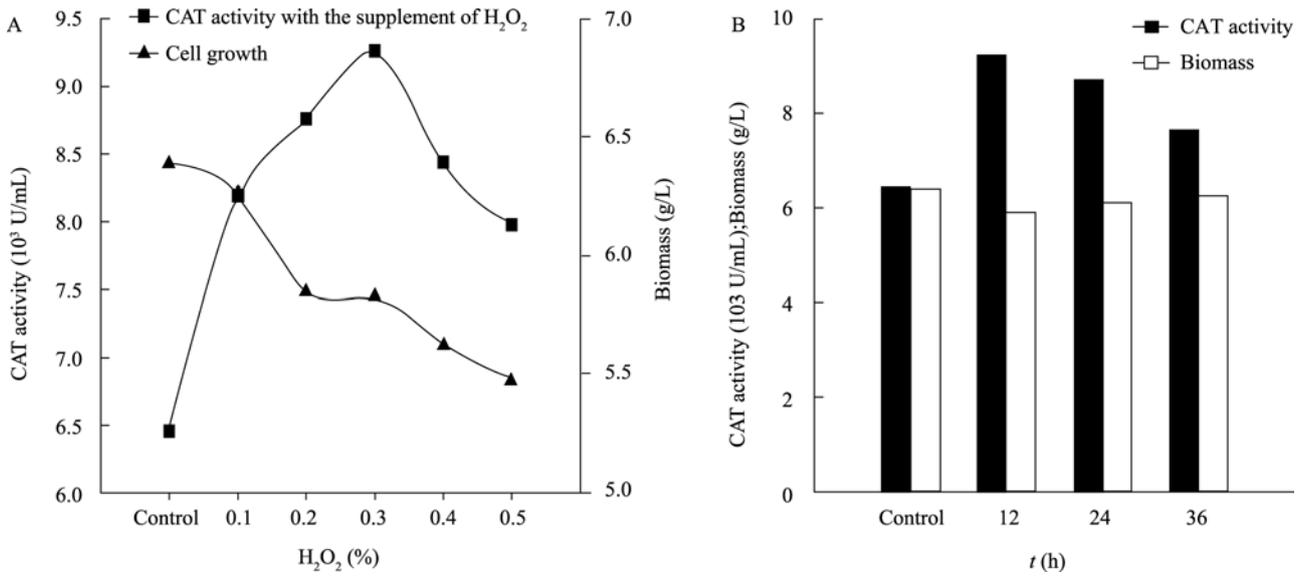


图6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度(A)和添加时间(B)对细胞生长和CAT合成的影响

Fig. 6 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (A) and feeding time (B) on cell growth and CAT production. Control: without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

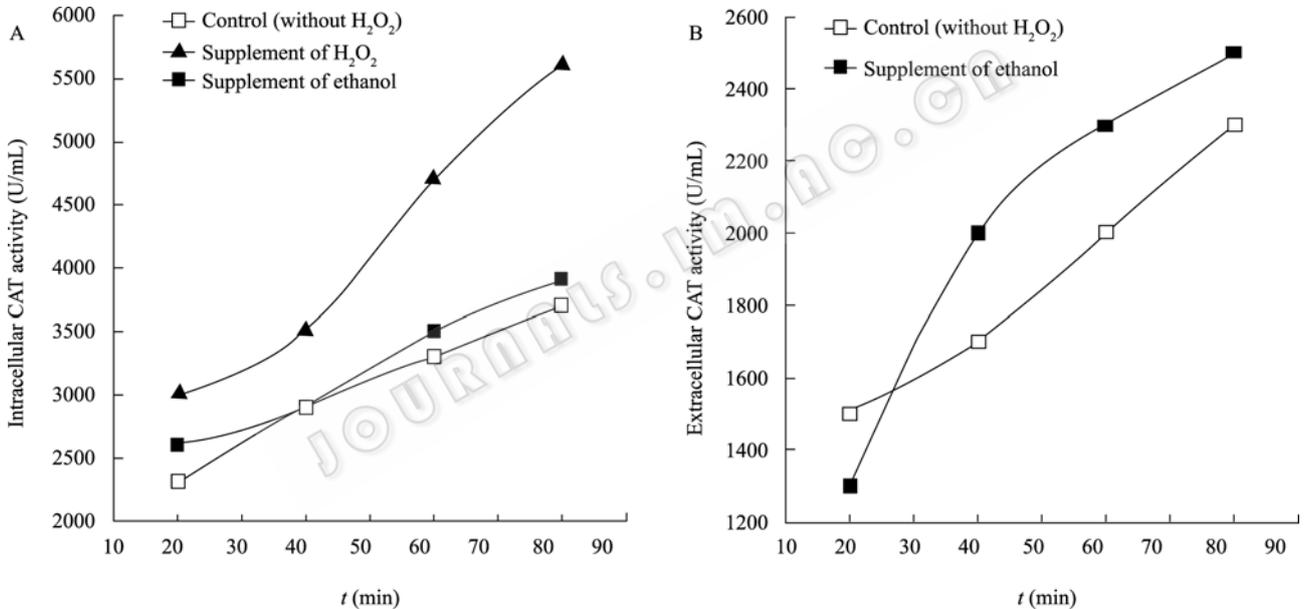


图7 12 h 一次性添加过氧化氢后胞内酶活(A)和胞外酶活(B)变化情况

Fig. 7 Effect of adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 12 h on the intracellular (A) and extracellular CAT activity (B).

如前所述, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫显著提高过氧化氢酶酶活, 其可能机理在于添加过氧化氢是否促进了过氧化氢酶向胞外分泌的能力呢? 为此, 作者分析了添加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20~80 min 后胞内外过氧化氢酶酶活的变化, 如图 7 所示。与乙醇胁迫比较, 添加过氧化氢后胞内过氧化氢酶的积累与对照组相比没有明显提高(图 7A), 而胞外酶活则明显地提高, 且随着胁迫时间的延长而不断增加(图 7B), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫 80 min 后, 胞外酶活达到 2500 U/mL, 比 20、40、60 min 分别提高了 92%、25%和 8.7%。这一结果表明, 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

胁迫下, *Bacillus* sp.WSHDZ-01 在胞内合成大量过氧化氢酶并能有效的将其分泌到胞外, 从而促进了过氧化氢酶总酶活的提高。

#### 2.4 内外源胁迫促进过氧化氢酶积累

基于持续乙醇胁迫促使 *Bacillus* sp.WSHDZ-01 在胞内过量合成过氧化氢酶, 而连续 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫则使胞内过氧化氢酶快速高效地分泌到胞外。那么能否在促使细胞大量合成胞内过氧化氢酶的同时采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫促使酶分泌到胞外, 从而实现过氧化氢酶的高效生产? 以不添加乙醇和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(a); 乙醇胁迫

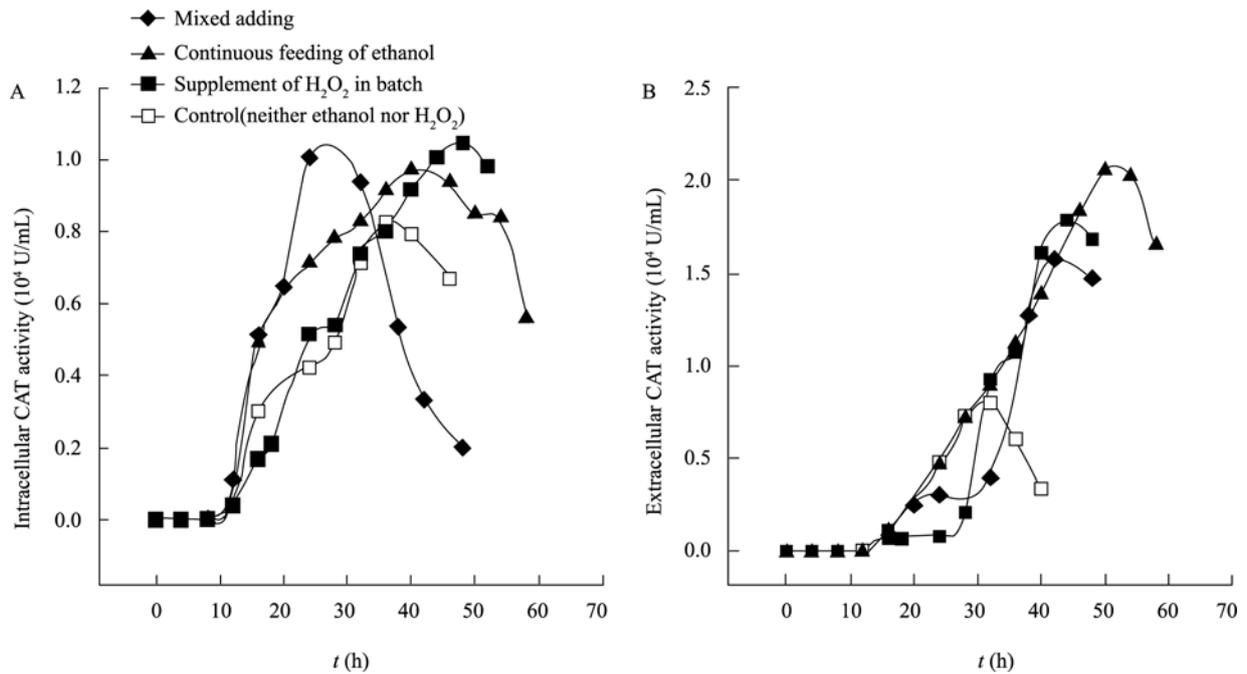


图 8 不同方式活性氧胁迫对胞内酶活(A)和胞外酶活(B)的影响

Fig. 8 Effect of different adding modes of oxidative stress on intracellular(A) and extracellular(B) CAT activity.

(b);  $H_2O_2$  胁迫 (c) 为对照, 研究了 *Bacillus* sp. WSHDZ-01 在持续乙醇和  $H_2O_2$  胁迫下过量合成过氧化氢酶(3 L 发酵罐)的过程, 结果如图 8 所示。发现混合添加胁迫物时:

1) 发酵 10 h 后胞内酶活迅速提高, 在 28 h 达到最大值 11 000 U/mL, 而在  $H_2O_2$  的胁迫下胞内酶活虽达 10 480 U/mL, 但发酵周期延长了 20 h, 生产强度大幅降低; 2) 促使胞内过氧化氢酶高效分泌到胞外, 胞外酶占总酶活比例达到 82.5%, 比对照 a、b、c 分别提高了 59%、16.5%、31%。乙醇连续胁迫下胞外酶活占总酶活的比例最低, 胞外酶活达到最高值的时间延长至 50 h; 3) 发酵进行到 34 h 时过氧化氢酶开始快速向胞外分泌, 44 h 时胞外酶活占总酶活的 80%; 4) 发酵周期为 42 h, 比对照 a 延长了 6 h, 比对照 b 和 c 分别缩短了 8 h 和 6 h; 5) 过氧化氢酶生产强度达到 470 U/(mL·h), 比不添加胁迫物的情况提高了 18.6%。

### 3 结论

采用活性氧胁迫 *Bacillus* sp. WSHDZ-01 过量合成过氧化氢酶发现, 在培养体系添加 2.0%(V/V)乙醇能有效地促进胞内过氧化氢酶的合成, 而添加 0.3%(V/V)  $H_2O_2$  则使过氧化氢酶向胞外分泌。

*Bacillus* sp. WSHDZ-01 在同时受乙醇和  $H_2O_2$  持续胁迫时, 胞外酶比例(82.5%)和生产强度[470 U/(mL·h)]均达到最大, 发酵周期缩短为 42 h。实现了过氧化氢酶的高酶活(28 990 U/mL)和高生产强度[470 U/(mL·h)]的统一, 为过氧化氢酶的工业化生产奠定了基础。

### REFERENCES

- [1] Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1998, **14**: 1511–1527.
- [2] Li Q, McNeil B, Harvey ML. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Free Radical Biol Med*, 2008, **44**: 394–402.
- [3] Sun CP, Zhang JZ, Duan SJ. Free Radical Biological Introduction. Beijing: University of Science and Technology of China Press, 1999.  
孙存普, 张建中, 段绍瑾. 自由基生物学导论. 北京: 中国科学技术大学出版社, 1999.
- [4] Zhuge J, Wang ZX. Industry Microorganism Experimental Technology Manual. Beijing: China Light Industry Press, 1994.  
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.
- [5] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol*, 1984, **105**: 121–126.
- [6] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*, 1959, **31**:

- 426-428.
- [7] Fiedurek J, Gromada A. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *J Appl Microbiol*, 2000, **89**: 85-89.
- [8] Fang F, Li Y, Du GC, *et al.* Thermo-alkali-stable catalase from *Thermoascus aurantiacus* and its potential use textile bleaching process. *Chin J Biotech*, 2004, **20**: 424-427.  
方芳, 李寅, 堵国成, 等. 一株嗜热子囊菌产生的碱性耐热过氧化氢酶及其应用潜力. *生物工程学报*, 2004, **20**: 424-427.
- [9] Dowds BCA. The oxidative stress response in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **124**: 255-264
- [10] Yan GL, Hua ZZ, Du GC, *et al.* Adaptive response of *Bacillus* sp. F26 to hydrogen peroxide and menadione. *Curr Microbiol*, 2006, **52**: 238-242.
- [11] Watts RJ, Washington D, Howsawkung J. Comparative toxicity of hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and superoxide anion to *Escherichia coli*. *Adv Environ Res*, 2003, **7**: 961-968.
- [12] Zhao ZJ, Hua ZZ, Liu DR, *et al.* Screening, identification and fermentation optimization of a alkaline catalase-producing strain. *Microbiology*, 2007, **34**: 667-669.  
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**: 667-669.
- [13] Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979, **59**: 527-605.
- [14] Folmer V, Pedroso N, Matias AC, *et al.* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1778**: 1141-1147.

## 核酸探针两小时检出新的甲型 H1N1 流感病毒

军事医学科学院 5 月 2 日宣布, 针对新的甲型 H1N1 流感病毒, 该院成功研制出具有自主知识产权的“复合探针”核酸检测试剂盒。北美流感疫情出现后, 总后卫生部紧急启动应急科研机制并部署应急科技攻关任务。军事医学科学院作为全军疾病预防控制的龙头力量, 根据军委、总部首长的指示要求, 发挥专家和技术优势, 针对新的甲型 H1N1 病毒的特点开展了多项相关研究, 部分研究工作目前已取得突破性进展。

该试剂盒是针对甲型流感病毒基因的特异性变异位点, 用核酸探针进行检测, 具有灵敏度高、检测速度快的优点, 可在两小时内完成样本检测过程。同时, 考虑到甲型 H1N1 病毒可能发生的变异, 研究小组经过连夜验证, 获得了三套特异性探针, 即使流感病毒检测位点的基因出现变异, 也可以确保不出现漏检情况。

该方法采用了具有自主知识产权的“复合探针”技术, 关键技术已获国家发明专利, 是国内在实时荧光 PCR 方面唯一取得国家专利的技术, 根据该技术研制的 8 种烈性病原体检测试剂盒均已注册申报。该试剂盒特异性强, 目前正加紧进行批量装配, 可立即投入使用。同时, 正在研制中的用于甄别甲型 H1N1 流感病毒及其耐药性的基因芯片也已取得重要进展, 将于近日完成。

军事医学科学院是国内开展此类研究的优势单位, 曾在非典、禽流感等重大传染病防治中发挥过重要作用。新的甲型 H1N1 流感病毒检测技术的成功开发是该院取得的又一项重大成果, 将为我国应对潜在疫情提供有力武器。

来源: 科学时报  
2009-5-4