

江南大学

---

硕士学位论文

---

Bacillus subtilis WSHDZ-01产过氧化氢酶的提取、纯化及性质研究

---

姓名：姚海勇

---

申请学位级别：硕士

---

专业：环境工程

---

指导教师：华兆哲;陈坚

---

20080601

## 摘要

过氧化氢酶 (Catalase, 简称 CAT), 能够催化  $H_2O_2$  分解为  $H_2O$  和  $O_2$ , 被广泛用于食品消毒、临床分析、医学诊断以及纺织、造纸、制浆等工业。随着环保意识的加强, 在纺织染整工艺中采用酶替代传统的强碱高温工艺对棉织物进行前处理已得到了广泛的应用。过氧化氢酶在棉织物前处理过程中的主要作用是去除织物漂白废液中残余的  $H_2O_2$ , 以消除对后续染色工序的影响。

本论文研究了 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 胞内过氧化氢酶的化学提取、纯化方法及其酶学性质, 并通过添加各种稳定剂增强过氧化氢酶应用的稳定性。

主要研究结果如下:

(1) 采用氯仿冲击法来释放 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 胞内 CAT, 在  $37^\circ\text{C}$  条件下  $20\ \mu\text{L}$  氯仿处理  $0.01\ \text{gDCW}$  菌体  $30\ \text{min}$ , 在水溶液中渗透  $60\ \text{min}$  后释放 CAT 的酶活, 可以达到超声波破碎的  $85\%$  以上。

(2) 粗酶液经乙醇分级沉淀、DEAE 阴离子交换层析柱、疏水层析柱后, 所得过氧化氢酶样品的比酶活由  $1982.4\ \text{U/mg}$  提高到了  $13563.8\ \text{U/mg}$ , 纯化倍数为  $6.8$ , 回收率达到  $32.5\%$ 。该过氧化氢酶的亚基分子量为  $63\ \text{kD}$ , 在  $405\ \text{nm}$  处显示特征吸收峰 (Soret band), 推测含有血红素。计算获得酶的表现米氏常数为  $26.87\ \text{mmol/L}$ 。该过氧化氢酶不受低亚硫酸钠的还原作用影响, 但被氧化物、叠氮化物和 3-氨基-1,2,4-三唑 (单功能过氧化氢酶的专一抑制剂) 强烈抑制。以邻苯二胺作为电子供体测定酶活时, 该酶不显示氧化物酶活性, 因此, 将该过氧化氢酶定性为单功能过氧化氢酶。

(3) *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT 在 pH 5-10 的范围内催化活性基本上不受 pH 的影响, 最适 pH 为 12, 并且在 pH 6-11 的范围内表现出良好的稳定性,  $25\ ^\circ\text{C}$  条件下放置  $60\ \text{min}$  后基本没有酶活损失。最适酶促反应温度为  $55\ ^\circ\text{C}$ ; 酶的热稳定性实验表明, 该酶在  $50\ ^\circ\text{C}$  以下相当稳定, 保温  $60\ \text{min}$  后的酶活基本保持不变。

(4) 研究了在 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT 中添加糖类、多羟基醇类、金属离子、阴离子和其他一些化学物质对酶应用稳定性的影响, 在添加  $500\ \text{mmol/L}$  乙酸钠、 $500\ \text{mmol/L}$  硫酸钠和  $50\%$  乙二醇和聚乙二醇后, 都可以将酶液在  $60\ ^\circ\text{C}$  下保温  $15\ \text{min}$  后的残余酶活提高至  $80\%$  以上。

(5) 而通过在各温度下对 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT 失活过程的研究发现, 原酶的热失活过程更符合一级失活模型, 而在添加乙酸钠和硫酸钠后的该酶的失活过程则符合二级失活模型。通过热力学性质研究, 可以发现原酶不仅在相对高温条件下稳定性较差, 并且其稳定性随着温度改变而变化较大, 而添加两种稳定剂后, 则很大程度上可以提高酶在高温条件下的热稳定性。

**关键词:** 过氧化氢酶、提取、纯化、酶学性质、热稳定性

---

**ABSTRACT**

Catalase can decompose  $H_2O_2$  into  $H_2O$  and  $O_2$  effectively. Physiologically it acts as a regulator of  $H_2O_2$  levels in organelles and protect organism from the damage of reactive oxygen species. Catalases from various sources are utilized in several applications, such as diseases diagnosis and removal of hydrogen peroxide in food sterilization. Catalase is used in removal of hydrogen peroxide in the textile pretreatment as a substitute for high-temperature water washing and using chemical reducing agents.

In this study, we investigated the methods for extraction, purification and characterization of a catalase from *Bacillus subtilis* WSHDZ-01. And be intended to improve the thermostability of the catalase by using additives. The main results were given as follows:

(1) The *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 cells were permeabilized by the method of chloroform shock. Experimental results showed that, under the biomass condition of 0.01 g DCW, addition of 20  $\mu$ L chloroform, treating 30min, and permeation in water for 60 min at 37°C, the release of catalase was up to 85 % of total.

(2) The purification was performed with a three-step procedure consisting of ethanol precipitation, DEAE ion exchange and hydrophobic interaction chromatography, and finally achieved a 6.8-fold-purifying over the crude extract. SDS-PAGE of the purified catalase revealed the final presence of a single band at an apparent molecular mass of 63 kD. The native enzyme showed the typical Sort band appearing at 405 nm, which indicated that the purified catalase is a heme-containing enzyme. The apparent  $K_m$  value for enzyme activity on  $H_2O_2$  was calculated to be 26.87 mmol/L. The activity of this catalase was not reduced by dithionite but was strongly inhibited by cyanide, azide and 3-amino-1, 2, 4-triazole (the specific inhibitor to monofunctional catalase). No peroxidase activity of this enzyme was detected when using p-phenylenediamine as an electron donor. Therefore, it suggested that this catalase belonged to monofunctional catalases.

(3) Besides, this catalase was thermosensitive, and its activity exhibited pH-independently between pH 5-10 but showed a sharp maximum at pH 11-12. No activity was lost when the enzyme was incubated at 25 °C and pH 11 for 60 min. The catalase reacted best at 55 °C, and it is quite stable when maintained at below 50°C.

(4) Sugars, polyols, metal ions, anions and other chemical materials were added in catalase solution to improve its stability. The remaining activity of CAT when maintained at 60 °C for 15 min was increased to 80 % in the presence of 500 mmol/L sodium acetate, 500 mmol/L sodium sulfate, 50 % ethylene glycol and 50 % PEG..

(5) According to the study, the deactivation process at different temperatures of the native CAT is followed the first inactivation order. But it is followed second inactivation order in the presence of sodium acetate and sodium sulfate. Through the study of the thermodynamic properties, we found that the thermostability of native catalase was poor at high temperature. It was improved greatly in the presence of the two additives, but it showed great variation at different temperatures as well as in the absence of them.

**Key words:** catalase, extraction, purification, characterization, thermostability

# 独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得江南大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

签 名: 张海宁 日 期: 2008.6.21

## 关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解江南大学有关保留、使用学位论文的规定：江南大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，并且本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

签 名: 张海宁 导师签名: 华水哲  
日 期: 2008.6.21

# 第一章 绪论

## 1.1 过氧化氢酶的研究

### 1.1.1 过氧化氢酶的概述

过氧化氢酶 (catalase, CAT, EC1.11.1.6) 的研究可追溯到 19 世纪初。Thenard(1811) 首先发现过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 可以被动、植物组织分解产生氧气, Schonbein (1863) 认为是某种酶在起作用。1901 年, Loew<sup>[1]</sup> 将该酶命名为过氧化氢酶 (Hydrogen Peroxidase), 又称触酶。Stern (1936) 证明卟啉环是 CAT 活性中心, 其后 Summer 和 Dounce<sup>[2]</sup> 首次从牛的肝脏中分离得到过氧化氢酶的结晶, Herbert 和 Pinsent (1948) 则从藤黄微球菌 (Mluteus) 获得了原核 CAT。随后大量研究发现 CAT 广泛存在于动物、植物和微生物中, 动物肝脏、红细胞、植物叶绿体以及细菌、真菌、放线菌等中含有大量 CAT。

过氧化氢酶以过氧化氢为专一底物, 通过催化一对电子的转移而最终将其降解为水和氧气。因为所有的好氧生物在进行氧代谢时均会产生有害的氧自由基, 这其中就包括  $H_2O_2$ , 因此, 过氧化氢酶是生物抗氧化体系中的重要成员酶, 其与体系中其它成员的相互关系见图 1-1。

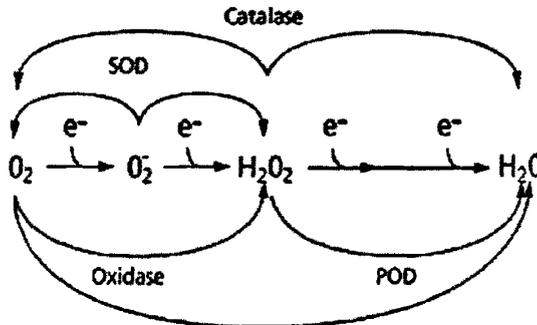


图 1-1 生物抗氧化体系的协同作用

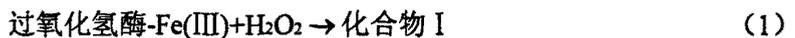
Fig.1-1 The cooperative function of anti-oxidative stress system in organisms

### 1.1.2 过氧化氢酶的分类及主要性质比较

到目前为止, 学术界根据过氧化氢酶在结构和序列水平上的异同将其划分为三个亚群, 即单功能过氧化氢酶 (Monofunctional catalase or Typical catalase), 双功能过氧化氢酶 (Catalase-Peroxidase) 和假过氧化氢酶 (Pseudocatalase or Mn-catalase), 它们各自的典型特征总结于表 1-1。

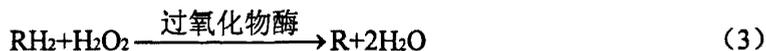
其中过氧化物酶和过氧化氢酶都是两种广泛存在于动植物体内, 含血红素 (铁卟啉) 辅基的氧化还原酶。但由于它们作用的底物都有过氧化氢, 容易将它们混淆。

过氧化氢酶 (Hydrogen Peroxidase), 其催化反应简示如下:



过氧化物酶 (Peroxidase) 也有人简称过氧化酶, 其系统名称是: 供体:过氧化氢氧

化还原酶。国际酶学委员会编号为 EC1.11.1.7, 其催化反应式为:



从两种酶的反应式可以看出, 过氧化氢酶只有一种底物, 反应生成水和氧气; 而过氧化物酶则要两种底物, 其反应的实质是: 酶催化共体脱氢(氧化), 同时催化脱下的氢使  $\text{H}_2\text{O}_2$  还原为  $\text{H}_2\text{O}$ 。在这个反应中, 如果只有  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 没有供体, 反应则不能进行。

表 1-1 过氧化氢酶的分类<sup>[3-10]</sup>

Tab.1-1 Classification of catalases

	单功能过氧化氢酶	双功能过氧化氢酶	锰过氧化氢酶
来源	古细菌、细菌、真菌、植物、动物	古细菌、细菌、真菌	细菌、古细菌
亚基分子量	小亚基 55-69 kD 大亚基 75-84 kD	60-85 kD	33-34 kD
多聚体	同源四聚体	同源二、四聚体	同源四、六聚体
辅基	亚铁血红素	亚铁血红素	锰
催化反应 pH 适应性	在较宽 pH 范围内稳定 (pH independent)	在某一 pH 条件下具有最佳催化活性	
催化反应温度适应性	不敏感	较敏感	
$K_m$	高	低 (<10 mmol/L)	
低亚硫酸钠还原性	否	是	目前不是非常清楚
抑制剂	氰化物、叠氮化物和 3-氨基-1, 2, 4-三唑	氰化物、叠氮化物	
过氧化物活性	否	是	
对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 敏感性	弱	强	
$R_z$	高 (约 1)	低	
序列同源性	早期起源于真核	同过氧化物酶具有较高同源性	同其它蛋白无很大的同源性

### 1.1.3 过氧化氢酶的应用

过氧化氢酶是一种催化效率非常高的生化酶, 在食品、医药、临床等行业一直有着广泛的用途。

#### (1) 临床

在临床分析中, CAT 对研究自由基代谢失衡, 抗衰老和肿瘤发病机理具有一定价值, 对某些疾病的诊断, 鉴别诊断亦具有重要意义<sup>[11-12]</sup>。CAT 可消除  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 对超氧化物歧化酶起保护作用, 因而具有抗衰老作用<sup>[13]</sup>。

#### (2) 医药

由于  $\text{H}_2\text{O}_2$  具杀菌、清洁、漂白及消毒的功效, 常用于器械消毒。如在隐形眼镜消毒过程中添加 CAT 可分解消毒液中残留的  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。国内、外均有研究的专利发表<sup>[14-16]</sup>。

#### (3) 食品加工

CAT 可使食品保鲜, 并作为消除啤酒、饮料中分子氧、活性氧和自由基的抗氧化剂。

与葡萄糖氧化酶并用作氧的去除剂，牛乳杀菌及干酪原料乳的杀菌<sup>[17]</sup>。

#### (4) 其它工业

与  $H_2O_2$  同时使用，用于橡胶成型，塑料及多泡性粘合剂。纸浆、纤维、毛漂白工艺中除残留的  $H_2O_2$ 。加入化妆品中可防止皮肤衰老，还可处理半导体废水。近年来随着  $H_2O_2$  在纺织、造纸、制浆等行业的普遍应用，市场对 CAT 的需求也呈大幅增长趋势。

#### 1.1.4 国内外研究概况

由于工业尤其是纺织工业应用的特殊性，对应用过氧化氢酶耐碱、耐热性提出了的严格要求，而目前市场上商品过氧化氢酶还不能很好的满足这一要求，见表 1-3。

表 1-3 目前市场上主要商品过氧化氢酶的性质比较<sup>[18]</sup>

Table 1-3 Characteristics of main CAT products at present market

生产单位	来源	活性 pH 范围	热稳定性
江苏绿康生物公司	猪肝	6.0~8.0	30~50℃
诺维信公司	黑曲霉	6.0~9.0	20~50℃
杰能科公司	重组大肠杆菌	3.0~9.0	30~65℃

到目前为止，关于嗜碱和嗜热微生物过氧化氢酶的研究报道仍极为有限。

1973年，Horikoshi<sup>[19]</sup>发表了第一篇有关碱性过氧化氢酶的文章，其来源于从土壤中筛选得到的嗜碱细菌 *Bacillus* No.KU-1，该酶最显著的特点就是外泌。1990年，Yumoto 等人<sup>[20]</sup>从兼性嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* YN-2000 中分离得到了一种双功能过氧化氢酶，同时，他们还定量地研究了过氧化氢酶的合成与该菌培养 pH 之间的关系。1995年，Hicks<sup>[21]</sup>对另一株兼性嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus firmus* OF4 进行了研究，分别纯化了胞内的三种过氧化氢酶同工酶。

另一方面，1998年，Wang<sup>[22]</sup>等发现产纤维素酶和淀粉酶的嗜热子囊菌同样产过氧化氢酶，并且具有相当高的热稳定性。而在2003年，Thomson 等人从黄石公园的70℃的温泉中筛选出一株产新型耐热碱过氧化氢酶的 *Thermus brockianus*。目前，研究中更多的采用分子手段以的获得耐热过氧化氢酶，Kengen 等人<sup>[23]</sup>和王凡强<sup>[24]</sup>等人分别利用一株古细菌和嗜热脂肪芽孢杆菌产过氧化氢酶的基因在大肠杆菌中克隆表达获得耐热过氧化氢酶。

随着氧漂生物净化工艺的提出，研究者们开始从过氧化氢废水中筛选目标菌株。2001年，Gudelj 等人<sup>[25]</sup>从纺织废水中筛选到了一株新的嗜热碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. SF，在对其所产生的双功能过氧化氢酶进行了纯化和酶学性质的研究后认为，该酶具有一定的应用价值，因此，该研究小组即以工业应用为目标又展开了一系列的后续研发工作，如酶的固定化<sup>[26, 27]</sup>及酶的稳定剂<sup>[28]</sup>等。

而江南大学环境生物技术研究室通过筛选获得的嗜热子囊菌<sup>[29]</sup>、*Bacillus* sp.F26<sup>[30]</sup>所产过氧化氢酶都具有较强的碱适应性，不同的是前者的同样具有很好的热稳定性，而后者则是一种低温酶。

## 1.2 胞内酶（蛋白）的提取

生物技术如DNA重组，细胞融合技术，已使应用微生物廉价地大规模生产有价值的生物产品如：胰岛素、葡萄糖苷酶等成为可能，但很多基因重组蛋白是以胞内包涵体形式存在，这些胞内蛋白制品在纯化过程中，由于步骤多、最终效率低，极大提高了生产成本。据统计，在蛋白制品生产中，分离和纯化的费用占总生产费用的80%以上<sup>[31]</sup>。因而开发新型生化分离技术，获得胞内蛋白质已成为工业生产的核心问题。

减轻蛋白质后处理工艺的负荷最根本的方法是尽量减少目标蛋白提取时非目标杂质的混入，传统胞内产物分离纯化的第一步是细胞破碎，破碎方法主要有机械破碎法（高压匀浆法，球磨法，超声波法等）；非机械法（化学渗透法，溶菌酶法等）。其中机械破碎法已广泛应用于大规模工业化生产。但这些方法有其不足之处：（1）大量细胞碎片的产生，使后处理工艺负荷量和难度大大增加；（2）大量核酸类物质的释放时发酵液粘度显著提高，处理时必须先降低体系粘度；（3）在机械法处理时，剧烈的机械作用引起细胞内所有可溶性杂蛋白的释放，给蛋白质纯化带来很大难度<sup>[32]</sup>。从而使蛋白质的后续纯化工艺被复杂化，收率低而且成本提高。

理想的蛋白质提取应是选择地、高效、高速提取蛋白而核酸及其他杂蛋白则保留在细胞内。由于没有细胞碎片，残留细胞可用过滤离心方便地除去。这样可以显著减轻后续工艺的负担。现在已知的开发的选择提取法如下：（1）化学处理提取法；（2）双水相提取法；（3）酶提取法；（4）渗透压冲击提取法；（5）电脉冲提取法；（6）分步、分级提取法<sup>[33]</sup>。

## 1.3 酶（蛋白质）的纯化

### 1.3.1 蛋白质纯化方法

分离蛋白质的目的是多种多样的。研究蛋白质的分子结构、组成和某些物理化学性质，需要纯的均一的甚至是晶体的蛋白质样品。研究活性蛋白质的生物功能，需要样品保持它的天然构象，要尽量避免因变性而丢失活性。在制药工业中，需要把某种具有特殊功能的蛋白质提纯到规定的要求，特别要注意把一些具有干扰和拮抗性质的成分除去。

分离和提纯蛋白质的各种方法主要是利用蛋白质之间各种特性的差异，包括分子的大小和形状、酸碱性质、溶解度、吸附性质和对其他分子的生物学亲和力。

### 1.3.2 蛋白质分离纯化的程序

分离纯化某一特定蛋白质的一般程序可以分为前处理、粗分级和细分级三步<sup>[34,35]</sup>。

#### A 前处理

分离提纯某一蛋白质，首先要求把蛋白质从原来的组织和细胞中以溶解的状态释放出来，并保持原来的天然状态，不丢失生物活性。所以要根据不同的情况，选择合适的方法，将组织和细胞破碎。

动物组织和细胞可用电动捣碎机或匀浆机破碎或用超声波处理法破碎；植物组织和

细胞，由于具有由纤维素、半纤维素和果胶等物质组成的细胞壁，一般需用与石英砂和适当的提取液一起研磨的方法破碎和用纤维素酶处理也能达到目的；细菌细胞的破碎比较麻烦，因为整个细菌细胞壁的骨架实际上是一个借共价键连接而成的肽聚糖的囊状分子，非常坚韧。破碎细菌细胞的常用方法有超声波振荡，与砂研磨、高压挤压或溶菌酶处理等。组织或细胞破碎以后，选择适当的介质（一般用缓冲液）把所要的蛋白质提取出来。

## B 粗分级

当蛋白质混合物提取液获得后，选用一套适当方法，将需要的蛋白质与其他杂蛋白质分离开来。一般这一步的分级用盐析、等电点沉淀和有机溶剂分级分离等力法。这些方法的特点是简便、处理量大，既能除去大量杂质，又能浓缩蛋白质溶液。

## C 细分级

样品经粗分级以后，一般体积较小，杂蛋白大部分已被除去。进一步提纯，一般使用层析法包括凝胶过滤，离子交换层析，离子交换层析以及亲和层析等。必要时还可以选择电泳法，包括区带电泳、等电聚焦等作为最后的提纯步骤。用于细分级的方法一般规模较小，但分辨率高。

### 1.3.3 蛋白质混合物的分离方法

#### A 根据分子大小不同的分离方法

蛋白质分子最明显的特征之一就是颗粒大，并且不同种类的蛋白质在分子大小方面有着一定的差别，因此可以利用一些简便的方法使蛋白质和其他小分子的物质分开，并使蛋白质混合物也得到分离。包括(1)透析和超过滤；(2)密度梯度(区带)离心；(3)凝胶过滤。

#### B 利用溶解度差别的分离方法

利用蛋白质的溶解度的差别来分离各种蛋白质是实践中最常用的方法。影响蛋白质溶解度的外界因素很多，其中主要有：溶液的pH，离子强度、介电常数、温度。但在同一的特定外界条件下，不同蛋白质具有不同的溶解度，这是因为溶解度归根结底取决于他们本身的分子结构，例如分子中极性的亲水基团和非极性的疏水基团的比例，它们在蛋白质分子表面的排列以及由此而产生的偶极矩等。

根据蛋白质分子结构的特点，适当的改变上面所说的外部因素，就可以选择性地控制蛋白质混合物中某一成分的溶解度，作为分离和纯化蛋白质的一种手段。其具体方法包括(1)等电点沉淀和pH控制；(2)蛋白质的岩溶和盐析；(3)有机溶剂分级分离法；(4)蛋白质温度分离法。

#### C 根据电荷不同的分离方法

根据蛋白质的电荷不同即酸碱性质不同分离蛋白质混合物的方法有电泳和离子交换层析两类。包括(1)电泳(SDS-PAGE电泳、等电聚焦、毛细管电泳、离子交换层析)；(2)离子交换层析

#### D 利用选择性吸附纯化方法

某些称为吸附剂的固体物质具有吸附能力，能够将其他种类的分子吸附在自己表面，吸附力的强弱因被吸物质的性质而异。媳妇过程涉及范德华相互作用和氢键这些非离子吸引力，吸附层析就是利用待纯化的分子和杂质分子与吸附之间的吸附能力和解吸性质不同而达到分离目的。典型的吸附剂有硅石（silica）、氧化铝（alumina）和活性炭（activated charcoal）等。硅胶在其表面含有硅烷醇（Si-OH），呈微酸性，它适用于分离碱性物质。氧化铝是微碱性的，适于分离酸性物质。活性炭是一种非极性吸附剂，为了最好分离效果，需要选择合适的洗脱液。一般选择其极性与待分离的混合物中极性最大组分的极性相当的洗脱液。因此，如果待分离物含羟基，则选醇类，含羰基的则选用丙酮或酯类。烃类如己烷、庚烷和甲苯则用于非极性物质分离。

选择性吸附纯化方法主要包括：（1）羟磷灰石层析、（2）疏水作用层析、

#### E 利用对配体的特异生物学亲和力的纯化方法

亲和层析（affinity chromatography）是利用蛋白质分子对其配体分子特有的识别能力，也即生物学亲和力，建立起来的一种有效的纯化方法。它经常只需要经过一步的处理即可将某种所需蛋白从复杂的混合物中分离出来，并且纯度相当高。亲和层析最先用于酶的纯化，并从中得到发展，但现在已广泛地用于核苷酸、核酸、免疫球蛋白、膜受体、细胞器甚至完整的细胞的纯化。应用亲和层析需要有待纯化物质的结构和生物学特异性的知识，以便设计出最好的分离条件。纯化酶时配体可以是底物、可逆抑制剂或者是别构效应物。被选择的条件一般是对酶-底物的结合最适的，因为方法的成功有赖于复合体的可以形成。

亲和层析的基本原理是把有待纯化的某一蛋白的特异配体通过适当的换血反应共价的连接到像琼脂糖凝胶一类的载体表面的功能基（如-OH）上。一般在配体和多糖载体之间插入一段长度适当的连接臂或称间隔臂（Space arm）如 $\epsilon$ -氨基己酸，使配体与凝胶之间保持足够的距离，不致因载体表面的位阻妨碍待分离的分子与配体结合。这类载体在其他性能方面允许蛋白质能自由通过。当蛋白质混合物加到填有亲和介质的层析柱时，待纯化的某一蛋白质则被吸附在含配体的琼脂糖颗粒表面上而其他的蛋白质（称杂蛋白）则因对该配体无特异的结合部位而不被吸附，它们通过洗涤即可除去，被特异结合的蛋白质可用含游离的相应配体溶液把它从柱上洗脱下来（称亲和洗脱）。

凝集素亲和层析、免疫亲和层析、金属螯合层析、染料配体亲和层析和共价层析等都属于亲和层析类。

#### F 高效液相层析和快速蛋白液相层析

高效液相层析（HPLC）实际上是离子交换、分子排阻、吸附和分配等层析技术的发展新阶段。因此一方面它以这些层析的原理为基础，另一方面在技术上做了很大改进，使这些层析有更高的效率、更高的分辨率和更快的过柱速度。HPLC已成为最通用，最有力和最多能的层析形式。

快速蛋白液相层析（FPLC）是专门用于蛋白质分离的。是基于反相、排阻、亲和、疏水作用、离子交换和等电聚焦等层析。

## 1.4 论文的研究意义、目的和主要研究内容

### 1.4.1 研究意义

我国纺织工业规模和产量均居世界第一位，是世界上最大的纺织品生产和出口国。纺织工业中大量合成的染料和化学助剂不仅造成了污染，损害着人们身体健康，还严重制约了我国纺织品的出口。过氧化氢酶可以完全去除在漂白工段上残余的过氧化氢，从而替代传统的处理工艺。因此既节约能耗，又降低污水处理的难度，对纺织工业的清洁生产具有重要的战略意义。

事实上，除了纺织工业以外，在制浆和造纸工业中采用过氧化氢进行漂白也已经十分普遍，如无元素氯漂白（ECF）和全无氯漂白（TCF）工艺<sup>[36]</sup>。据统计，全球每年的过氧化氢用量正以 8 %—10 % 的速度递增<sup>[37]</sup>，这也意味着大量高浓过氧化氢废水的产生，这将给下游的废水处理带来极大的压力，因为过氧化氢作为杀菌剂将破坏下游的活性污泥<sup>[38]</sup>。从这个意义上讲，过氧化氢酶亦能够应用于上述废水的预处理。

此外，过氧化氢酶可用于任何需要安全、快速地清除过氧化氢的场合，因此，其在食品和医疗领域也具有特殊的应用意义。

与此同时，由于细胞蛋白产物的选择性提取所具有的优点使其具有重要的应用前景，如不需要特殊设备，在提取同时可达到纯化目标蛋白的目的，简化了分离工艺。因此，对胞内过氧化氢酶提取的研究，寻找一种经济有效而简便的方法对于实现其最终的工业化应用有重要意义。

另一方面，对于江南大学环境生物技术研究室新筛选出一株过氧化氢酶高产菌，这在增加我们对相应环境中的微生物多样性的认识的同时，通过纯化及性质研究，我们有可能进一步找到具有新生化特性或新分子性质的酶蛋白，这对过氧化氢酶的多样性也是一种积累，具有一定的理论意义。

### 1.4.2 研究目的

本研究室在前期研究中<sup>[39]</sup>从纺织厂废水中分离得到一株产过氧化氢酶菌株，命名为芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01。*Bacillus subtilis* WSHDZ-01 产过氧化氢酶的合适种子培养基：糖度为 6° P 的天然麦芽汁，pH 7.5；发酵培养基：每升含葡萄糖 10 g，NaNO<sub>3</sub> 5 g，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g，Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.52 g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.907 g，FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025 g，pH 7.5。通过前述研究发现，要实现过氧化氢酶的工业化生产，并在棉纺织工业上得到真正的应用，还存在很多问题，本论文的研究目的为：

- (1) 确定一种合适的方法有效的提取胞内过氧化氢酶；
- (2) 通过纯化，并进一步研究过氧化氢酶的分子学性质、酶学性质等；
- (3) 由于从粗酶性质看反应的适宜温度较高，但酶在 55~60℃ 下稳定性很差，因此寻求合适的稳定剂以提高该酶的使用稳定性也是研究中的一个主要目的。

### 1.4.4 主要研究内容

本课题是国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)“工业生物过程的系统控制与

优化”(2007CB714036);教育部新世纪优秀人才支持计划“全酶法纺织清洁生产工艺中新型酶制剂的分子改造与应用技术”;浙江省重点科研工业项目“棉织物酶法前处理中关键酶制剂的开发”(2006C21117),主要研究内容包括:

- (1) 胞内过氧化氢酶提取方法的研究。包括化学试剂、环境条件及其他工艺条件的考察;
- (2) 过氧化氢酶的分选纯化与酶学性质研究。获得合理的蛋白纯化方法,并考察纯化所得的过氧化氢酶分子特性、酶学性质,初步确定其分类;
- (3) 过氧化氢酶的保藏与应用性质研究。主要考察其在保藏过程中和在纺织生产应用中的稳定性。

## 第二章 胞内 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶的提取

### 2.1 引言

酶的提取工艺对下游技术的工业化应用具有直接影响，因此，寻找经济而有效的提取，纯化方法是非常必要的。为了得到细胞内部的产物，就必须克服由于细胞壁、细胞膜存在而形成的渗透壁障。

Novella<sup>[40]</sup>系统地比较了化学渗透法、冻融法、超声法对 *E.coli* 青霉素酰化酶的提取效率的影响。超声法提取总蛋白含量最高，但纯化系数极低。溶菌酶加 EDTA 处理后酶活力最高，但纯化系数仍不高。室温下以胍加 EDTA 处理后酶活力保留 80%，杂蛋白含量很低，纯化系数相当高。Chaib<sup>[41]</sup>等用渗透压冲击和氯仿/胍处理从重组 *E.coli* 中提取人胱氨酸蛋白酶抑制剂 Cystain C，并指出两种方法都有工业应用的前景。

已有文献报道<sup>[42]</sup>采用氯仿冲击法 (Chloroform Shock) 可以有效提取大肠杆菌胞内蛋白，本章对该方法提取 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶进行研究，并考察各种因素对提取效果的影响，同时与超声波破碎效果相比较。

### 2.2 材料与方法

#### 2.2.1 菌种、培养基及培养条件

A. 菌种：*Bacillus subtilis* WSHDZ-01，江南大学环境生物技术实验室保藏。

B. 培养基：种子培养基：糖度为 6° P 的天然麦芽汁，pH 7.5。发酵培养基：葡萄糖 10 g，NaNO<sub>3</sub> 5 g，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g，Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.52 g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.907 g，FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025 g，定容至 1 L，pH 7.5。

C. 斜面及平板培养：37 °C 培养 30 h。种子培养：种子培养基 70 mL 于 250 mL 三角瓶中，接种后在旋转式摇床上，37 °C，转速 200 r/min，发酵培养 12 h。发酵培养：发酵培养基 80 mL 盛于 250 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 37 °C，200 r/min 培养 30 h。

#### 2.2.2 主要仪器

UV2450紫外可见分光光度计	日本岛津
台式高速离心机	美国礼来亚洲公司
PHS—3C 型酸度计	杭州亚美电子仪器厂
回转式恒温调速摇瓶柜	上海医疗工业研究所
电热恒温鼓风干燥箱	上海跃进医疗器械厂
隔水式电热恒温培养箱电泳仪	上海跃进医疗器械厂
立式圆形压力蒸气灭菌锅	上海医用核子仪器厂
制冰机	北京科创百方科技发展有限公司
超声波细胞破碎仪 UP200H	Dr.hiescher GmbH

### 2.2.3 试剂

实验所用化学试剂均为国产分析纯试剂。

### 2.2.4 分析方法

#### A. 过氧化氢酶活测定

采用分光光度法在37℃下测定<sup>[43]</sup>。反应总体积为3 mL, 含0.1 mL酶液样品和2.9 mL含10 mmol/L的50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH 7.0),  $\text{H}_2\text{O}_2$ 的分解速率用UV-2450型紫外可见光分光光度计在240 nm下测定。

酶活定义为: 在37℃下, 分解 $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  所需的酶量为一个酶活单位<sup>[29]</sup>。

$$\text{酶活计算: } \frac{(\Delta\text{OD}_{240}/\Delta t) \times 1000 \times \text{dilution factor} \times \text{volume of mixture}}{43.6 \times \text{volume of enzyme preparation}}$$

43.6 mol/L·cm为 $\text{H}_2\text{O}_2$ 在240 nm下的摩尔消光系数。

#### B. 生物量的测定

取40 mL发酵液于4000 r/min、4℃下离心10 min, 收集湿菌体, 用蒸馏水洗涤1次后, 置105℃下恒温干燥至恒重, 用称重法测定生物量。

#### C. 蛋白质定量测定<sup>[44]</sup>

按照Protein assay dye reagent concentrate的使用说明制作标准曲线及测定, 100  $\mu\text{l}$ 适当稀释的样品中加入5.0 ml 25% (v/v) 的染色试剂, 室温下至少显色5 min后于595 nm下测定吸光度; 以100  $\mu\text{l}$ 水替代蛋白样品作为空白对照, 配制0.1-0.8 mg/ml的牛血清白蛋白溶液制作标准曲线(注: 每次测定均需重新制作标准曲线)。

#### D. SDS-PAGE 垂直平板电泳

SDS-PAGE方法主要参照《蛋白质技术手册》<sup>[45]</sup>, 采用4%浓缩胶, 12%分离胶, 100V恒压电泳。分子量标准为14 kD-97 kD。

#### E. 超声波破碎细胞法

取一定量发酵液4℃、5000 r/min×10 min, 倒去上清液, 菌体以50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH 7.0)洗涤2次, 以适量相同的缓冲液重悬后置冰浴预冷; 超声波破碎10 min, 镜检破碎的效果; 8000 r/min×15 min离心, 上清液即为胞内过氧化氢酶测定样品。

#### F. 氯仿冲击法

取一定量发酵液于离心管, 4℃、5000 r/min×10 min, 倒去上清液, 菌体用50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH 7.0, Buffer A)洗涤, 在同样条件下再次离心, 收集菌体, 在一定温度条件下加入一定量氯仿处理, 再加入一定体积去离子水, 渗透一段时间, 5000 r/min离心10 min, 上清液即为释放出的过氧化氢酶。

## 2.3 结果和讨论

### 2.3.1 氯仿对酶释放的影响

用不同量氯仿处理菌体细胞一定时间后加入2 mL去离子水, 酶的释放过程见图

2-1. 从图中可以看出不同氯仿量、氯仿处理时间和在水溶液中渗透时间都影响着胞内过氧化氢酶的释放。对于 0.01 g 细胞干重 (DCW) 的菌体来说, 氯仿处理量在 20  $\mu\text{L}$  就已足够, 更多的氯仿用量并不会提取跟多的过氧化氢酶或者缩短在水溶液中渗透时间。然而少量的氯仿处理量却不能使得过氧化氢酶得到充分释放, 在加入 10  $\mu\text{L}$  氯仿的情况下, 最高的 CAT 释放率约为  $1250 \times 10^3 \text{ U/g DCW}$ , 并未达到 20  $\mu\text{L}$  或更多氯仿的释放 CAT 最高水平。这主要有以下两方面原因: (一) 较少的氯仿不能使得所有菌体细胞得到有效处理; (二) 较少的氯仿处理并不能使得细胞达到足够渗透透性而阻碍了胞内蛋白的释放。

而氯仿处理时间的不同去很大程度上影响了下步在菌体中 CAT 在水溶液中的渗透时间。20  $\mu\text{L}$  氯仿处理 30 min, 加入 2 mL 去离子水, 渗透 60 min,  $1550 \times 10^3 \text{ U/g DCW}$  以上的 CAT 酶活可以释放至水溶液中。而 CAT 在水溶液中的释放速率会随着氯仿处理时间的增加而增加, 处理 90 min 后, 在水溶液体系中 CAT 很快就达到了最大释放率。这与细胞破坏程度有关, 延长氯仿处理时间使得细胞通透性增加, 而使胞内蛋白更容易的渗透到水溶液中。不过即使氯仿处理菌体只有 10 min, 大量菌体细胞也已经具有了一定通透性, 在 2 ml 水溶液中, 大部分胞内 CAT 也能在 2 小时内释放出来。但作为空白对照, 未经氯仿处理的菌体在水溶液中几乎不释放 CAT, 这充分说明了氯仿在提取过程中的重要作用。

从图 2-1 中也可以看出, 过多的氯仿加入量和处理时间并未使释放的 CAT 有明显损失, 说明胞内 CAT 对氯仿有较强的抗性, 这也是能用氯仿冲击法提取 CAT 的基础。

在这提取过程中水溶液为 CAT 的渗透过程提供了介质, 这样水溶性蛋白很好的能够转移至水溶液中, 并且由于加入水的体积仅为原发酵液的十分之一, 因此在这过程中 CAT 释放的同时也得到了浓缩。而能在水溶液中胞内 CAT 的有效释放, 同样也避免了过多化学物质的加入而带来的不利影响, Hart 等<sup>[46]</sup>就提出为了更佳的提取效率, 过多的化学物质的加入会增加提取液的粘度, 为下步的菌体分离带来不便。

然而综合考虑包括氯仿用量和提取周期在内的提取成本, 在 0.1 g 的生物量情况下, 利用 20  $\mu\text{L}$  氯仿处理菌体 30 min, 并在水溶液中渗透 60 min 是较为合适的提取方案, 在此条件下所释放的 CAT 酶活约为  $1530 \times 10^3 \text{ U/g DCW}$ , 是超声波破碎所释放的 CAT 酶活的 85% 以上。

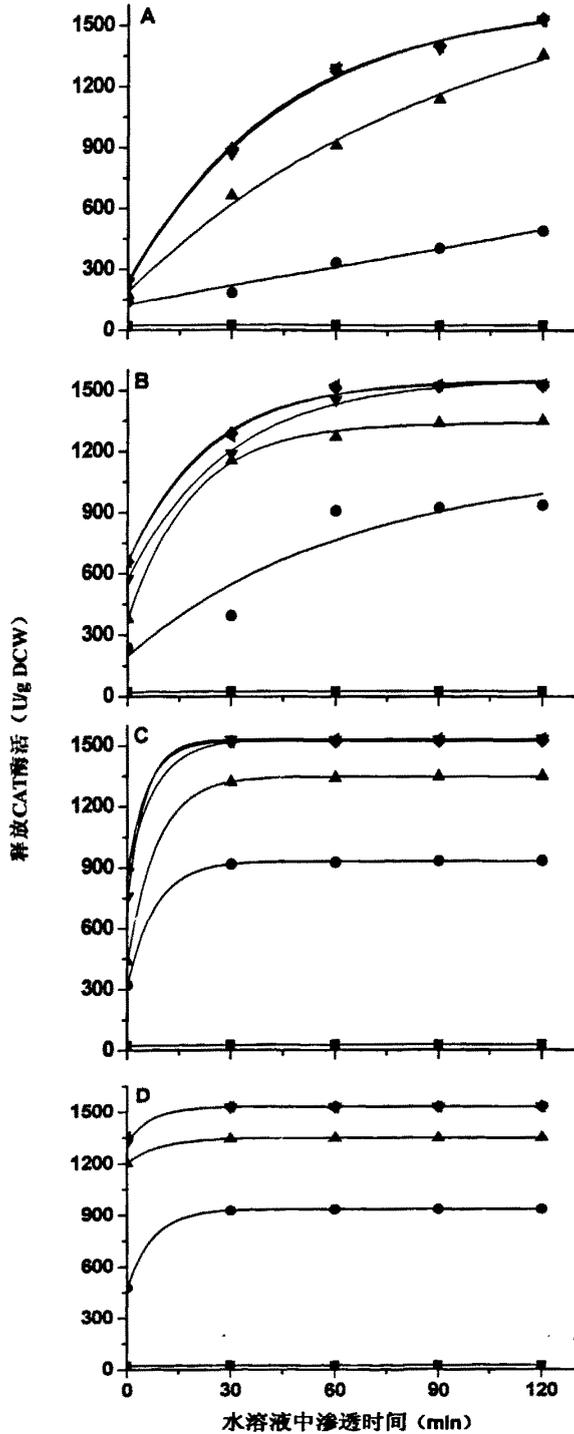


图 2-1 氯仿体积与预处理时间对 CAT 释放的影响

Fig.2-1 Effects of treating time and chloroform volume on CAT release

预处理时间: A 10 min B 30 min C 60min D 90min

氯仿体积: -■- 0 μL -●- 5 μL -▲- 10 μL -▼- 20 μL -◆- 50 μL -►- 80 μL

## 2.3.2 温度对酶释放的影响

对于细菌来说, 温度对肽聚糖层的渗透性具有重要影响<sup>[47]</sup>。另一方面, 由于各种蛋白对温度敏感性的不同, 在保证目标酶不失活的情况下, 改变温度可以达到目标酶的高效率和高纯度提取。

研究中考察了几个典型温度下的提取效果。从图 2-2 中可以看出随着温度的升高, 在较短的时间内就能达到较好的提取效果, 在 50 °C 温度条件下, 20  $\mu$ L 氯仿处理半小时后, 在水溶液体系中甚至在半小时内就能达到最高提取率, 但也随着时间的延长, 由于在氯仿和温度的共同作用下 CAT 失去了一部分活性。而在室温 (30 °C) 和 37 °C 下的提取效果, 在一个多小时下也能达到最高提取效率, 因为这与发酵条件温度相近, 便于操作并且节约能源, 同时也避免了高温下可能存在的 CAT 活性失活。相反, 为了更好的保持目标蛋白的活性, 选择在冰浴条件下提取, 效果却很差, 主要原因可能是枯草芽孢杆菌受低温恶劣环境影响, 从而逐渐形成芽孢, 氯仿的作用也并不能使细胞通透性增加, 阻碍了胞内蛋白的向外渗透。

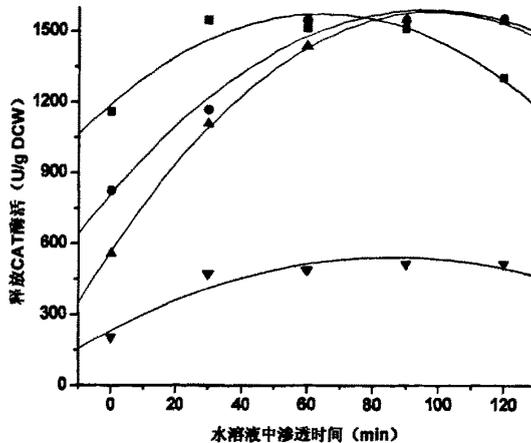


图 2-2 不同温度下的 CAT 释放过程

Fig.2 CAT release profiles at different temperatures

■- 50 °C    ●-37 °C    ▲-30 °C    ▼-0 °C

## 2.3.3 水溶液 pH 对酶释放的影响

研究考察了 pH 对 CAT 释放的影响, 虽然有文献<sup>[48]</sup>提到改变 pH 条件可以作为提高菌体细胞的渗透性的一种手段, 使胞内蛋白能更容易的渗透到胞外。而在本实验中, 水溶液在 pH 5- 10 范围内对于酶释放过程的影响并不是很大, 如图 2-3, 这主要是因为该方法主要利用氯仿处理细胞以增加细胞的通透性, 而改变水溶液的 pH 只能作为一种辅助手段以便 CAT 更有效的释放至胞外, 而在氯仿处理效果相当理想的情况下, 说明细胞已经受到很大程度的破坏, 而此时, 水溶液 pH 的改变似乎已经不能起到其本来的作用。

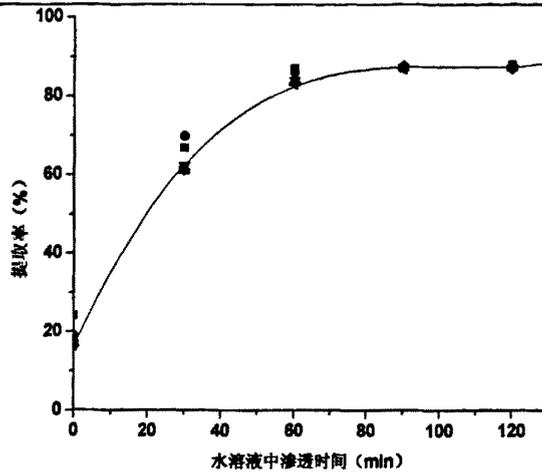


图 2-3 不同 pH 下 CAT 的释放过程

Fig.2-3 CAT release profiles for treatment at different pH

■-pH 5 -●-pH 6 -▲-pH 7 -▼-pH 8 -◆-pH 9 -▸-pH 10

### 2.3.4 菌体浓度对酶释放的影响

为了证明氯仿冲击法适用于高菌浓条件下的 CAT 的提取，以便于放大及工业化，考察了氯仿冲击法对是否适用于实验室条件下大量菌体的 CAT 的提取。从图中可以看出在 20mL、200mL、2000mL 发酵液（菌体量为 0.01gDCW、0.1gDCW、1gDCW）下，氯仿冲击法仍然可以有效的释放出 CAT，而释放速率也基本一致，而 2000mL 发酵液（1g DCW）所释放的 CAT 总酶活相对较低的主要原因是大体积离心带来的菌体损失所造成的，这说明了氯仿冲击法适用于实验室放大试验。

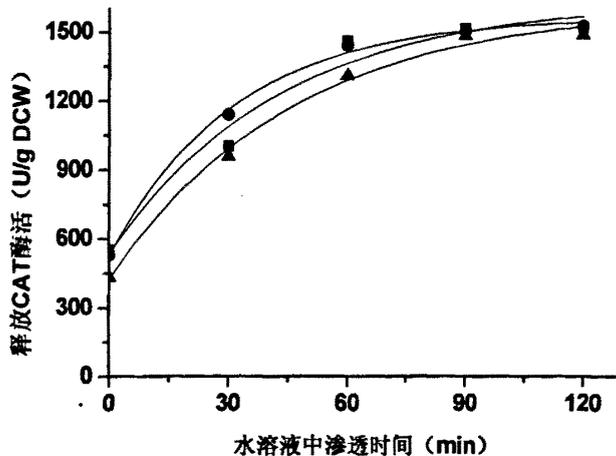


图 2-4 不同菌体量的 CAT 释放过程

Fig.2-4 CAT release profiles for treatment at different biomasses

■- 0.01 g -●- 0.1 g -▲- 1 g

### 2.3.5 超声波破碎与氯仿冲击法比较

超声波破碎，机械破碎提取胞内蛋白有着三个很重要的缺陷<sup>[49-50]</sup>，（一）核酸物质的释放导致提取液粘性大大增加；（二）胞内杂蛋白的释放；（三）产生很多细胞碎片。

这些都不利于目标蛋白的下游分离和纯化。

而从氯仿冲击法的研究结果看（见表 2-1，图 2-4），该方法所释放的蛋白质中 CAT 酶活虽然只是超声波破碎的 85%左右，但比活力则是其 2.5 倍之多。

表 2-1 超声波破碎与氯仿冲击法比较

Tab. 2-1 the comparison between ultrasonic disruption and chloroform shock

处理方法	CAT 酶活 ( $10^3$ U/g DCW)	蛋白质含量 (mg/g DCW)	比活力 (U/mg)
超声波破碎	1846	1176	1569
氯仿冲击法	1548	395.4	3915

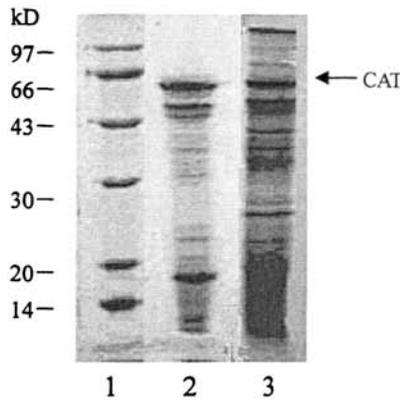


图2-5 氯仿冲击法和超声波破碎处理*Bacillus subtilis* WSHDZ-01释放的蛋白SDS-PAGE

Fig.2-5 SDS-PAGE of protein released from *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 by chloroform shock and ultrasonic treatment

1-Marker 2-氯仿冲击法 3-超声波处理

有文献<sup>[42]</sup>提及利用氯仿处理大肠杆菌所破坏的是细胞壁，所释放的是周质蛋白，虽然尽管枯草芽孢杆菌同大肠杆菌在形态和细胞壁化学组成上有很大区别，但通过以上实验可以证明氯仿冲击法对 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 同样适用，因此释放的胞内 CAT 应该是存在于周质空间的，而在这种情况下细胞膜就未被破坏，这样虽然阻碍了细胞质 CAT 的释放，但同样把核酸和大量杂蛋白保留在了细胞内。

这些都为较容易的实现下游分离提供了可能。

### 本章小结

1. 采用氯仿冲击法来释放 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 的 CAT 主要存在于周质空间，在 37℃ 条件下 20  $\mu$ L 氯仿处理 0.01 gDCW 菌体 30 min，在水溶液中渗透 60 min 后释放 CAT 酶活，可以达到超声波破碎的 85 % 以上。
2. 研究表明利用氯仿冲击法释放出的 CAT 比活力是超声波破碎法的 2.5 倍之多，而且保持了细胞的完整结构，并且在只破坏细胞壁的情况下阻止了细胞质蛋白及核酸类物质的释放。

## 第三章 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶的分离纯化及性质研究

### 3.1 引言

分离蛋白质的目的是多种多样的。研究蛋白质的分子结构、组成和某些物理化学性质，需要纯的、均一的甚至是晶体的蛋白质样品。研究活性蛋白质的生物功能，需要样品保持它的天然构象，需尽量避免因变性而丢失活性。

分离和提纯蛋白质的各种方法主要是利用蛋白质之间各种特性的差异，包括分子的大小和形状、酸碱性质、溶解度、吸附性质和对其他分子的生物学亲和力。

上一章的研究结果表明，胞内 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶主要存在于周质空间，一般来说周质过氧化氢酶与胞外过氧化氢酶是同一种酶，因此为了简化纯化步骤，我们选择发酵液即胞外酶作为纯化粗酶液。本章对 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶的分离纯化进行研究，并在此基础上探讨其催化、光学及分子学等性质。

### 3.2 材料和方法

#### 3.2.1 菌种、培养基及培养条件

同第二章

#### 3.2.2 主要仪器

UV2450紫外可见分光光度计	日本岛津
冷冻离心机;	日本日立
层析仪、梯度混合仪	上海沪西分析仪器厂
摇床	上海福玛实验设备有限公司
超滤离心管	德国 sartorius
电泳仪	DYY-6C 稳压流电泳仪
移液枪	Eppendorf
凝胶成像仪	美国 alpha2200
水浴摇床	国华电器有限公司
层析系统 (分子量测定)	AKTA FPLC P-920

#### 3.2.3 主要试剂及耗材

牛肝过氧化氢酶	Sigma
DEAE Sepharose FF 阴离子交换层析	GE Healthcare Bio-science
Phenyl Sepharose FF 疏水层析	GE Healthcare Bio-science
蛋白电泳试剂盒	碧云天 (beyotime)
低分子量蛋白标准	碧云天 (beyotime)

其余试剂均为常规的国产分析纯试剂

### 3.2.4 分析方法

#### A. 酶活测定方法:

同第二章

#### B. 蛋白质定量测定:

同第二章

#### C. 菌株 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶的分离纯化

##### a) 粗酶液制备

将发酵液置于 5000 r/min × 10min 离心, 收集上清液即为粗酶液。留取样品 -20℃ 保存。

##### b) 乙醇沉淀

在冰浴条件下, 将预冷的乙醇加入 100 ml 粗酶液中, 沉淀 30 min, 12000r/min 离心收集 50%-80% 的饱和度的沉淀部分, 溶解于 15ml  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  缓冲液 (pH7, Buffer A)。留取样品 -20℃ 保存。

##### c) DEAE Sepharose FF 阴离子交换层析

Buffer A 预平衡。

15 ml 浓缩样品 10000 rpm × 40 min 离心后上样, 150 ml Buffer A 洗柱以除去未结合的杂蛋白; 四倍柱体积 0-1 mol/L NaCl 梯度的 Buffer A 洗脱, 收集过氧化氢酶活性部分。

##### d) Phenyl HP 疏水层析

含 1 mol/L  $(NH_4)_2SO_4$  的 buffer A 预平衡。

6 ml 经超滤浓缩样的品中加入等体积的 2 mol/L  $(NH_4)_2SO_4$  的 Buffer A, 10000 r/min × 40 min 离心后上样; 1 mol/L  $(NH_4)_2SO_4$  浓度的 Buffer A 洗柱以除去未结合的杂蛋白; 四倍柱体积含 1 mol/L-0 mol/L  $(NH_4)_2SO_4$  的 Buffer A 梯度洗脱, 收集活性部分。

#### D. SDS-PAGE 垂直平板电泳

同第二章

#### E. 过氧化氢酶活性染色

Native-PAGE 方法参照文献<sup>[51,52]</sup>。采用 4% 浓缩胶, 12% 分离胶, 100 V 恒压电泳。染色试剂: 0.03 %  $H_2O_2$  溶液, 氯化铁/铁氰化钾显色剂 (2% 三氯化铁: 2% 铁氰化钾 = 1:7 (v/v))。

染色过程: 凝胶于蒸馏水中漂洗 3 次, 以滤纸于其四周轻轻吸干残余水分, 加入现配的 0.03 %  $H_2O_2$  溶液浸泡凝胶并轻轻摇动, 计时 10 min; 弃去  $H_2O_2$  溶液, 并以蒸馏水漂洗 3-4 次 (务必漂洗干净), 同样以滤纸吸干后加入现配的显色剂, 轻轻摇动 5 min, 此时应出现亮黄色活性带及墨绿色背景; 弃去染液, 蒸馏水漂洗 3 次后凝胶成像处理。

### 3.2.5 催化性质研究

#### A. 最适反应 pH 及 pH 稳定性

将酶液分别加在不同pH 3-12.5的缓冲液中,按标准方法测酶活力,以酶活力最高者为100%。为了研究该酶的pH稳定性,将酶放置在不同pH 3-12的缓冲液中,25℃保温60 min后,测残余酶活力。

#### B. 最适反应温度及温度稳定性

在不同温度下按照标准方法测定酶活力,以酶活力最高者为100%。将酶液在30℃、37℃、42℃、50℃、60℃、70℃下保温60 min,利用冰浴迅速冷却后,按上述方法测残余酶活力,考察其热稳定性。

#### C. $K_m$ 及 $V_{max}$ 的测定

以 Buffer A 配制不同浓度的底物,分别为:2.5 mmol L<sup>-1</sup>, 3.3 mmol L<sup>-1</sup>, 5 mmol L<sup>-1</sup>, 7.5 mmol/L, 10 mmol/L, 12.5 mmol/L, 15 mmol/L, 30 mmol/L, 40 mmol/L, 50 mmol/L, 60 mmol/L, 70 mmol/L, 80 mmol/L, 测定各底物浓度所对应的酶活。采用 Lineweaver-Burk 作图法分析求得  $K_m$  和  $V_{max}$ 。

#### D. 抑制剂、金属离子、有机溶剂对酶活的影响

以去离子水配制各金属盐及抑制剂的浓缩液,以 Buffer A 稀释至相应浓度后与酶液混合,25℃下放置30 min后加入底物(pH 7.0)测定酶活;以不加酶的反应体系为空白对照,以防止过氧化氢与金属离子或抑制剂反应而引起误差。酶液、95%乙醇及氯仿以10:5:3的体积比混合,25℃下放置30 min后测定残余酶活。以不加上述物质的酶液的酶活作为100%。

#### E. 过氧化物酶活性测定

以0.3mM邻苯二胺为底物,反应体系包括适量酶液,过氧化氢,适量50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(pH 7);30℃于相应485 nm<sup>[53]</sup>下测定酶活;以水替代底物为空白对照;以牛肝过氧化氢酶作为阴性对照,其余条件同过氧化氢酶的测定。

### 3.2.6 光学性质研究

150 μL 酶液中分别加入150 μL buffer A, 150 μL 浓度为2 mmol的 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>溶液(buffer A 配制)及150 μL 20 mM的 KCN溶液(buffer A 配制),30℃下放置5 min后分别进行UV-Vis扫描(以buffer A为空白对照);扫描参数:起始波长250 nm,终止波长650 nm,速度1200 nm/min,波长间隔1 nm。

### 3.2.7 分子性质研究

采用 SDS-PAGE 方法,根据已知分子量(M<sub>r</sub>)的标准蛋白在 SDS-PAGE 中的相对迁移率 R<sub>f</sub>,作 R<sub>f</sub>-LogM<sub>r</sub>图,求得亚基酶分子量。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶的分离纯化

#### A. 乙醇沉淀

乙醇分级沉淀可以较好地起到初级沉淀的作用,结果见图3-1,有85%以上的CAT可以得到回收,比活力也提高至粗酶液的两倍多,之所以采用乙醇沉淀,一方面是由于

乙醇并不会影响该过氧化氢酶活性；另一方面相对于通常的硫酸沉淀<sup>[54,55]</sup>，乙醇沉淀所得到的样品仅含有较少的色素，有利于下步纯化，从结果看有也证明了这一点。

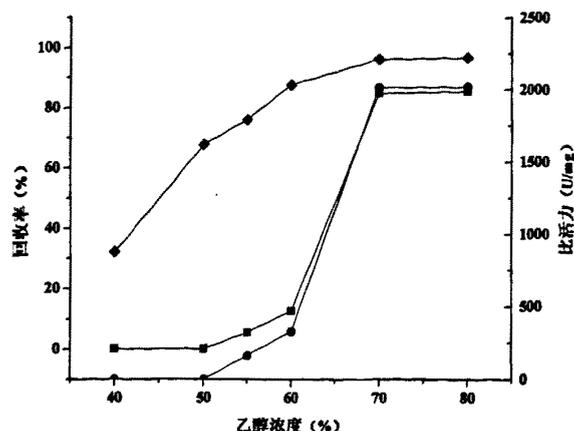


图 3-1 不同乙醇浓度的沉淀效果

Fig.3-1 CAT precipitated by different concentrations of ethanol

■- 酶活回收率 -◆- 蛋白质回收率 -●- 比活力

#### B. DEAE Sepharose FF 阴离子交换层析

而 DEAE 阴离子交换层析的作用相当明显，在有较高回收率的同时，纯化倍数提高至 6.4 倍。

#### C. Phenyl Sepharose FF 疏水层析

疏水层析则进一步提高了该过氧化氢酶的纯度，所得样品达到电泳纯。

#### D. 纯化总结

粗酶液经乙醇分级沉淀、DEAE 阴离子交换层析柱、疏水层析柱后，所得过氧化氢酶样品的比酶活由 1982.4 U/mg 提高到了 13563.8 U/mg，纯化倍数为 6.8，回收率达到 32.5 %。而样品经 SDS-PAGE 检测只显示一条蛋白带（图 3-2 A），表明纯化后的过氧化氢酶已达到电泳纯，亚基分子量为 63 kD。从 Native-PAGE 看（图 3-2 B），粗酶液中并不存在过氧化氢酶的同工酶的体系，纯化相对于存在复杂同工酶体系的菌种<sup>[10,30]</sup>来说就较为方便。

表3-1 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01过氧化氢酶的纯化

Table 3-1 Purification of catalase from *Bacillus subtilis* WSHDZ-01

纯化步骤	总活力 (U)	总蛋白 (mg)	比活力 (U/mg)	纯化倍数	回收率(%)
粗酶液	99120	50	1982.4	-	-
乙醇沉淀	84499.8	20	4225	2.1	85.2
DEAE Sepharose FF	38656.8	3.1	12632.9	6.4	45.7
Phenyl Sepharose FF	32214	2.3	13563.8	6.8	32.5

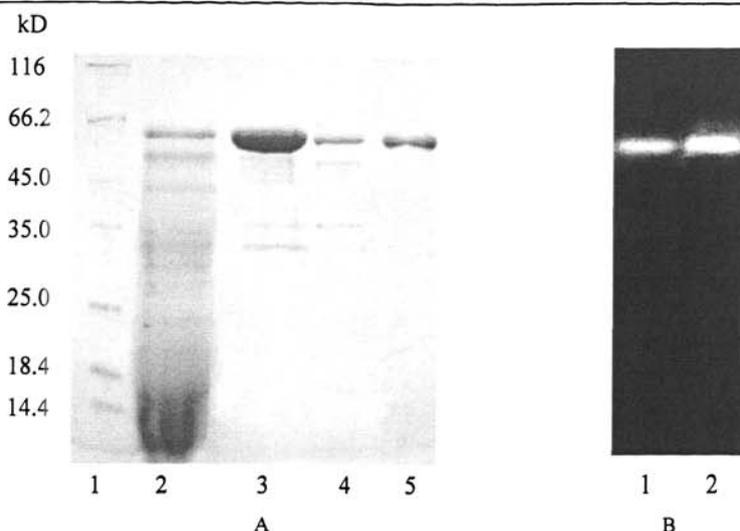


图 3-2 过氧化氢酶分离纯化凝胶电泳图谱(A: SDS-PAGE B: Native-PAGE)

Fig. 3-2 Electrophoresis of the CAT

(A): SDS-PAGE Lane 1 蛋白质Marker ; Lane 2 粗酶液; Lane 3 乙醇沉淀; Lane 4 离子交换; Lane 5 疏水层析

(B): Native-PAGE Lane 1 粗酶液; Lane 2 纯酶

### 3.3.2 催化性质研究

#### A. 最适反应 pH 及 pH 稳定性

反应体系的pH不但会影响决定酶活性的必须基团的解离状态,而且还会影响酶蛋白的构型和稳定性。所以,各个酶都有其最适反应pH和适宜的pH范围。而该酶在pH 4-12的范围内均显示活力,在pH5-10的范围内催化活性基本上不受pH的影响(即pH-independent),而至pH 12时达到最高催化活力(图3-3 A)。相比较, Sigma公司商品 BLC活性却受pH影响很大,在pH 7时表现为最大活力,在酸性或碱性条件下酶活受到很大抑制,在pH 12时已没有过氧化氢酶酶活。

此外,该过氧化氢酶在 pH 6-11 的范围内表现出良好的稳定性, 25℃条件下放置 60 min 后基本没有酶活损失(图 3-3 B)。而相同条件下商品 BLC 则在酸性或碱性条件下大部分失活,在 pH 11 条件下放置 60 min 后,已经没有酶活可以检测出。

该酶的突出的碱适应性和稳定性是碱性酶的典型特征之一,它在 pH 11 左右的高碱条件下表现出最高活力和一定的稳定性,这在已报道的所有过氧化氢酶中是极其罕见的,只有同样来自于 *Bacillus subtilis* 芽孢的 catalase-2<sup>[56]</sup>和来自 Alkaliphilic *Bacillus sp.* F26<sup>[30]</sup>能在 pH 11 时显示较高活力。

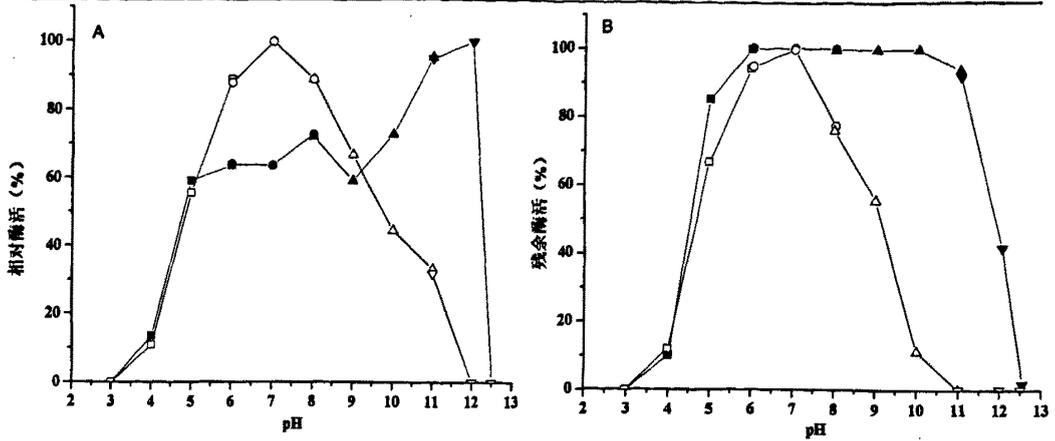


图 3-3 pH 对过氧化氢酶活性及稳定性的影响

Fig.3-3 Effects of pH on the catalytic activity and stability of the catalases

pH3-6 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液; pH 6-8 磷酸钾缓冲液; pH 8-11 甘氨酸-NaOH缓冲液; pH 11-12.5 KCl-NaOH缓冲液

实心 *B. subtilis* WSHDZ-01CAT 空心: BLC

B. 最适反应温度及温度稳定性

纯化所得的CAT和商品BLC的最适反应温度分别是55 °C和37 °C，此后，随着温度的上升酶活迅速下降，至70 °C时接近完全失活（图3-4 A）。在20 °C~40 °C时两种酶Q10（反应温度提高10 °C，其反应速率与反应速率之比称为反应的温度系数，用Q10表示）都在1.1左右，这与低温过氧化氢酶的结果类似。从热稳定性来看，纯化得到的过氧化氢酶在45 °C以下保温60 min后酶活保持稳定，而在50 °C以上保温则失活很快（图3-4 B），尽管这样，该酶相对商品BLC在热稳定性上仍具有一定优势。

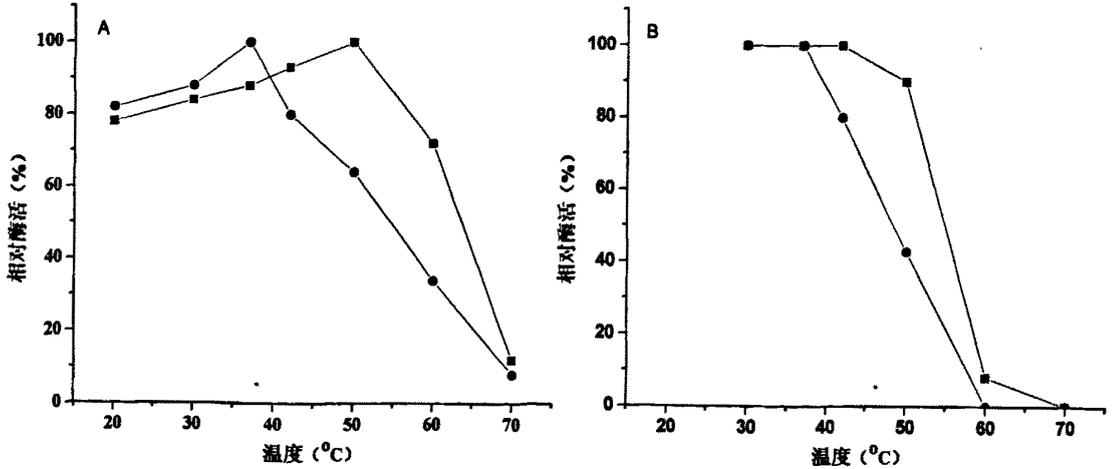


图 3-4 温度对过氧化氢酶活性及稳定性的影响

Fig. 3-4 Effects of temperature on the activity and stability of the catalases

■- *B. subtilis* WSHDZ-01 CAT -●-BLC

C. 动力学常数  $K_m$  及  $V_{max}$

由图 3-5 可见，在  $H_2O_2$  浓度小于 40 mmol/L 时，酶的活性随着底物浓度的增加而线性提高，至 40 mmol/L 时酶活达到最高，但此后即开始迅速下降。这是由于过氧化氢

酶动力学行为并不遵循常规的动力学方程，因为其不可能被其底物饱和。一般所观察到的表观饱和现象只是高浓度底物所造成的氧化抑制作用<sup>[57]</sup>。因此，目前学术界对过氧化氢酶的动力学描述都是采用表观  $K_m$  值，即认为在一定的过氧化氢浓度范围内，酶活与底物浓度呈线性关系，类似米氏方程中的一级反应过程，并以此来推算表观米氏常数及最大反应速度。

由此，本实验采用 Lineweaver-Burk 作图法（图 3-6）分析了 40 mmol/L  $H_2O_2$  以下的酶活-底物浓度关系，并计算出该酶的  $H_2O_2$   $K_m$  值为 26.87 mmol/L， $V_{max}=43.5$  mol/min·mg。

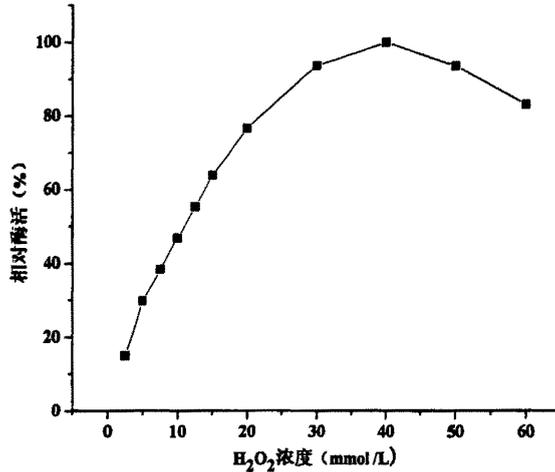


图3-5  $H_2O_2$ 浓度对过氧化氢酶活性的影响

Fig.3-5 Effect of  $H_2O_2$  concentration on the catalytic activity of the catalase.

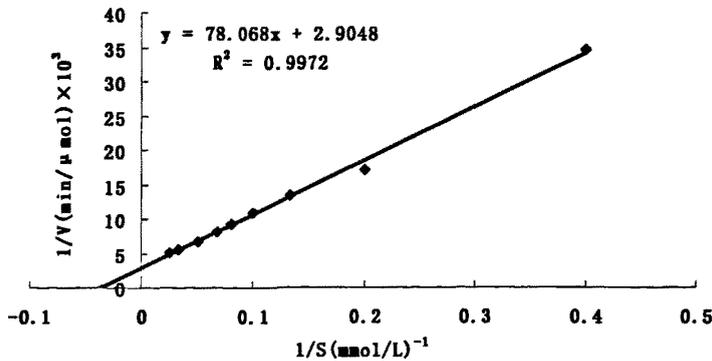


图 3-6 Lineweaver-Burk 图

Fig.3-6 Lineweaver-Burk plots

### C. 重金属离子、抑制剂及有机溶剂对酶活的影响

如表3-2、3-3所示， $NH_2OH$ 、 $NaN_3$ 和 $KCN$ 三种血红素抑制剂对该过氧化氢酶有着强烈的抑制作用，这说明纯化所得到的是一种血红素过氧化氢酶。而对有机溶剂（酶液+乙醇+氯仿=10: 5: 3）的耐受性，以及3-氨基-1,2,4-三唑对酶活的抑制，这些都是单功能过氧化氢酶亚群的共同特点。金属离子中，1 mmol/L的 $Al^{3+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 和 $Ba^{2+}$ 对酶活没有影响，而 $Fe^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 与 $Ni^{2+}$ 则对酶活有一定抑制， $Hg^{2+}$ 对酶活有着较大的抑制，抑制率达到80%以上。

表 3-2 重金属离子及有机溶剂对酶活的影响

Tab. 3-2 Influence of heavy metals and organic solvent on the catalytic activity

重金属离子	终浓 (mmol/L)	残余酶活
Al <sup>3+</sup>	1	100
Ba <sup>2+</sup>	1	100
Zn <sup>2+</sup>	1	100
Mg <sup>2+</sup>	1	100
Ca <sup>2+</sup>	1	100
Co <sup>2+</sup>	1	78.95
Ni <sup>2+</sup>	1	84.21
Fe <sup>3+</sup>	1	89.47
酶液 + 乙醇 + 氯仿	10:5:3	100

表 3-3 抑制剂对酶活的影响

Tab.3-3 Influence of inhibitors on the catalytic activity

抑制剂	终浓 (mmol/L)	酶活抑制百分比
羟胺	0.01	68.2 %
NaN <sub>3</sub>	0.1	52.4 %
	0.5	94.6 %
	0.01	33.3 %
KCN	0.05	96.5 %
	1	47.4 %
3-氨基-1, 2, 4-三唑	0.1	0 %
	1	17.1 %
EDTA	1	17.1 %

### 3.3.3 过氧化物酶活性测定

虽然同为细胞抗氧化体系的成员，过氧化氢酶和过氧化物酶（Peroxidase）在清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 时的机理是不同的。前者以两分子 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为底物，催化一对电子的转移，形成一分子水和一分子氧气。后者则需借助其它的电子供体，在过氧化氢同时存在的情况下，催化一个电子的转移将其还原为水。

邻苯二胺（Phenylenediamine）是过氧化物酶常用的电子供体，本实验以牛肝过氧化氢酶为阴性对照测定了该酶的过氧化物酶活性，结果显示，该酶不显示过氧化物酶活。

### 3.3.4 光学性质研究

典型的过氧化氢酶以血红素为辅基，血红素是金属卟啉类化合物，卟啉环中央为二价态的铁原子，其主要作用是作为催化反应时的电子递体。

根据对各种过氧化氢酶晶体结构的分析发现，在天然状态下，铁原子与周边原子共形成 5 个配位键，其中的 4 个配位键与卟啉环上的四个氮原子相连，形成一个铁卟啉环平面，在几乎垂直于平面的方向上，铁原子以另一个配位键与酶蛋白的氨基酸残基（一般为酪氨酸）相连，该端因为靠近蛋白分子，习惯上称为近端（proximal side），而与之相对的平面另一端，习惯上称为远端（distal side），则与底物接触，是酶的活性中心所在<sup>[58]</sup>。

从图3-7中可以看到,天然状态下的酶分子在405 nm下有吸收峰,这代表该酶的分子中带有血红素,因为在405 nm左右出现吸收高峰是卟啉类化合物及其衍生物所特有的光谱特征,称为Soret band<sup>[59]</sup>。根据Soret band处的吸收值可以计算得该酶的Reinheitzal比值( $A_{405}/A_{280}$ )为0.66,该数值相对报道<sup>[8]</sup>的较低,这有可能在纯化过程中,有部分血红素丢失或降解。

当酶液以氰化钾处理后, Soret band从405 nm 偏移到424 nm。这是因为铁原子远端为自由端时,自由电子没有配位,处于高旋状态(high spin state),当加入氰化钾后,后者的氮原子与铁原子的远端形成配位键,从而使铁原子从高旋状态转入低旋状态(low spin state),在光谱特性上即表现为 Soret band 的红移;与此同时,由于远端被侵占,底物分子将无法与辅基接触,过氧化氢酶即丧失催化活性,这也是氰化物及叠氮化物能够抑制血红素酶的机理所在<sup>[60]</sup>。

此外,当酶液以连二亚硫酸钠还原后, Soret band的位置和峰型基本没有变化,这说明*Bacillus subtilis* WSHDZ-01过氧化氢酶的分离纯化不受该物质的还原作用影响。

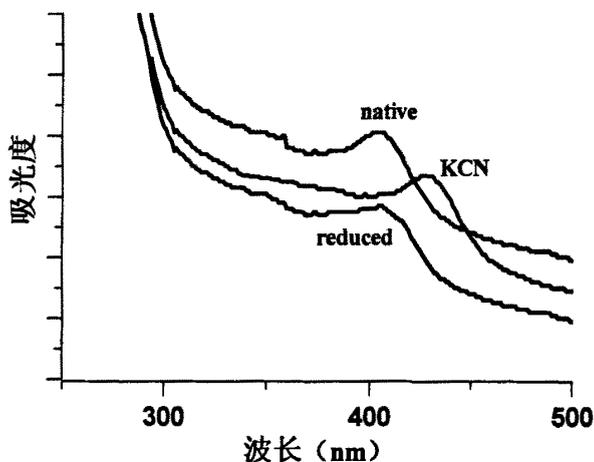


图 3-7 UV-Vis 扫描光谱图

Fig.3-7 Spectroscopic analysis of the catalase

### 3.3.5 分子性质研究

以 SDS-PAGE 方法测定了同工酶 4 的亚基分子量,电泳结果见图 3-2, lg M-R<sub>f</sub> 标准曲线见图 3-8,估算的分子量大小为 63,000 Da。

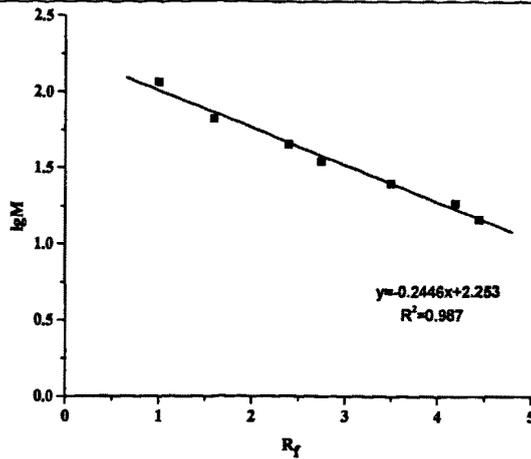


图 3-8 亚基分子量标准曲线

Fig.3-8 The standard curve of subunit molecular weight

### 3.3.6 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶与其它过氧化氢酶的总结比较

菌株 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶的性质及其与其它过氧化氢酶的性质比较总结于表 3-4。

表 3-4 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶与其他过氧化氢酶的性质比较

Table 3-4 Comparison of the enzymatic properties of *B. subtilis* WSHDZ-01 with other catalases

性质	<i>Bacillus subtilis</i> WSHDZ-01 catalase	<i>Bacillus sp.</i> F26 catalase <sup>[30]</sup>	<i>Thermus brockianus</i> catalase <sup>[61]</sup>	<i>R. capsulatus</i> Catalase-Peroxidase <sup>[62]</sup>
亚基分子量(kD)	63	74	42.5	60.3
Sort Peak(nm)	405	408	410	403
R <sub>z</sub>	0.66	0.54	无 <sup>a</sup>	0.44
K <sub>m</sub> (mmol/L)	26.9	32.5	35.5	3.7
最适pH	12	11-12	8	6.5
pH稳定性	稳定	稳定	nr	nr
酶活pH范围	宽	宽	宽	窄
最适温度(°C)	50	20-40	90	50
温度稳定性	不稳定	不稳定	稳定	不稳定
耐盐性	较强	较强	nr	强
CN <sup>-</sup> 和N <sub>3</sub> <sup>-</sup> 抑制性	+	+	+	+
三氨基咪唑抑制性	+	+	+	-
有机溶剂耐受性	稳定	稳定	nr	不稳定
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 还原性	-	-	-	+
过氧化物活性	-	-	-	+

nr: 未报道

a: 280nm处没有吸收峰

其它: 以上各种参数是指以H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>为底物, 检测的是过氧化氢酶活性

从以上研究结论可以得出纯化所得的该过氧化氢酶是一种单功能过氧化氢酶, 与过氧化物酶性质相比有很大的差异。

一般来说,典型的单功能过氧化氢酶在一定的pH范围内活性不受pH变化的影响,因此表现为宽范围的最适反应pH (pH 4-10<sup>[59]</sup>)。对碱性单功能过氧化氢酶来说也同样表现出这样的特点,只是其最适范围向高pH值方向偏移(如pH 8-10.5<sup>[61]</sup>)。而*Bacillus subtilis* WSHDZ-01过氧化氢酶的酶活pH依赖曲线则较为独特,其在pH 5-10的范围内基本不表现pH依赖性,但在pH 11-12时凸显酶活高峰。这可能从某种角度上体现了该酶的“嗜碱性”,因为在同样的pH下,其还表现出良好的稳定性。因此,该酶可以作为一个较好的分子模型来研究过氧化氢酶的碱适应机理。

### 3.4 本章小结

1. 粗酶液经乙醇分级沉淀、DEAE 阴离子交换层析柱、疏水层析柱后,所得过氧化氢酶样品的比酶活由 1982.4 U/mg 提高到了 13563.8 U/mg,纯化倍数为 6.8,回收率达到 32.5 %。
2. *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT 在 pH5-10 的范围内催化活性基本上不受 pH 的影响,最适 pH 为 12,并且在 pH 6-11 的范围内表现出良好的稳定性,25℃条件下放置 60 min 后基本没有酶活损失。
3. *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT,最适酶促反应温度为 55℃;酶的热稳定性实验表明,该酶在 50℃以下相当稳定,保温 60min 后的酶活基本保持不变。耐热性与低温酶相近。
4. *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT 的活性最适底物浓度是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 mmol /L,采用 Lineweaver-Burk 作图法分析了 40 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以下的酶活-底物浓度关系,并计算出该酶的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> K<sub>m</sub> 值为 26.87 mmol/ L, V<sub>max</sub>=43.5 mol/ (min·mg)
5. *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT 在 405 nm 下有吸收峰,表明该酶的分子中带有血红素,Reinheitzal 比值(A<sub>405</sub>/A<sub>280</sub>)为 0.54。酶液以氰化钾处理,Soret band 发生偏移,而酶液以低亚硫酸钠还原后,Soret band 的位置和峰型基本没有变化。

## 第四章 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶热稳定性的研究

### 4.1 引言

通过上述研究,基本完成了过氧化氢酶的提取、纯化及性质研究,在此基础上,本章对过氧化氢酶在纺织清洁生产中的热稳定性进行研究。棉纺织物精练中,要求织物在 60~65℃含酶和助剂精练浴中处理 15 min,这就要求酶在 60℃左右仍具有良好的稳定性<sup>[63,64]</sup>。但是,前期研究发现,采用芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产过氧化氢酶的热稳定性不很理想,有必要提高酶的热稳定性。

提高酶热稳定性的方法有很多,包括筛选耐热菌株、化学修饰<sup>[65,66]</sup>、交联酶结晶法<sup>[67]</sup>和多聚体共价结合法等。而在液体酶制剂中加入稳定剂是一种常用的,经济有效的方法<sup>[68]</sup>。本章通过在液体酶制剂中加入各种稳定剂,如糖类、多羟基醇类、多聚体、金属离子、表面活性剂、羧酸盐和其他化学物质<sup>[28]</sup>,对提高 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产过氧化氢酶在 60℃左右的应用稳定性进行了研究。

本章将通过比较在添加稳定剂前后, *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产过氧化氢酶热失活反应及失活速率常数等参数的变化,从理论上初步解释该过氧化氢酶的热失活过程。

### 4.2 材料和方法

#### 4.2.1 主要仪器

同第二章

#### 4.2.2 试剂

试剂均为常规的国产分析纯试剂;

纯化所得 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶。

#### 4.2.3 分析方法

##### A. 酶活测定方法

同第二章

##### B. 酶热稳定性的测定

将添加不同种类、不同浓度稳定剂的酶液,在 pH 7.0 磷酸钾缓冲液中,60℃水浴中保温 15 min 后,立即冰浴,稀释至适宜倍数,测其酶活。以不加稳定剂的酶液作对照,分别计算酶活残留率。

$$\frac{\text{热处理前的活力} - \text{损失的活力}}{\text{热处理前的活力}} \times 100\% = \text{酶活残留率}$$

##### C. CAT 热力学参数测定

###### a) 失活速率常数 k 的测定<sup>[69,70]</sup>

酶液在不加底物的情况下,其失活模型假设符合:活性酶分子通过不可逆的构型变

化或化学变化而成为无活性的蛋白质，该失活反应为一级反应，即酶的失活速率正比于活性酶浓度，过程如：



酶活关于时间  $t$  的函数可以描述成方程：

$$R_t = R_0 \cdot \exp(-kt) \quad (4-2)$$

而更多的酶失活过程则是二级反应，为了更好的解释二级失活过程提出了两个不同的模型：

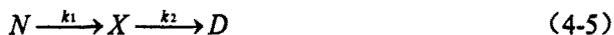
模型 1 是指含有两种同工酶，若它们的比活力和热稳定性都有所不同，这同工酶体系就存在两阶段失活过程如式 4-3，



可以描述成方程为：

$$R_t = R_1 \cdot \exp(-k_1t) + R_2 \cdot \exp(-k_2t) \quad (4-4)$$

模型 2 则提出在原酶液在失活的过程中存在着中间体，如式 4-5：



而酶活关于时间  $t$  的函数可以描述成方程

$$\text{即 } R_t = [R_1 - R_2 \cdot k_1 / (k_2 - k_1)] \cdot \exp(-k_1t) - (R_2 \cdot k_1 / k_1 - k_2) \cdot \exp(-k_2t) \quad (4-6)$$

是通过 Origin 软件非线性拟合所得  $k_1$  和  $k_2$  值，而半衰期则是当  $R_t$  失活至  $1/2R_0$  时所需时间。

式中： $k$ ——失活速率常数 (1/min)；

$R_0$ 、 $R_t$ ——分别为 0 小时、 $t$  小时的酶活 (U/L)；

$t$  ——失活过程的时间 (min)。

$N$ ——原酶；

$D$ ——失活的酶；

$X$ ——酶失活过程中间物。

#### b) 失活活化能、布斯自用能的计算

活化能是根据失活速率常数关于温度的函数即阿伦尼乌斯方程计算而得，

$$\lg k = -E_a / 2.303RT + \lg A$$

活化焓、活化吉布斯自由能、活化熵分别由方程可得

$$\Delta G = -2.303RT \lg(kh / k_B T)$$

式中： $E_a$ ——活化能；

$\Delta G$ ——失活吉布斯自由能；

$k$ ——失活速率常数 (1/min)；

$R$ ——通用气体常数 (8.3143 kJ/kmol·K)；

$T$ ——绝对温度 (K)；

$A$ ——指前因子。

$h$ ——普朗克常数 ( $6.6260755 \times 10^{-34}$  J·S)

$k_B$ ——波茨曼常数 ( $1.380658 \times 10^{-23}$  J/K)

在本实验中，研究了 57.5 °C 到 65 °C 之间 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产过氧化氢酶的热失活过程，具体操作时将样品置于不同温度的恒温水浴中，间隔一定时间取样（如表 4-1），测定过氧化氢酶的酶活残留率。而后

- (1) 根据酶活残留测定结果，作残余酶活-时间的曲线，确定反应级数；
- (2) 求出不同温度下酶制剂失活反应速度常数 k 值；
- (3) 将  $\lg k - 1/T$  作 Arrhenius 图，从 Arrhenius 图得出直线后，求出活化能  $E_a$ 。

表 4-1 实验温度和取样时间

Tab.4-1 Test temperature and sampling time

温度 (°C)		时间 (min)										
65	0	0.5	1	1.5	2	3	4	5	6	8	10	
62.5	0	0.5	1	1.5	2	3	5	8	10	15	20	
60	0	1	2	3	5	10	15	20	30	45	60	
57.5	0	5	10	15	20	30	45	60	75	90	-	

### 4.3 结果和讨论

#### 4.3.1 原 CAT 热失活过程

*Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产过氧化氢酶各温度下热失活过程见图 4-1（左），呈现出指数衰减形式。

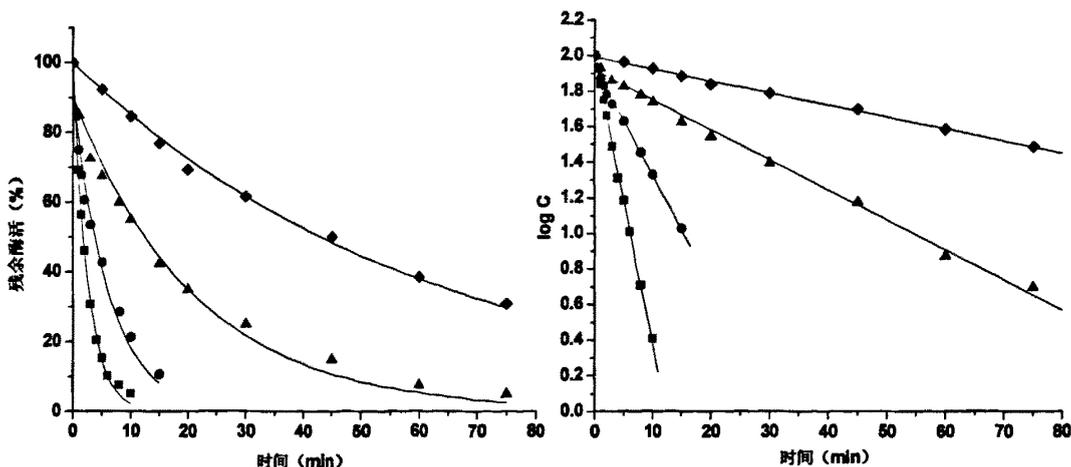


图 4-1 各温度下 CAT 的失活过程

Fig.4-1 Inactivation kinetics of original CAT

-■- 57.5 °C -●- 60 °C -▲- 62.5 °C -◆- 65 °C

从图中数据可以看出各温度下该酶的更符合一级失活过程即，即符合式 4-1 和式 4-2，绘制酶活残留对数 ( $\lg C$ ) 与时间 ( $t$ ) 的关系图，见图 4-1（右），求出各温度下热失活速率常数  $k$ 。

根据 Arrhenius 的指数定律的对数形式： $\lg k = -(E_a/2.303RT) + \lg A$ ，如图 4-2，可得一元线性回归方程， $y = -20.805x + 61.133$ ，得出  $E_a = 398.33 \text{ kJ/mol}$ ，

所求各参数值总结于表 4-2。

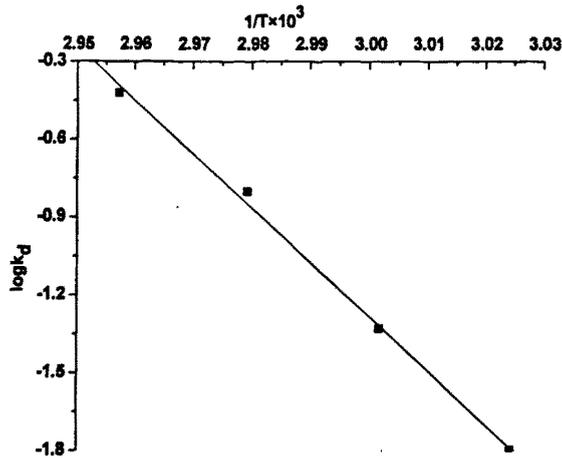


图 4-2 lg k - 1/T 图

Fig.4-2 lg k - 1/T plots

通过计算, *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产过氧化氢酶具有相当高的活化能, 这意味着其稳定性随着温度的变化而影响较大, 从表 4-2 可以看出, 从 60 °C 升高至 65 °C, 该过氧化氢酶的热失活速率常数增大至原来的八倍之多, 半衰期也从 12.5 min 降为 1.8 min, 这种程度的变化在报道中较为少见, 也意味着在酶的应用过程中, 控制温度的稳定性对最终应用效果至关重要。

表 4-2 各温度下原酶热稳定性参数

Tab.4-2 Thermostability parameters of original CAT

T(°C)	k(min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (min)	E <sub>a</sub> (kJ/mol)	ΔG(kJ/mol)	r <sup>2</sup>
65	0.379	1.8	398.33	85.9	0.996
62.5	0.157	4.2		87.7	0.978
60	0.047	12.5		90.4	0.98
57.5	0.016	43.3		92.6	0.998

该 CAT 稳定性较差不仅仅体现在随着温度的改变变化较大, 而且, 失活吉布斯自由能 ΔG 和半衰期在相对高温条件下 (如 60 °C) 相对较小, 表明在此条件下, 该过氧化氢酶的热稳定性较差, 这将制约该酶在高温下工业化应用。

#### 4.3.2 添加稳定剂对 CAT 应用稳定性研究

酶的高温稳定性的结构基础是酶蛋白都具有活性中心, 活性中心是指酶蛋白上与催化有关的一个特定区域, 其中包括催化过程中关键的催化基团以及与底物结合有关的结合基团。活性中心是由整个蛋白质结构决定的, 破坏了酶蛋白的整个结构, 也必然破坏活性中心, 从而使酶丧失催化活性。酶的高温稳定性, 主要取决于酶的结构特征。酶蛋白热失活过程, 首先是分子构象改变, 次级键破坏, 进而肽链伸展、或分子间相互作用而凝聚, 溶解度降低, 催化活性下降或丧失; 或伸展的肽键折叠成无活性的构象。增强酶的热稳定性, 都必须把防止或减少构象伸展作用。

以下按上述分析方法研究了了几种类型的添加剂对 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产过氧化氢酶热稳定性的影响。

## A. 添加金属离子对酶热稳定性的影响

阳离子能够保持酶蛋白结构完整性，与蛋白质结合，稳定其三维结构，防止蛋白质变性。同时还能对球蛋白表面的多余电荷起屏蔽作用，消除带电基团的不利影响而利于酶的稳定性<sup>[71]</sup>。Teke Khoo<sup>[72]</sup>曾认为金属离子参与蛋白-金属离子之间的作用是与离子的有效半径，方向特异性的程度有关。

实验分别对  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{NH}_4^+$  金属离子的氯盐对 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产过氧化氢酶在 60 °C 下热稳定性影响进行了考察。结果如图 4-3 所示：

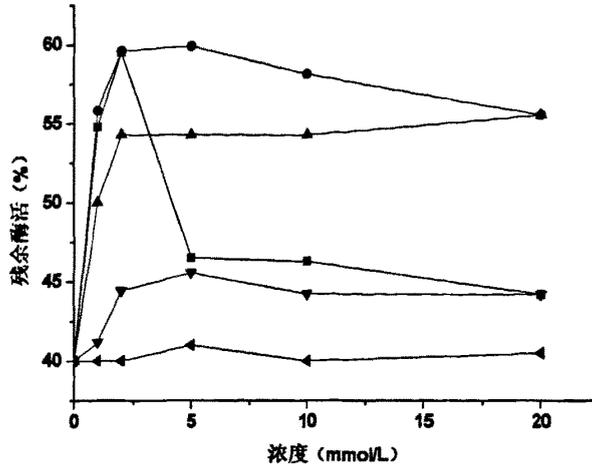


图 4-3 金属离子对酶稳定性的影响

Fig.4-3 Effects of different cations on thermostability of CAT

■-  $\text{Ca}^{2+}$     ●-  $\text{Mg}^{2+}$     ▲-  $\text{NH}_4^+$     ▼-  $\text{K}^+$     ◀-  $\text{Na}^+$

从实验结果可以看出， $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 的作用效果最佳，在 2 mmol/L 浓度下残余酶活提高了 20%，但随着浓度的增加，作用效果下降。相比较  $\text{NH}_4^+$ 的作用就没有那么明显，而  $\text{K}^+$ 和  $\text{Na}^+$ 的作用效果却不明显，但也没有不利影响。

## B. 添加阴离子对酶热稳定性的影响

许多研究论文中，并没有突出显示阴离子对酶热稳定性的作用，本实验考察了四种钠盐对过氧化氢酶热稳定性的作用，实验结果如图 4-4。

可以看出  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ 和  $\text{SO}_4^{2-}$ 的对提高过氧化氢酶热稳定性有突出的作用，在 500 mmol/L  $\text{SO}_4^{2-}$ 浓度时，残余酶活已经接近 90%，而 1000 mmol/L 的  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ 同样可以有此效果，而相比  $\text{Cl}^-$ 对酶热稳定性则几乎没有作用， $\text{NO}_3^-$ 的存在对酶稳定性有很大的不利作用，因此在该酶的应用过程中应极力避免这种离子的存在。

相比于金属阳离子，阴离子的作用效果更为明显，但作用浓度也有较大差别，一般需要相对较高浓度才能到达应用要求。

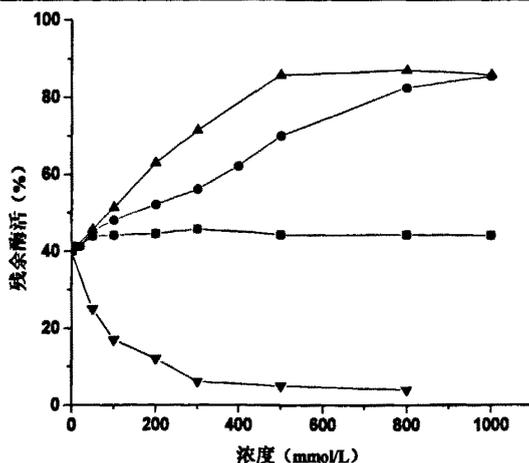


图 4-4 阴离子对酶热稳定性的影响

Fig.4-4 Effect of different anions on thermostability of CAT

■- Cl<sup>-</sup> -●- CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> -▲- SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> -▼- NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

C. 添加糖类对酶热稳定性的影响

张贺迎等<sup>[73]</sup>的研究表明,糖类对酶稳定性的提高有一定作用,这是由于羟基基团和酶分子的相互作用使得酶分子的构相得以稳定,氢键能减低蛋白质的自由能,因此普遍认为氢键的作用不仅是蛋白质分子折叠的驱动力,而且对蛋白质分子天然结构的稳定性具有重大贡献。在本研究中,选择了多种典型糖类进行稳定性试验,包括葡萄糖、蔗糖、海藻糖。结果如表 4-5 所示:

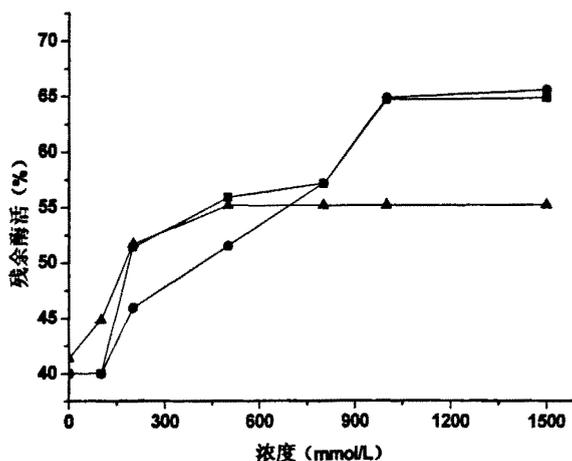


图 4-5 糖类对酶稳定性的影响

Fig.4-8 Effects of different sugars on thermostability of CAT

■- 葡萄糖 -●- 蔗糖 -▲- 海藻糖

从图 4-5 中可以看出添加葡萄糖和海藻糖浓度为 300 mmol/L 时,酶液的热稳定性显著提高,但随着糖浓度的提高葡萄糖和蔗糖对过氧化氢酶热稳定性作用效果也随之增强,在同样条件下,相比空白酶液,残余酶活由 40% 提高至 65% 以上,而海藻糖则没有预期的作用效果,根据文献报道<sup>[74]</sup>,海藻糖在酶热稳定性作用中相对于其它糖更为优越,而在该实验中则未体现出来,在达到 500 mmol/L 后,残余酶活就稳定在 55% 左右。

D. 添加多羟基醇类对酶热稳定性的影响

多羟基醇类可与水分子结合，降低的蛋白质分子的水和作用，减少介质的介电常数，加强蛋白分子的疏水性从而提高蛋白质的稳定性<sup>[75]</sup>，如图 4-6、4-7 所示：

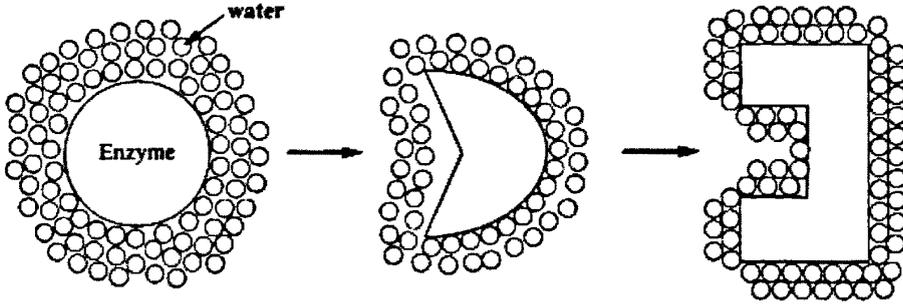


图 4-6 酶蛋白在水溶液中的失活过程<sup>[76]</sup>

Fig.4-6 Denaturation of enzyme in aqueous solution

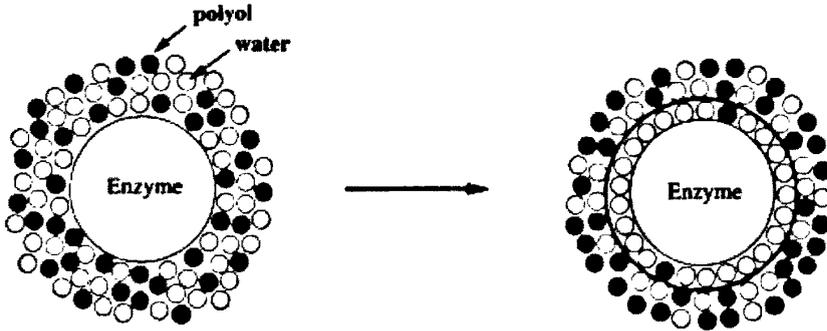


图 4-7 多羟基醇对酶蛋白的保护作用<sup>[76]</sup>

Fig. 4-7 Effect of polyols on stabilization of enzyme

实验研究了不同的多羟基醇类物质如甘油、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇加入酶液，结果如图 4-8 所示：

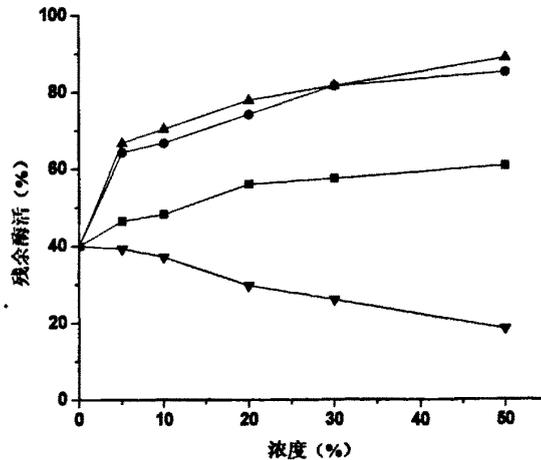


图 4-8 多羟基醇对酶稳定性的影响

Fig.4-8 Effects of different polyols on thermostability of CAT

■- 甘油 -●- 聚乙二醇 -▲- 乙二醇 -▼- 1,3-丙二醇

可以看出乙二醇和聚乙二醇的作用效果明显，在 5% 浓度添加量的情况下，最终残

余酶活就提高至 65 % 以上, 随着浓度的增加, 作用效果也更加明显, 在达到 50 % 浓度添加量时, 最终热损失的酶活少于 15 %。但是实验结果显示甘油及丙二醇这两个三碳羟基醇却没有突出的作用, 特别是丙二醇, 随着浓度的增加, 热稳定性反而下降, 这与一般的实验结论不相一致, 这也说明多羟基醇除了在增加酶分子疏水性的同时, 其本身的分子结构对酶有另外一种作用, 使之构象发生变化, 稳定性降低。

#### 5、添加其它物质对酶热稳定性的影响

Costa S A. [28] 在研究中发现戊二醛对提高 *Bacillus sp.* 过氧化氢酶的稳定性有着较好的作用, 0.2 % 的添加量可以将酶液在 30 °C 的半衰期从 11 d 延长至 22 d, 这主要是因为戊二醛作为双功能交联剂与酶蛋白分子发生交联作用, 使酶稳定性增加。然而在本实验中戊二醛的添加使酶活力大幅度降低, 如图 4-9, 这可能是因为交联作用是随机的, 会引起蛋白质高级结构的改变, 使酶失活。

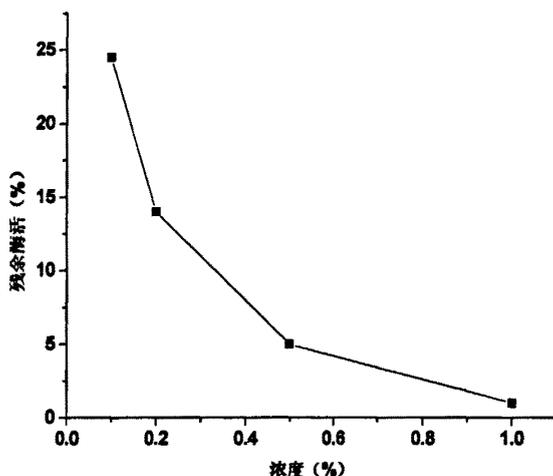


图 4-9 戊二醛对酶热稳定性的影响

Fig.4-9 Effect of glutaraldehyde on thermostability of CAT

同样, 在实验中发现氨基酸, 表面活性剂等作为已报道的提高一些酶蛋白热稳定性的添加剂也并未起到提高 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶热稳定性的作用。

#### 4.3.2 添加稳定剂对 CAT 的热失活过程的影响

从以上研究中可以发现, 添加一些盐类特别是  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  和  $\text{SO}_4^{2-}$  可以很好的提高 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 过氧化氢酶的热稳定性。而在添加这两种盐后, CAT 的在各温度下的失活过程, 相对于原酶有哪些变化, 同样值得研究为更好的提高其热稳定性提供基础理论依据。

图 4-10 则是在添加 500 mmol/L  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  和  $\text{SO}_4^{2-}$  后该 CAT 的热失活过程曲线, 除了很明显的看出在同样时间内各温度下 CAT 的热失活率要比原酶小的多之外, 失活过程曲线也发生了变化, 酶活呈现出先下降很快而后趋于平缓的失活过程, 这不同于原酶的一级的指数失活过程。

因此, 可以得出结论, 在添加两种阴离子后 CAT 失活过程符合出二级失活模型, 由于纯化所得的 CAT 并不存在同工酶系列, 因此其失活过程肯定存在着中间体, 如式

4-5, 即

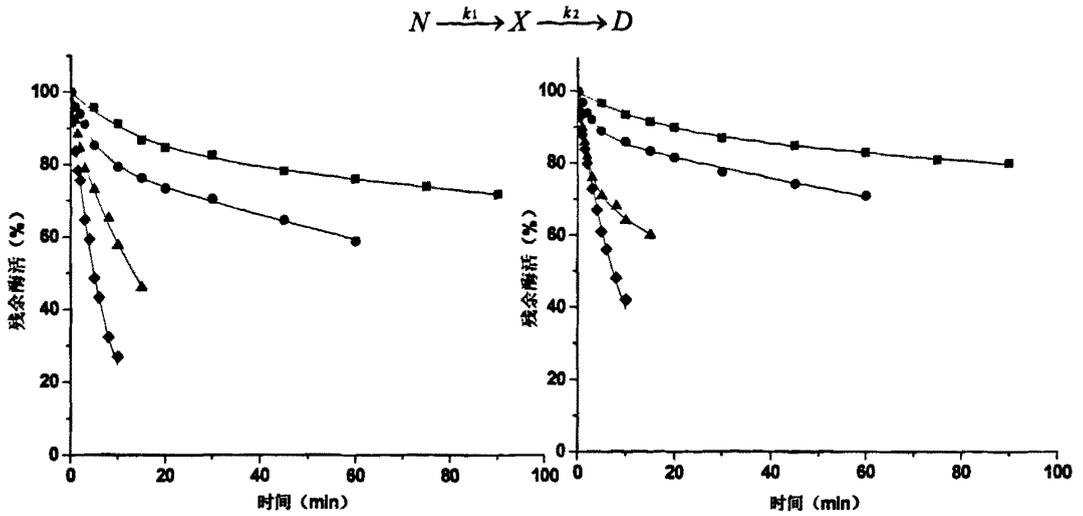


图 4-10 添加阴离子 CAT 的热失活过程 (左: 500 mmol/LCH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> 右: 500mmol/LSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)

Fig.4-10 Inactivation kinetics of CAT in the presence of anions

■- 65 °C -●- 62.5 °C -▲- 60 °C -◆- 57.5 °C

出现这种失活形式的变化在文献中已有报道<sup>[77]</sup>, 在添加金属离子后, 木糖异构酶也有原来的一级失活模型转变为非一级失活模型。之所以出现这种不均匀变化的失活过程, 主要是由于原酶 (N) 与中间态 (X) 两种形式的 CAT 都有一定活性, 而它们的热稳定性却有一定差异, 在不添加稳定剂的情况下, 两种物质的热稳定性接近, 同样温度下可以近似的看作具有相同的热失活速率, 因此在这种情况下 CAT 的失活过程更接近于一级失活模型。而在添加两种阴离子后, 从图可以看出, CAT 在多数温度条件下的失活过程的前期失活速率较快, 但很快趋于平缓, 可以理解为原酶在添加了阴离子后, 对两种状态的 CAT 热稳定性有着不同程度的提高, 导致两种状态下的酶蛋白在同样温度条件下表现出不同的失活速率。而在 65 °C 下添加阴离子的 CAT 的失活过程则更接近一级失活过程, 主要原因是在很高的温度下, 原 CAT 和中间态 CAT 的热失活速率加快, 差异性变小, 呈现出一级失活过程 (如图 4-10)。通过 Origin 软件根据式 4-6

$$R_t = [R_1 - R_2 \cdot k_1 / (k_2 - k_1)] \cdot \exp(-k_1 t) - (R_2 \cdot k_1 / k_1 - k_2) \cdot \exp(-k_2 t)$$

或  $R_t = A \cdot \exp(-k_1 t) - B \cdot \exp(-k_2 t)$  非线性拟合得出各参数值总结于表 4-3。

表 4-3 各温度下添加阴离子 CAT 热稳定性参数

Tab.4-3 Thermostability parameters of CAT in the presence of anions<sup>-</sup>

阴离子	T(°C)	A	k <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )	B	k <sub>2</sub> (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (min)
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	65	0.974	0.140	-	-	4.7
	62.5	9.674	0.700	90.326	0.044	13.4
	60	18.09	0.209	81.906	0.005	100.1
	57.5	15.937	0.068	84.063	0.002	296.9
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	65	0.972	0.090	-	-	7.4
	62.5	26.711	0.464	73.289	0.0132	29.0
	60	12.415	0.272	87.585	0.004	155.7
	57.5	11.450	0.063	88.550	0.001	497.0

由于在添加两种阴离子后 CAT 的热失活过程符合二级失活模型，存在两个失活速率常数，因此不便于利用 Arrhenius 方程计算其他热力学参数，而通过各温度下的半衰期的变化同样反映出在添加两种阴离子后，酶液的稳定性受温度的影响变化仍然较大，若在更高温度（60 °C 以上）下应用将表现的更为明显。

#### 4.4 本章小结

1. 研究了在 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT 中添加糖类、多羟基醇类、金属离子、阴离子和其他一些化学物质对酶应用稳定性的影响，在添加 500 mmol/L  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ 、500 mmol/L  $\text{SO}_4^{2-}$  和 50 % 乙二醇和聚乙二醇后，都可以将酶液在 60 °C 下保温 15 min 后的酶活提高至 80 % 以上， $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、甘油以及糖类也对也同样具有提高酶液热稳定性作用。而  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、戊二醛等则对 CAT 热稳定性的提高没有显著影响或具有负面作用。
2. 通过在各温度下对 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT 失活过程的研究发现，原酶的热失活过程更符合一级失活模型，而在添加  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  和  $\text{SO}_4^{2-}$  后的该酶的失活过程则符合二级失活模型。通过研究热力学参数，可以发现原酶不仅在相对高温条件下稳定性差，并且稳定性随着温度改变而变化较大，而添加这两种稳定剂后，虽然通过各温度下的半衰期比较，可以发现随着温度的改变，稳定性仍然会有较大变化，但是总的来说，在很大程度上可以提高酶在高温条件下的热稳定性。

## 第五章 结论

(1) 采用氯仿冲击法来释放 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 周质 CAT, 在 37℃ 条件下 20  $\mu$ L 氯仿处理 0.01 gDCW 菌体 30 min, 在水溶液中渗透 60 min 后释放 CAT 酶活, 可以达到超声波破碎的 85 % 以上。

(2) 粗酶液经乙醇分级沉淀、DEAE 阴离子交换层析柱、疏水层析柱后, 所得过氧化氢酶样品的比酶活由 1982.4 U/mg 提高到了 13563.8 U/mg, 纯化倍数为 6.8, 回收率达到 32.5 %。该过氧化氢酶的亚基分子量为 63 kD, 在 405 nm 处显示特征吸收峰 (Soret band), 推测含有血红素。计算获得酶的表现米氏常数为 26.87 mmol L/L。该过氧化氢酶不受低亚硫酸钠的还原作用影响, 但被氰化物、叠氮化物和 3-氨基-1,2,4-三唑 (单功能过氧化氢酶的专一抑制剂) 强烈抑制。以邻苯二胺作为电子供体测定酶活时, 该酶不显示过氧化物酶活性, 因此, 将纯化的过氧化氢酶定性为单功能过氧化氢酶。

(3) *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT 在 pH 5-10 的范围内催化活性基本上不受 pH 的影响, 最适 pH 为 12, 并且在 pH 6-11 的范围内表现出良好的稳定性, 25 ℃ 条件下放置 60 min 后基本没有酶活损失。最适酶促反应温度为 55 ℃; 酶的热稳定性实验表明, 该酶在 50 ℃ 以下相当稳定, 保温 60 min 后的酶活基本保持不变, 其耐热性与低温酶相近。

(4) 研究了在 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT 中添加糖类、多羟基醇类、金属离子、阴离子和其他一些化学物质对酶应用稳定性的影响, 在添加 500 mmol/L 乙酸钠、500 mmol/L 硫酸钠和 50 % 乙二醇和聚乙二醇后, 都可以将酶液在 60 ℃ 下保温 15 min 后提高至 80 % 以上。

(5) 通过在各温度下对 *Bacillus subtilis* WSHDZ-01 所产 CAT 失活过程的研究发现, 原酶的热失活过程更符合一级失活模型, 而在添加乙酸钠和硫酸钠后, 酶的失活过程符合二级失活模型。通过热力学性质研究, 可以发现原酶不仅在相对高温条件下稳定性差, 并且稳定性随着温度改变而变化较大, 而添加这两种稳定剂后则具有较好的促进热稳定性作用。

## 致谢

论文从开始的选题，课题进展到最后的审阅定稿，都是在导师华兆哲教授的精心指导和关怀下完成的。两年来导师严谨活跃的治学思想和求实创新的科研风格使我在理论水平、科研能力等方面都受益匪浅，您对学生无微不至的关怀让我甚为感动。在此，作者衷心地感谢导师在学业和生活中给予的培养和关怀，祝华老师事业步步高升，家庭幸福快乐。

感谢指导老师堵国成教授，感谢您对学生的关心与照顾。感谢您提供给学生大量的锻炼机会，以及身体力行的教导学生该如何去做。我坚信，这对我今后的工作和生活会有极大的帮助。衷心的感谢您！

衷心的感谢陈坚教授，陈老师深厚的理论功底、开阔的视野、活跃的科研思维、严谨的治学态度和宽容的为人风格都令作者敬佩。在这样一个享有盛誉、科研成果丰硕的实验室学习使我深感幸运与自豪。

感谢周良、刘茉娟两位高级工程师。感谢赵老师在本人前期工作中给与的帮助，实验的顺利完成与您的启蒙指导密不可分。感谢周老师、刘老师对我生活上的关怀，祝开心快乐。

感谢李江华、房峻、刘立明、李秀芬、吴敬、廖鲜艳、刘和、蒋颖老师以及周良和刘茉娟两位高级工程师的帮助和指导，

感谢过氧化氢酶课题的三位师兄妹：赵志军、邓宇。姚丹丹对我的帮助，怀念与你们一起在实验室的日子。

感谢张东旭师兄，陈晟师姐在蛋白质纯化及电泳技术方面对我的帮助，祝有一个美好的前程。

感谢师兄李兆丰、刘龙、林军、周景文、梁国斌、陆新、许科伟、封磊、朱至、何刚强、尹良鸿、王春、吴辉、贺亮、石峰，师姐阎贺静、张娟、刘志钰、段菁菁、孙赛玉、牛海燕、徐绘霞。

感谢实验室同学鞠喜、郭磊、伍珂、张黎、王芸、芦国军、李溯、董志姚、徐沙、梁楠、任增亮、许庆龙。同样感谢其他环境工程专业同学及好友唐红玲、沈良、郑焕春、李先会、邱琳、戚丽丽等。大家互相帮助，开心的共渡了两年，向大家表示感谢，希望大家事业有成！

感谢女友童星以及父母多年来给予的物质和精神上的支持，正是你们背后默默的奉献才让我能够从容的面对困难、向更高的目标迈进。

## 参考文献

1. 怀斯曼. 酶应用手册[M].上海科学技术出版社, 1986.
2. 方允中, 李文杰. 自由基与酶[M]. 科学出版社, 1989.
3. Loewen PC, Klotz MG, Hassett DJ. Catalase—an “old” enzyme that continues to surprise us [J]. ASM News, 2000, 66(2): 76-82.
4. Amo T, Atomi H, Imanaka T. Unique presence of a Manganese catalase in a hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum calidifontis* VA1 [J]. J. Bacteriol., 2002, 184: 3305-3312
5. Kagawa M, Murakoshi N, Nishikawa Y, et al. Purification and cloning of a thermostable Manganese catalase from a thermophilic bacterium [J]. Arch. Biochem. Biophys., 1999, 362(2): 346-355
6. Allgood GS, Perry JJ. Characterization of a Manganese-containing catalase from the obligate thermophile *Thermoleophilum album* [J]. J. Bacteriol., 1986, 168 : 563-567
7. Kono Y, Fridovich I. Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum* [J]. J. Biol. Chem., 1983, 258: 6015-6019
8. Zamocky M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis [J]. Prog. Biophys. Mol. Biol., 1999, 72: 19-66
9. Mayfield JF, Duvall MR. Anomalous phylogenies based on bacterial catalase gene sequences [J]. J. Mol. Evol., 1996, 42: 469-471
10. Kim HP, Lee JS, Hah YC, et al. Characterization of the major catalase from *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147 [J]. Microbiology, 1994, 140: 3391-3397
11. 冯国基. 现代诊断与治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994
12. Göth L. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture [J]. Clin. Chim. Acta.1991, 196: 143

13. 莫简. 医学自由基生物学导论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989
14. Genencor. PCT Int. Appl. WO 931-721, 1993
15. Novo-Nordisk. PCT Int. Appl. WO 9217571, 1992
16. 财团法人生物技术开发中心. Int.Cl.CN 1219588A, 1999
17. 相尺考亮等著, 黄文洵译. 酶应用手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989
18. 赵志军. 新型过氧化氢酶生产菌的筛选与发酵条件优化[D]: [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学生物工程学院, 2006
19. Kurono Y, Horikoshi K. Alkaline catalase produced by *Bacillus* No. KU-1 [J]. *Agr. Biol. Chem.*, 1973, 37(11): 2565-2570
20. Yumoto I, Fukumori Y, Yamanaka T. Purification and characterization of catalase from a facultative alkalophilic *Bacillus* [J]. *J. Biochem.*, 1990, 108 : 583-587
21. DB Hicks,. Purification of three catalase isozymes from facultatively alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 [J]. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995, 1299 : 347-355
22. HX Wang, Y Tokusige, H Shinoyama, and et al. Purification and Characterization of a Thermostable Catalase from Culture Broth of *Thermoascus aurantiacus* [J]. *Journal of fermentation and bioengineering*, 1998, 85(2):169-173
23. SW Kengen, FJ Bikker, WR Hagen, and et al. Characterization of a catalase-peroxidase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus* [J]. *Extremophiles*, 2001, 5: 323-332
24. 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
25. Gudelj M, Fruhwirth GO, Paar A, et al. A catalase-peroxidase from a newly isolated thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. with potential for the treatment of textile bleaching effluents [J]. *Extremophiles*, 2001, 5: 423-429
26. Costa SA, Tzanov T, Paar A, et al. Immobilization of catalases from *Bacillus* SF on

- alumina for the treatment of textile bleaching effluents [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, 28: 815-819
27. Fruhwirth GO, Paar A, Gudelj M, et al. An immobilized catalase peroxidase from the alkalothermophilic *Bacillus* SF for the treatment of textile-bleaching effluents [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 60 : 313-319
28. Costa S A, Tzanov T. Studies of stabilization of native catalase using additives [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, 30: 387~391
29. 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 [J]. *生物工程学报*, 2004, 20(3): 423-428
30. Zhang XQ, Xue YF and Zhao AM, and et al. Purification and characterization of a monofunctional catalase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. F26. *Chinese J. Biotechnol.*, 2005, 21(1): 71-77
31. T.C. Ransohoff, M.K. Murphy and H.L. Levine. Automation of Biopharmaceutical Purification Processes [J]. *Biopharm*, 1990, 3(3): 20-26.
32. Damid H, Henry W. Protein release from *Escherichia coli* cells permeabilized with guanidine-HCl and Triton X-100 [J]. *Biotechnol. and bioeng.*, 1989, 33: 886-895
33. 周庭, 张鹏, 谭天伟. 胞内蛋白的选择性提取[J]. *微生物学通报*, 200, 27(2):143-145
34. 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 第二版. 北京: 教育出版社, 1990: 241-242
35. 罗九甫. 酶和酶工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 1996: 141-169
36. Song DL. The worldwide development of pulping and bleaching technology [J]. *World Pulp and Paper*, 2001, 20(1): 36-38
37. Dhaese P. Catalase: an enzyme with growing industrial potential [J]. *Chimica Oggi*, 1996, 14(1): 19-21
38. Larisch BC, Duff S. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on characteristics and biological treatment of TCF bleaching pulp mill effluent [J]. *Wat. Res.*, 1997, 31(7): 1694-1700
39. 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].

40. Novella IS, Fargues C, Grevillot G. Improvement of the Extraction of Penicillin Acylase from *Escherichia-Coli*-Cells by a Combined Use of Chemical Methods [J]. Biotechnol. and Bioeng., 1994, 44(3): 379-382
41. F. chaib, A. bernier and E. braendl. Towards large scale methods for the selective release of periplasmic human cystatin c from *E.coli* [J]. Biotechnol. Tech., 1995, 9(3): 179-184
42. Giovanna Ferro-Luzzi Ames, Catherine Prody and Sydney Kustu. Simple, Rapid, and Quantitative Release of Periplasmic Proteins by Chloroform [J]. J. Bacteriol.. 1984, 160(3): 1181-1183
43. Bergmeger H U, Bergmeyer J, Grabl M, et al. Methods of Enzymatic Analysis [M]. 3rd ed, Vol. 3, Weinheim: Verlag Chemie Press, 1983
44. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248~254
45. 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 111~122
46. R.A.Hart, P.M. Lester, D.H. Reifsnyder, J.R, et al. Large scale, in situ isolation of periplasmic IGF-I from *E.coli* [J]. Nat. Biotechnol., 1994, 12 :1113-1117
47. Hans J. P. Marvin, Martin. B. A. Ter Beest, and Bernard Witholt. Release of Outer Membrane Fragments from Wild-Type *Escherichia coli* and from Several *E.coli* Lipopolysaccharide Mutants by EDTA and Heat Shock Treatments [J]. J. Bacteriol., 1989, 171(10): 5262-5267
48. Harrison, S.T.L., Dennis, J.S. and Chase, H.A. Combined chemical and mechanical processes for the disruption of bacteria [J]. Bioseparation, 1991, 2: 95-105
49. 罗杰. 细胞通透性的改变及其应用[J]. 微生物学报. 2001,41(3): 386-389
50. D. Hewer and H. Wang. Protein release from *Escherichia coli* Cells permeabilized with Guanidine-HCl and Triton X-100[J]. Biotechnol. Bioeng., 1989, 33: 886-895

51. Woodbury W, Spencer AK, Stahman MA. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem.*, 1971, 44: 301~305
52. 董泗建, 刘昌龄. 一种鉴定过氧化氢酶活性的铁染色法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(1): 86-88
53. Johnsson K, Froland WA, and Schultz PG. Overexpression, purification, and characterization of the catalase-peroxidase KatG from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272(5): 2834-284
54. 史劲松, 许正宏, 吴奇凡, 等. 冰川环境耐冷菌的冷适蛋白酶分离纯化及酶学性质. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(1): 72-75
55. 黄小红, 陈清西, 王君, 等. 苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)几丁质酶的分离纯化及酶学性质. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(6): 771-773
56. PC Loewen, J Switala. Purification and characterization of spore specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *Biochem Cell Biol.*, 1988, 66: 707~714
57. Brown-Perterson NJ, Salin ML. Purification of a catalase-peroxidase from *Halobacterium halobium*: characterization of some unique properties of the halophilic enzyme. *J. Bacteriol.*, 1993, 175(13): 4197~4202
58. HB Dunford. Catalase. In: Dunford HB (ed). *Heme Peroxidases [M]*. New York: Wiley-VCH, 1999.88
59. KM Smith. Occurrence of porphyrin compounds. In: Smith KM. *Porphyrins and Metalloporphyrins [M]*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1975.16
60. VS Thompson, KD Schaller and WA Apel. Purification and characterization of a novel thermo-alkali-stable catalase from *Thermus brockianus* [J]. *Biotechnol. Prog.*, 2003, 19 : 1292-1299
61. S Shima, A Netrusov, M Sordel, and et al. Purification, characterization, and primary structure of a monofunctional catalase from *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol [J]*, 1999, 171: 317~323

62. A Hochman and A Shemesh. Purification and Characterization of a Catalase-Peroxidase from the Photosynthetic Bacterium *Rhodospseudomonas capsulate* [J]. J. Biol. Chem., 1987, 262(14): 6871-6876
63. 王慧琴, 许海育, 靳云敏, 李学刚. 纯棉织物的生态整染工艺初探[J]. 印染, 2003, 3: 19~21
64. 冷晒祥, 钱国坻, 华兆哲, 等. 过氧化氢酶的棉针织物漂染工艺研究[J]. 印染, 2006, 19: 1-3
65. 翁燧, 王志武, 刘惠. 酶化学修饰的研究进展[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2003, 22: 10~13
66. 刘春叶, 王亚明, 唐辉. 酶的固定化及化学修饰[J]. 云南化工, 2002, 29: 29~31
67. Govardhan C P. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance [J]. Curr Opin Biotechnol, 1999,10: 331~335
68. 徐金库, 张媛媛, 刘均洪. 酶稳定性的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2004, 3: 1~3
69. A. S. Bommarius, B. R. Riebel. Biocatalysis [M]. New York: Wiley-VCH, 2004. 119-120.
70. Michele Violet and Jean-Claude Meunier. Kinetic study of the irreversible thermal denaturation of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase [J]. Biochem. J. 1989, 263: 665-670
71. Bhosale S H, Rao M B. Thermostability of high-activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*(NCL 86.8.20) [J]. Enzyme Microb. Technol., 1995,17: 136~139
72. Teke Khoo. Interaction of Calcium and other metal ions with caldoly sine from *Thermus aquaticus* strain T351 [J]. Biochem J,1984; 221: 407-413
73. 张贺迎, 武金霞, 张瑞英, 宋春风. 稳定剂对糖化酶溶液的保护作用[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2002,22: 374~376
74. 常忠义, 柏俊华, 高红亮, 等. 海藻糖对微生物谷氨酰胺转氨酶热稳定性的研究[J]. 中国生物工程杂志. 2005: 291-294
75. Kaushik J K, Bhat R. Thermal stability of proteins in aqueous polyolsolutions [J]. J Phys

Chem B,1998,102:7058~7066

76. Matsumoto M, Kidal K and Kondo K. Effects of Polyols and Organic Solvents on Thermostability of Lipase [J]. Chem. Technol. Biotechnol. 1997, 70, 188-192
77. K L. Epting , C Vieille , J. G Zeiku, and et al. Influence of divalent cations on the structural thermostability and thermal inactivation kinetics of class II xylose isomerases [J]. The FEBS journal. 2005, 272: 1454-146

## 附录： 作者在攻读硕士学位期间发表的论文

攻读硕士学位期间发表或已投稿的论文：

1. 姚海勇，华兆哲，堵国成，陈坚。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)过氧化氢酶的分离纯化及性质研究，应用与环境生物学报，已录用。

## 性质研究

作者:

[姚海勇](#)

学位授予单位:

[江南大学](#)

## 相似文献(1条)

## 1. 学位论文 孙权 粮-菜轮作系统铜污染的作物和土壤微生物生态效应及诊断指标 2007

本文以“水稻-青菜”轮作制土壤生态系统为对象,综合运用室内外培养、作物盆栽试验、模型模拟,借助微生物代谢指纹图谱方法(Biolog)、磷脂脂肪酸(PLFA)等生物技术并结合传统微生物学方法,研究了黄红壤、青紫泥和小粉土等三种水稻土粮-菜轮作系统主要污染重金属铜对水稻和青菜的毒性效应,并重点探讨了铜胁迫下土壤微生物生态学特征(微生物生物量、呼吸、酶活性、区系组成、代谢剖面、群落结构等)。主要结论如下:

1. 铜污染对植物生长的毒害作用受植物种类和土壤理化性质的双重影响。铜对水稻和青菜生长的剂量效应表现为低铜浓度(50 mg kg<sup>-1</sup>)促进作物的生长,地上、地下部分生物量增加(小粉土除外);100 mg kg<sup>-1</sup>铜显著增加了水稻的根系长度,增加了水稻的分蘖数、株高、穗长,从而显著增加总茎数,产量增加。更高的铜浓度则产生显著的抑制作用。黄红壤和青紫泥水稻铜致死浓度分别为1200 mg kg<sup>-1</sup>和1600 mg kg<sup>-1</sup>,而小粉土为50 mg kg<sup>-1</sup>;三种土壤改种青菜后的表现致死浓度都为800 mg kg<sup>-1</sup>。

铜对作物毒害的生理基础为,50 mg kg<sup>-1</sup>Cu<sup>2+</sup>促进青菜根系体积、直径和叶绿素增加及水稻产量构成因素,青菜根系长度和表面积及水稻总茎数及单茎成穗数显著增加,显著增产。更高的铜浓度则抑制了SOD活性、叶绿素含量及光合作用,丙二醛MDA含量下降,脯氨酸含量显著下降,造成青菜减产。外源铜浓度大于400mg kg<sup>-1</sup>则极显著抑制水稻叶绿素合成,减少穗数,穗粒数和千粒重,产量下降。

2. 水稻茎叶对铜的吸收随土壤铜污染浓度的升高而呈指数式增长,水稻根系和籽粒中的铜浓度随外源铜浓度的增加而极显著线性增加。水稻不同的器官对土壤铜吸收的顺序为:根>茎叶>糙米。但外源铜浓度超过400 mg kg<sup>-1</sup>能够导致糙米铜含量超过食品安全标准。青菜根系的铜含量高达77.77%~80.41%,随铜浓度的增加,青菜地上部分和根系中铜的累积量相应增长,但青菜地上部分铜的相对累积量随铜浓度的增加而下降,从而大大减少高铜污染下青菜可食部位的积累。

3. 三种土壤中的铜均是以Fe-Mn氧化物结合态为主。四种提取剂提取的有效铜含量和外源铜总量均呈极显著的正相关。各种提取态铜之间以及各种形态铜与水稻产量、青菜生物量之间呈显著或极显著负相关,与水稻及青菜组织体内累积的铜呈极显著正相关。其中,以0.5 mol L<sup>-1</sup> DTPA提取铜与外源铜的相关性最好,可以作为土壤有效性铜的最佳化学提取剂。

4. 因溶解性能源物质数量的消耗,三种水稻土的微生物生物量、基础呼吸速率及微生物商随培养时间的延长而显著下降;而在轮作中因根系不断分泌有机物及残根分解的刺激作用而显著增加。三种土壤微生物生物量及基础呼吸速率对铜胁迫的剂量效应表现为在低铜浓度下(<400 mg kg<sup>-1</sup>)增加或显著增加,更高铜浓度因毒害作用而显著下降。土壤微生物代谢商随铜污染浓度的提高及培养时间的延长而升高。但在粮-菜轮作系统中稻作淹水下,随铜污染浓度的提高,黄红壤的微生物代谢商和呼吸速率增加,青紫泥和小粉土的微生物代谢商降低。改青菜早作后,土壤的微生物代谢商和呼吸速率都随铜污染浓度的提高而降低。

5. 低铜浓度(50-100 mg kg<sup>-1</sup>)显著促进了过氧化氢酶、脲酶和蔗糖酶活性,高铜污染浓度则抑制了酶活性。四种酶对铜污染敏感的顺序为:脲酶>蔗糖酶>磷酸酶>过氧化氢酶;粮-菜轮作体系中,根系及其分泌物的共同作用促进土壤酶活性,尤其是水作改旱作后,酶活性进一步极显著提高。

6. 铜污染胁迫下,三种土壤可培养微生物总量在低铜浓度下随铜污染浓度的逐步提高而显著提高;但当铜浓度超过400 mg kg<sup>-1</sup>及随培养时间的延长,铜污染的抑制作用增强。肥沃土壤青紫泥和黄红壤可培养微生物总量随培养时间的延长而显著下降,而贫瘠土壤小粉土可培养微生物总量则因环境条件的改善而随培养时间的延长而提高。铜胁迫使土壤微生物区系组成结构也发生显著变化。三种土壤培养过程中因耐性细菌出现而维持细菌的相对比例不降反升;真菌比例随铜污染浓度的提高而先升后降;而放线菌的比例随铜污染浓度的提高而显著降低。

7. 铜胁迫导致土壤微生物群落结构或功能多样性发生改变。三种土壤之间的C12-C20磷脂脂肪酸(PLFA)的含量达到显著差异;每种土壤内所含有的C12-C20同碳结构PLFA则达极显著差异。

这种差异首先表现在可检测PLFA的类型变化。培养8周时,100-400 mg kg<sup>-1</sup>铜显著促进了可以命名的微生物类型,800 mg kg<sup>-1</sup>铜则显著抑制,以贫瘠的小粉土表现最典型。随培养时间延长至52周,各土壤可命名磷脂脂肪酸类型增加,且低铜浓度促进磷脂脂肪酸类型增加,高铜浓度则显著抑制。可见,铜胁迫并非改变被测土壤PLFA结构的唯一影响因素。

其次,铜污染显著改变了微生物群落主要构成成分的结构比例。三种土壤PLFA随培养时间而变化。黄红壤和青紫泥微生物群落都以细菌占绝大多数,真菌和放线菌类型与数量比例都很低,与培养计数法获得的结果非常一致。小粉土对照土壤培养8周时真菌占比例高达58.58%,细菌只占27.51%,放线菌未能测出;而培养52周时,细菌比例高达69.5%,真菌比例下降到6.85%,放线菌仅占0.69%。即,小粉土即使在无铜污染的情况下,微生物群落结构也发生了剧烈改变。当然,铜胁迫进一步促进了土壤微生物群落结构的改变。细菌和放线菌的比例随铜污染浓度的提高而显著提高,真菌的比例和真菌/细菌的比例都随铜污染浓度的提高而显著下降。

此外,铜污染导致土壤微生物产生适应性或耐性反应,一些特征磷脂脂肪酸消失或涌现。铜胁迫使甲烷营养菌I型16:1w5c和好氧细菌15:0 3OH、16:0 2OH及硫酸盐还原细菌17:1 w8e消失,厌氧细菌17:0 ISO 3OH和真菌20:2W6、9C受激发作为新种出现,革兰氏阴性细菌(17:0 CYCLO和19:0 CYCLO w8c)和革兰氏阳性细菌(4:0 iso、15:0 anteiso、15:0 iso、15:0 iso 3OH、16:0 iso、17:0 anteiso、17:0 iso)大量涌现。

8. 铜胁迫降低了土壤的微生物群落代谢剖面(AWCD),且AWCD值与测试时间之间呈非线性关系。三种土壤Biolog生态盘碳源利用的铜浓度效应受培养时间的影响而存在一定差异。随着铜污染浓度增加到800 mg kg<sup>-1</sup>时,土壤的AWCD值下降,微生物群落生理代谢功能下降。三种土壤在31种碳源构建的主成分分析坐标体系中存在明显的空间分异,表明微生物群落结构对铜污染非常敏感。

三种土壤铜污染微生物群落的功能多样性指数在同一时间的不同浓度和同一浓度的不同污染时间下存在差异。高铜浓度(>800 mg kg<sup>-1</sup>)导致丰富度显著下降,均匀度和Shannon指数也下降,微生物种群变得单一。

9. 根据铜污染对水稻、青菜生长的抑制效应,以及粮-菜轮作系统中土壤微生物生物量、微生物商、酶活性等生态指标的铜胁迫剂量效应,以水稻、青菜减产10%,水稻籽粒或青菜可食部位铜含量不超过10 mg kg<sup>-1</sup>,特别是运用生态剂量(ED10)的概念,根据上述各项指标与铜浓度对数值的模拟模型,计算了黄红壤、青紫泥和小粉土的铜临界指标分别为198、185和71 mg kg<sup>-1</sup>。

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis\\_Y1398700.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis_Y1398700.aspx)

授权使用: 浙江大学(wfzjdx), 授权号: 21db49a7-3ab0-4d5f-ada5-9ea0012b92ef

下载时间: 2011年3月8日