

一株口腔链球菌新种——寡发酵链球菌产过氧化氢特性的研究

陈 伟^{1,2}, 佟卉春¹, 东秀珠^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

(² 新疆塔里木大学动物科技学院 阿拉尔 843300)

摘 要 :从健康人口腔中分离的寡发酵链球菌(*Streptococcus oligofermentans*)能够产生大量的过氧化氢,可能具有抑制致病菌的潜力。为了研究该细菌产过氧化氢的特性,检测了其在不同生长时期和从不同底物产过氧化氢的能力。结果表明,寡发酵链球菌从对数生长早期就开始产过氧化氢,在对数生长后期及稳定期过氧化氢产量达到最高,随后下降。在 PYG 培养基中,寡发酵链球菌所产的过氧化氢主要来源于大豆蛋白胨和酵母提取物,而代谢终产物乳酸也可作为过氧化氢产生的底物。对 3 种可能与过氧化氢生成有关的氧化酶的酶活测定表明,寡发酵链球菌具有乳酸氧化酶(LOX)及 NADH 氧化酶(NOX)的活性,说明其过氧化氢的产生主要依赖于这两种酶的活力。

关键词 :寡发酵链球菌;过氧化氢;乳酸氧化酶;NADH 氧化酶

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)05-0820-03

链球菌是一类兼性厌氧细菌,它的代谢能量主要依赖于糖酵解,乳酸是其主要终产物^[1]。链球菌自身不能合成有氧代谢所需的大多数酶类如细胞色素氧化酶或过氧化氢酶^[2,3]。但在氧存在时,它们能将氧还原成超氧阴离子(O₂⁻)或过氧化氢。自从 McLeod 和 Gordon^[4,5]首先报道肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)产过氧化氢后,其它学者也相继发现许多口腔链球菌,如血链球菌(*Streptococcus sanguis*)、轻链球菌(*Streptococcus mitis*)及口腔链球菌(*Streptococcus oralis*)等均能产生过氧化氢^[6-9]。Thompson 和 Johnson 曾报道唾液的抑菌活性则是口腔链球菌所产的过氧化氢所致^[10]。而目前所公认的与健康牙菌斑组成相关的血链球菌(*Streptococcus sanguis*)之所以能拮抗主要的致龋菌——变型链球菌(*Streptococcus mutans*)而具有延缓牙龋发生的作用,与它产生较大量的过氧化氢有关。因此,口腔链球菌能否产生过氧化氢,与清洁口腔及预防牙龋有重要的关系。

本实验室曾从健康人的牙菌斑中分离到一株新的口腔链球菌——寡发酵链球菌(*Streptococcus oligofermentans*)^[11]。该菌株能产生大量的过氧化氢,比其它已报道的口腔链球菌所产的都要高^[5],可能具有抑制致病菌的潜力。本文对该菌株产过氧化氢的特性进行了研究,并分析了其过氧化氢形成的可能途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养条件:寡发酵链球菌(*Streptococcus oligofermentans* LMG 21532)是本实验室于 2003 年从健康人口腔中分离的链球菌菌株^[11]。采用培养基为 PYG(蛋白胨-酵母提取物-葡萄糖)^[12]及成品 BHI 培养基(脑心浸出液培养基, Oxoid), 37℃ 对菌株进行培养。

1.1.2 主要试剂及仪器:4-氨基安替吡啉(Sigma), 酚(Sigma), 辣根过氧化物酶(Roche), 福林酚(Sigma), 大豆蛋白胨(北京双旋微生物培养基制品厂), 胰蛋白胨及酵母提取物(OXOID), 黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD, Sigma), 焦磷酸硫胺素(TPP, Sigma), 还原型辅酶Ⅰ(NADH-二钠, Sigma), 721 分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 过氧化氢的定量检测

1.2.1 过氧化氢标准曲线的制备:以磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.2)作稀释液,将 30% 过氧化氢稀释为 0.40 ~ 8μg/mL 等不同浓度的标准溶液(新鲜配制),取标准溶液 1.3mL,加酚试剂 1.2mL,混匀,室温反应 4min 后加 1μL 辣根过氧化物酶(0.5μg/μL),混匀并反应 4min 后测定 OD₅₁₀ 值,绘制过氧化氢浓度(M, μg/mL)与 OD₅₁₀ 的回归方程。

1.2.2 培养液过氧化氢的定量检测:用文献^[13,14]改良的方法进行测定。取一定体积的细菌培养液,13000r/min 离心 2min,取上清,按一定比例稀释后测定 OD₅₁₀ 值,然后根据标准曲线计算过氧化氢的含量。

1.3 寡发酵链球菌不同生长期与过氧化氢产生的关系

将甘油冻存的寡发酵链球菌用 BHI 培养基活化,过夜培养后待 OD₆₀₀ 值达到 1.05 时,以 1% 的接种量接种于 100mL 的 PYG 培养基中,不同时间点取样摇培(150r/min)30min 后测 H₂O₂。

1.4 寡发酵链球菌以不同底物产过氧化氢的测定

按 1.3 所述菌株活化的方法,以 4% 的接种量将寡发酵链球菌的 BHI 培养物接种于 50mL 的 PYG 培养基中,培养 7h 后 OD₆₀₀ 值达 1.05。分别取 1mL 培养物离心收集细胞,用 PBS(pH7.2)1mL 洗涤细胞沉淀 3 次,再分别悬于 1mL 的大豆蛋白胨(5g/L),乳酸钠(20mmol/L),酵母提取物(10g/L),蔗糖

基金项目:国家自然科学基金(30428025)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62558320; E-mail: dongxz@sun.im.ac.cn

作者简介:陈 伟(1975-),女,新疆阿拉尔人,博士研究生,主要从事口腔微生物生态及细菌间相互作用的研究。E-mail: chenweialar@163.com

收稿日期:2005-11-18;接受日期:2005-12-19;修回日期:2006-04-04

(10g/L) 葡萄糖(10g/L) 胰蛋白胍(5g/L) 及丙酮酸钠(20mmol/L) 中, 37℃ 摇培(150r/min) 30min 后离心测上清的过氧化氢含量。

1.5 与过氧化氢产生有关的氧化酶活力测定

1.5.1 透性化细胞的制备:按照文献[14], 稍加改良后进行。将寡发酵链球菌的 BHI 培养物接种于 50mL PYG 培养基中, 静置 2h 后 100r/min 摇培。OD₆₀₀ 值达 0.3 以上时, 离心收集菌体, 用磷酸钠缓冲液(pH7.0) 洗涤细胞沉淀 3 次后重悬于一定体积的相同缓冲液中, 使终体积达 2.5mL, 按 20μL/mL 的量加入透化剂甲苯, 轻微振荡 1min, 即制成透性化细胞。

1.5.2 乳酸氧化酶(LOX) 丙酮酸氧化酶(POX) 及 NADH 氧化酶(NOX) 活力测定:参照文献[14] 改良后进行。乳酸氧化酶及 NADH 氧化酶反应体系包括 300μL 透性化细胞, 1.8mL 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.0), 其中含有 5mmol/L 乳酸钠或 13mmol/L NADH 及 4.8μmol/L FAD。丙酮酸氧化酶反应体系包括 300μL 透性化细胞, 1.8mL 磷酸钾缓冲液(pH6.0), 其中含有 5mmol/L 丙酮酸钠、0.1mmol/L MgCl₂、14.4μmol/L FAD 及 2.17μmol/L TPP。加入透性化细胞起始反应, 37℃ 摇培(150r/min) 20min。加入 36μL 5mol/L HCl 终止反应, 13000r/min 离心 10min, 取 0.5 mL 上清, 加入 43μL 1mol/L NaOH 中和上清, 按 1.2 测定过氧化氢的含量, 以每分钟形成过氧化氢的 nmol 数(nmol/min) 表示酶的活力。

1.5.3 细菌全细胞蛋白的测定:参照文献[15], 根据标准曲线计算样品中蛋白质含量。

2 结果

2.1 寡发酵链球菌的生长与过氧化氢产生的关系

溶液中的过氧化氢浓度与 OD₅₁₀ 值成线性正相关, 回归方程为: $M = (A + 0.0079) \cdot 0.1083 (r^2 = 0.9976)$ 。寡发酵链球菌培养物上清液中的过氧化氢含量随着其生长而增加, 在对数生长早期(约 5~7h) 产率最高, 对数生长后期及稳定期(约 8~10h) 过氧化氢的产量达到最高(75.33 ± 1.31 μg/mL), 随后下降(图 1)。

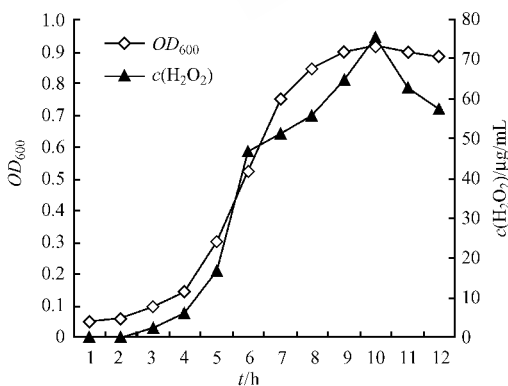


图 1 寡发酵链球菌不同生长时期与 H₂O₂ 产生的关系

Fig.1 H₂O₂ production by *S. oligofermentans* during growth period.

2.2 寡发酵链球菌从不同底物产过氧化氢的比较

以大豆蛋白胍(5g/L) 胰蛋白胍(5g/L) 酵母提取物(10g/L) 葡萄糖(10g/L) 蔗糖(10g/L) 乳酸钠(20mmol/L) 及丙酮酸钠(20mmol/L) 为底物, 检测寡发酵链球菌产过氧化氢的能力。结果表明, 在好氧状态下, 上述浓度的底物产过氧化氢(μg/mL) 由高至低的顺序为: 5g/L 大豆蛋白胍(104.49 ± 2.61) 20mmol/L 乳酸钠(79.56 ± 3.92) 10g/L 酵母提取物

(74.94 ± 2.61) 10g/L 蔗糖(50.01 ± 1.31) 10g/L 葡萄糖(28.77 ± 5.22) 5g/L 胰蛋白胍(1.25 ± 0.26)。以 20mmol/L 丙酮酸钠为底物时, 没有检测到过氧化氢。说明在 PYG 培养基中, 寡发酵链球菌产过氧化氢的主要来源是培养基中的大豆蛋白胍、酵母提取物, 其次是葡萄糖。

2.3 与过氧化氢产生有关的氧化酶

在寡发酵链球菌的细胞中检测到了 LOX 及 NOX 的活力, 其活性分别为 82.48 ± 7.07 nmol H₂O₂/min·mg 蛋白及 41.88 ± 0.42 nmol H₂O₂/min·mg 蛋白。但没有检测到 POX 活力。说明寡发酵链球菌的过氧化氢主要是由 LOX 氧化乳酸和 NOX 氧化 NADH 而生成。

3 讨论

本实验结果表明寡发酵链球菌能产生大量过氧化氢, 而且过氧化氢的产生与其生长期及生长速度密切相关。当处于生长旺盛阶段, 过氧化氢的产生量增高, 但到稳定期后则不再增加。有研究认为唾液中的过氧化氢在口腔清洁及抗菌作用中具有重要意义[10]。在目前已经报道的口腔链球菌中, 血链球菌 ATCC10556 是产过氧化氢较高的菌株(0.28mmol/L), 而本实验室分离到的寡发酵链球菌, 过氧化氢的产生量比血链球菌高 10 倍以上, 最高可达 4.3mmol/L, 同时也高于已报道的其它产过氧化氢的链球菌如肺炎链球菌(1.7mmol/L)[16]。寡发酵链球菌分离自健康人的口腔, 产酸能力较低, 并有较强的表面粘附能力[11], 因此推断该菌在维持口腔生态中可能具有重要意义。

目前, 已知与过氧化氢产生有关的酶有 LOX、POX 及 NOX 3 种主要的氧化酶[17], 它们分别氧化乳酸、丙酮酸及 NADH 而生成过氧化氢。无氧条件下, 葡萄糖代谢产生的中间代谢产物 1,6-二磷酸果糖(FDP) 可激活乳酸脱氢酶(LDH)[18]。链球菌在进行葡萄糖酵解时, 用 2 分子 NADH 将丙酮酸还原为乳酸, 因此乳酸的产生消耗了 NADH 而减少了过氧化氢生成的底物。有氧条件下, 糖酵解产生的 2 分子 NADH 不会被 LDH 氧化, 而由 NOX 氧化产生过氧化氢, 同时积累的乳酸也被乳酸氧化酶氧化形成乙酸并产生过氧化氢。在检测不同底物产过氧化氢的实验中, 我们发现乳酸钠对寡发酵链球菌产生过氧化氢有明显的刺激作用, 并且在酶活力测定中, 也检测到了较高活力的乳酸氧化酶活性, 说明寡发酵链球菌所产的过氧化氢部分来源于葡萄糖的发酵产物乳酸。

丙酮酸钠抑制寡发酵链球菌过氧化氢产生的原因可能是高浓度的丙酮酸钠激活了 LDH[18], 使糖酵解中产生的 NADH 用于还原丙酮酸产生乳酸而减少了产过氧化氢的底物, 同时, 由于 LOX 催化乳酸氧化为丙酮酸产生过氧化氢[19], 因此丙酮酸浓度的增加会反馈抑制 LOX 的活性, 从而导致过氧化氢的生成减少。另外, 在寡发酵链球菌中没有检测到 POX 的活性, 因此丙酮酸钠的加入, 对过氧化氢的产生无促进作用。有文献报道, 在培养基中加入丙酮酸钠能克服过氧化氢对生长的抑制[20], 这可能和寡发酵链球菌的反应机制相同。以葡萄糖为底物时, 寡发酵链球菌所产的过氧化氢远低于乳酸钠作底物的过氧化氢, 也说明在葡萄糖的代谢过程中, 1,6-二磷酸果糖的产生激活了 LDH, 使还原当量 NADH 更多地用于乳酸的形成而导致过氧化氢的生成减少。尽管蛋白胍、酵母提取物能刺激寡发酵链球菌产生较多的过氧化氢, 但由于其组分复杂, 因此其刺激机理尚无法进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Cole JA. A biochemical approach to the control of dental caries. *Biochem Soc Trans*, 1977, **5**: 1232 – 1239.
- [2] Dolin MI. Cytochrome-independent electron transport enzymes of bacteria. In: Gunsalus IC, Stanier RY. ed. *The Bacteria*, vol 2. New York: Academic Press, 1961, 425.
- [3] Thomas EL, Pera KA. Oxygen metabolism of *Streptococcus mutans*: uptake of oxygen and release of superoxide and hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, 1983, **154**: 1236 – 1244.
- [4] McLeod JW, Gordon J. Production of hydrogen peroxide by bacteria. *Biochem J*, 1922, **16**: 499 – 504.
- [5] Mendoza AG, Liebana J, Castillo AM, *et al.* Evaluation of the capacity of oral streptococci to produce hydrogen peroxide. *J Med Microbiol*, 1993, **39**: 434 – 439.
- [6] Holmberg K, Hallander HO. Production of bactericidal concentrations of hydrogen peroxide by *Streptococcus sanguis*. *Arch Oral Biol*, 1973, **18**: 423 – 434.
- [7] LeBien TW, Bromel MC. Antibacterial properties of a peroxidogenic strain of *Streptococcus mitior* (*mitis*). *Can J Microbiol*, 1975, **21**: 101 – 103.
- [8] Vernazza TR, Melville TH. Inhibitory activity of *Streptococcus mitis* against oral bacteria. *Microbios*, 1979, **26**: 95 – 101.
- [9] Willcox MDP, Drucker DB. Partial characterisation of the inhibitory substances produced by *Streptococcus oralis* and related species. *Microbios*, 1988, **55**: 135 – 145.
- [10] Thompson R, Johnson A. The inhibitory action of saliva on the diphtheria bacillus: hydrogen peroxide, the inhibitory agent produced by salivary Streptococci. *J Infect Dis*, 1951, **88**: 81 – 85.
- [11] Tong HC, Gao XJ, Dong XZ. *Streptococcus oligofermentans* sp. nov., a novel oral isolate from caries-free humans. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**: 1101 – 1104.
- [12] Scardovi V. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986, 1418 – 1434.
- [13] Gopalan KV, Srivastava DK. Inhibition of acyl-CoA oxidase by phenol and its implication in measurement of the enzyme activity via the peroxidase-coupled assay system. *Anal Biochem*, 1997, **250**: 44 – 50.
- [14] Seki M, Iida K, Saito M, *et al.* Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. *J Bacteriol*, 2004, **186**: 2046 – 2051.
- [15] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265 – 275.
- [16] Bolm M, Jansen WTM, Schnabel R, *et al.* Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans*: a common feature of different streptococcal species. *Infect Immun*, 2004, **72**: 1192 – 1194.
- [17] Teyssset CM, Torre FD, Garel JR, *et al.* Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 262 – 267.
- [18] Yamada T, Carlsson J. Regulation of lactate dehydrogenase and change of fermentation products in Streptococci. *J Bacteriol*, 1975, **124**: 55 – 66.
- [19] Streitenberger SA, Lopez-Mas JA, Sanchez FA, *et al.* Use of dye affinity chromatography for the purification of aerococcus viridans. *Biotechnol Prog*, 2002, **18**: 657 – 659.
- [20] Carlsson J, Iwami Y, Yamada T. Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Infect Immun*, 1983, **40**: 70 – 80.

Characterization of hydrogen peroxide production by a novel oral streptococci , *S. oligofermentans* isolated from human oral cavity

CHEN Wei^{1,2}, TONG Hui-chun¹, DONG Xiu-zhu^{1*}

(¹ Microbial Resources State Key Laboratory, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(² College of Animal Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, China)

Abstract : High level of hydrogen peroxide was produced by *S. oligofermentans*, a novel oral streptococcus isolated from human oral cavity previously in our laboratory. To characterize the hydrogen peroxide production by *S. oligofermentans*, hydrogen peroxide yields at different growth phases and from different substrates were assayed. The results turned out that hydrogen peroxide production started at the beginning of logarithmic phase, and reached the maximal yield at the early stationary phase. Peptone and yeast extract could be the main substrates for hydrogen peroxide production. Moreover, lactate, as a fermentative product of glucose, can be another substrate for hydrogen peroxide production. Furthermore three oxidases activities possibly associated with H₂O₂ production were assayed, and both activities of lactate oxidase and NADH oxidase were detected under aerobic condition, while pyruvate oxidase activity was not detected in the permeabilized cells of *S. oligofermentans*, implying that *S. oligofermentans* could mainly rely on the two enzymes activities for H₂O₂ production.

Keywords : *Streptococcus oligofermentans*; Hydrogen peroxide; Lactate oxidase; NADH oxidase

Foundation item: Chinese National Natural Science Fund (30428025)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62558320; E-mail: dongxz@sun.im.ac.cn

Received: 18 November 2005/Accepted: 19 December 2005/Revised: 4 April 2006