

江南大学

---

硕士学位论文

---

*Serratia marcescens* SYBC-01产过氧化氢酶发酵条件优化及酶学性质研究

---

姓名：钱斯亮

---

申请学位级别：硕士

---

专业：生物化学与分子生物学

---

指导教师：廖祥儒;蔡宇杰

---

20080601

## 摘 要

过氧化氢酶(CAT)参与活性氧代过程,在清除超氧化物阴离子、过氧化氢和过氧化物,阻止或减少羟基自由基(Hydroxy radical)形成等方面发挥着重要作用。

本研究利用无机培养基,从无锡惠山上采集的土样中分离得到一株产胞内 CAT 活力较高的菌株 SYBC-01。经形态学和生理生化初步鉴定为 *Serratia* 属,并对其 16S rDNA 基因序列测定和比对发现,该菌株与 *Serratia marcescens* DSM 30121 的 16S rDNA 基因序列的同源性为 99.9%,因此命名为 *Serratia marcescens* SYBC-01。

对菌株 *S. marcescens* SYBC-01 产 CAT 的摇瓶发酵培养基和发酵条件进行了研究。确定其适宜的发酵培养基组成为(g/L):可溶性淀粉 12.5,酵母膏 15,磷酸二氢钾 0.5,初始 pH 为 8.0。适宜的发醇条件为:种龄为 8 h,装液量为 60 mL/250 mL,接种量为 10% (v/v),摇瓶发酵时间为 12 h,培养温度为 28℃。优化前菌株 *S. marcescens* SYBC-01 的 CAT 酶活为 480.20 U/mL,优化后其酶活达到 1105.58 U/mL,提高了 1.30 倍。

在菌株 *S. marcescens* SYBC-01 胞内检测到 3 个 CAT 同工酶。本研究将同工酶 CAT2 作为目标 CAT,通过硫酸铵—凝胶过滤层析—离子交换层析三步纯化过程对其分离,最终得到电泳纯酶蛋白,纯化倍数为 62.51,酶蛋白得率为 32.06%。其天然分子量为 140 KDa,其分子构型为同源二聚体。经动力学分析确定该酶的表现米氏常数  $K_m$  为 29.7 mmol/L,最大反应速度  $V_{max}$  为 80925.79 U/mg 蛋白。 $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  对 CAT2 有激活作用,该酶能被叠氮化物和金属螯合剂等单功能过氧化氢酶抑制剂抑制,对乙醇和氯仿等有机溶剂有耐受性。在以愈创木酚作为电子供体测定过氧化物酶活性时发现,该酶不显示相应的酶活性。所以 CAT2 为单功能过氧化氢酶。

纯化后的 CAT2 的最适 pH 为 7,在 pH 6-pH 10 范围内稳定性较好,相对酶活均超过 50%。CAT2 的最适温度为 70℃,该酶的温度稳定性较好,在 30℃-60℃ 范围内分别保温 30 min 和 60 min,残余酶活均超过 70%。

**关键词:** 过氧化氢酶; 粘质沙雷氏菌; 发酵条件优化; 分离纯化; 酶学性质

## Abstract

Catalase is involved in active oxygen metabolism and plays an important role in scavenging superoxide anions, hydrogen peroxide, and other peroxides; retarding or reducing hydroxyl radical formation.

A strain named SYBC-01 with high catalase activity had been screened out from the soil of Huishan in Wuxi with an inorganic medium. According to the morphological, physiological and biochemical identification, this strain belonged to *Serratia* sp. Furthermore, the result of 16S rDNA showed that the homology between strain SYBC-01 and *Serratia marcescens* DSM 30121 was 99.9 %, so this strain was named *S. marcescens* SYBC-01.

The optimized fermentation medium contained (g/L): soluble starch 12.5, yeast extract 15, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, pH 8.0. The optimized fermentation condition was: 8 h of seed age, 60 mL of the suitable medium volume size in 250 mL flasks, 10 % of the inoculum size, 12 h of the cultivation time and 28°C of the fermentation temperature. The catalase activity was increased 1.3 times from 480.20 U/mL to 1105.58 U/mL after optimization.

There were three isozymes existed in the cells of *S. marcescens* SYBC-01. Isozyme CAT2 had been purified from this strain, with a three-step procedure consisting of ammonium sulfate precipitation, gel filtration, and ion exchange chromatography. The purification and yield were 62.51-fold and 32.06 % respectively. The molecular mass of CAT2 was estimated to be 140 KDa by gel filtration chromatography, and it is a dipolymer comprising of two identical subunits. The apparent K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> value of CAT2 was 29.7 mmol/L and 80925.79 U/mg respectively, when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was utilized as substrate. CAT2 could be activated by both Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. It was strongly inhibited by azide and EDTA (the inhibitor of typical catalase). CAT2 had the tolerance to alcohol and chloroform, which was the typical feature of the monofunctional catalase subgroup. No peroxidase activity of this enzyme was detected when using guaiacol as electron donor. Therefore, it was concluded that isozyme 2 belonged to the typical catalases.

The optimum pH of CAT2 was 7, with relative activities were all above 50 % at the rang of pH 6 to pH 10. The optimum temperature of CAT2 was 70°C, whose residual activity retained more than 70 % of the initial activity from 30°C to 60°C for 30 min and 60 min. CAT2 was proved to have a good temperature stability.

**Keywords:** Catalase; *Serratia marcescens*; Optimization of fermentation conditions; Purification; Characterization

## 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： 钱斯亮 日 期： 2008.5.26

### 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： \_\_\_\_\_ 导师签名： 徐泽霖  
日 期： 2008.5.26

## 第一章 绪论

### 1.1 研究背景

#### 1.1.1 过氧化氢酶及其催化机制

过氧化氢酶(Catalase, CAT, EC 1.11.1.6)以过氧化氢为专一底物,通过催化一对电子转移而最终将其降解为水和氧气。所有好氧生物在进行氧代谢时都会产生有害的氧自由基,这其中就包括  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。因此, CAT 是生物抗氧化体系中的重要成员<sup>[1]</sup>。

一般认为,在 CAT 的催化反应过程中,它会与  $\text{H}_2\text{O}_2$  结合形成一种复合物,称之为化合物 I。CAT 的辅基为 Fe(III),化合物 I 的辅基为 Fe(V),即在催化反应中 Fe 由三价变为五价,并使化合物 I 成为活性氧化剂,然后化合物 I 又可以氧化另一分子的  $\text{H}_2\text{O}_2$  并生成  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{O}_2$ ,其又恢复为 CAT<sup>[2]</sup>。

从反应机制来看,要使酶催化两分子  $\text{H}_2\text{O}_2$  成为  $2\text{H}_2\text{O}$  与  $\text{O}_2$ ,必须在单一活性部位上有两个分子  $\text{H}_2\text{O}_2$  碰击。这样碰撞机会随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度下降而减少。化合物 I 的量依赖于 CAT 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度。据此可知,如果  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度固定不变, CAT 清除  $\text{H}_2\text{O}_2$  的速度则与 CAT 的实际浓度成正相关。例如,肝中 CAT 浓度比脑与心脏中高,所以肝中  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除速度也一定高于脑和心脏中  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除速度。

CAT 也可以通过催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化某些氢供体,如抗坏血酸、亚铁氰化物、苯酚、醇、甲酸、亚硝酸盐、叠氮化合物和羟胺等。

总之, CAT 的催化机制是复杂的,虽然化合物 I 的分子结构仍未确定,但酶的高催化速度和反应中电子转移必然与酶分子结构密切相关。

#### 1.1.2 过氧化氢酶的分类和分布情况

Goldberg和Hochman首次根据不同的催化活性将不同来源的CAT进行分类,他们建议将所有已存在的CAT分为三个亚群:典型过氧化氢酶,非典型过氧化氢酶和过氧化氢酶-过氧化物酶系<sup>[3]</sup>。但这个分类标准主要依赖的是已纯化的过氧化氢酶的特有物理和化学特征,而同种类型并非都是同源的。

随着各种来源的CAT完整序列的解出,Zámocký等<sup>[4]</sup>对CAT重新进行了分类,其中两类含有血红素,分别命名为典型过氧化氢酶(Typical catalases)或真过氧化氢酶(True catalases)和过氧化氢酶-过氧化物酶(Catalase- peroxidases);第三类缺乏血红素辅基,但每个亚基都有两个 $\text{Mn}^{2+}$ ,故命名为含锰过氧化氢酶(Manganese-catalases)。

第一类过氧化氢酶存在于几乎所有的有氧呼吸生物体内,包括真核生物和原核生物,但是到目前为止还没有在古细菌中发现。绝大多数过氧化氢酶都是同源四聚体,包含四个血红素辅基,分子量为200 KDa-340 KDa,但也有同源二聚体。这类酶又被称为单功能过氧化氢酶。可被 $\text{N}_3^-$ 或 $\text{CN}^-$ 抑制,但 $\text{N}_3^-$ 或 $\text{CN}^-$ 也可抑制其它的许多酶,最有效的

抑制剂为3-amino-1,2,4-triazole。

真核生物中仅青霉属和壳针孢属属于第二类。它们的分子量为120 KDa-340 KDa, 一般说来是同源二聚体, 但也有同源四聚体, 甚至存在与典型过氧化氢酶相比是可逆的二聚体—四聚体结合形式。这类酶最显著的特征就是它具有双功能催化行为, 既有过氧化氢酶的催化能力, 又有过氧化物酶的催化能力。这种双功能酶仅在较窄pH范围内显示其最大活性, 且不受3-amino-1,2,4-triazole抑制。

直到现在仅发现了三种含锰过氧化氢酶, 一种存在于乳酸菌, 另外两种存在于嗜热生物种。这类酶常被称为假过氧化氢酶, 因为它们活性位点起作用的是锰离子而非铁血红素。与典型过氧化氢酶相比, 含锰过氧化氢酶不会被 $\text{N}_3^-$ 和 $\text{CN}^-$ 抑制。一般较高分子质量的酶为六聚体, 而较低分子质量的酶为五聚体<sup>[5]</sup>。

### 1.1.3 过氧化氢酶的应用领域

CAT 是生物体内一种重要物质, 具有非常重要的生理功能, 其中最主要的是参与活性氧代过程。CAT 在清除超氧自由基、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和过氧化物以及在阻止或减少羟基自由基形成等方面发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。CAT 在现实生活、生产实践中也应用广泛。农业、纺织业、食品业、乳制品业、纸浆和造纸业以及环保业都有应用价值。

在食品与乳制品工业上, 牛奶保存和奶酪制造前用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对牛乳和干酪原料乳进行杀菌消毒, 然后再用CAT去除残留 $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[7]</sup>。与加热杀菌不同, 这种杀菌方法可以在低温下进行, 不仅不会杀灭有用的乳酸菌, 而且不会影响到脂肪酶、蛋白酶及磷酸酶的作用。利用CAT分解 $\text{H}_2\text{O}_2$ 放出的 $\text{O}_2$ 性质, 可以在烘烤食品过程中添加 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和CAT用作酥松剂<sup>[8]</sup>。用葡萄糖氧化酶除去食品中葡萄糖和氧时生成的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 用CAT分解, 分解 $\text{H}_2\text{O}_2$ 时生成的氧有杀菌和漂白的作用。该酶最广泛的用途是作为抗微生物剂用于食品加工, 其来源最常见的是动物和黑曲霉。

在纸浆和造纸工业上, 由于传统的含氯漂白剂与浆中残余木素反应产生氯酚类化合物等毒性污染物质, 尤其是在漂白废水中发现剧毒二苯并二恶英PCDDs、氯代二苯并呋喃PCDF类物质后, 世界各国相继采取措施, 禁止在纸浆和造纸工业上采用含氯漂白剂。因此近年来世界造纸行业相继以 $\text{H}_2\text{O}_2$ 漂白来代替传统漂白方法。传统上用 $\text{SO}_2$ 和亚硫酸氢钠去除漂白后的 $\text{H}_2\text{O}_2$ , 随着世界各国对环境和安全问题的考虑, 促进了寻找替代 $\text{SO}_2$ 和亚硫酸氢钠去除漂白后的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 方法研究。

在医学上, 用低浓度过氧化氢清除坏死组织, 然后再用过氧化氢酶反应多余的过氧化氢。葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶复合制剂还可用于防治动物肠道、胃部由细菌引起的一些疾病<sup>[9]</sup>。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, 对某些疾病的诊断和鉴别诊断也具有重要意义<sup>[10,11]</sup>。由于 $\text{H}_2\text{O}_2$ 具杀菌、清洁、漂白及消毒的功能, 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>[12]</sup>。

在环保方面上, 发达国家环保行业主要采用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 处理各种工业废水, 而中国环保行业则刚刚起步, 只有少数企业使用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 处理工业废水, 而CAT可以取代化学试剂降解生

产 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的工厂或在生产过程中使用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的工厂排除的工业废水中所含有的 $\text{H}_2\text{O}_2$ ，利用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和CAT处理工业废水，可以降解芳环化合物和脂族化合物。利用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和CAT处理生物过滤器还可提高其对废水脱臭效果<sup>[13]</sup>。

在其它方面：利用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和CAT同时使用放出 $\text{O}_2$ 的机理，可用于橡胶的成型、塑料及多泡性黏合剂；利用2-羟酸氧化酶和CAT生产一种除草剂，即N-磷酰甲基甘氨酸，它是一种广谱的植物毒素和除草剂，可用于控制多种植物的生长等。

## 1.2 国内外研究进展

学术界对过氧化氢酶的研究比任何其它酶类都要悠久<sup>[14,15]</sup>：1811年Thenard首次发现动植物组织可依靠一种特殊的物质来分解 $\text{H}_2\text{O}_2$ 产生 $\text{O}_2$ ，Schonberin也观察到这种现象，他认为在该类反应中酶起到了关键性作用。1901年，Loew将这类分解 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的酶命名为过氧化氢酶。1923年，Warburg根据该酶活性可以被氰化物抑制证明了其活性中心包含有铁离子。1937年Summer与Dounce得到第一个牛肝过氧化氢酶(Bovine liver catalase, BLC)的晶体。1947年，具有先驱意义的工作就是Chance发现了在过氧化氢酶和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 之间存在一种基本的复合形式(即化合物I)。在此基础上，Keilin和Hartree重新对过氧化氢酶的生理学功能进行了研究，发现其在生理上实际起着过氧化的作用。Chance认为过氧化氢酶在机体中所起到的作用仅仅取决于 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的静态浓度，低浓度时才有过氧化的功能，而在高浓度时具有普遍的催化功能。除了化合物I，Chance还发现了由化合物I派生出来的一类化合物，命名为化合物II。1952年又发现了一种无活性形式——化合物III。至此，过氧化氢酶与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 反应过程中的所有中间态都被发现。第一个原核生物体内的过氧化氢酶是1948年由Herbert和Pinsent从*Micrococcus luteus*中提纯出来。60年代初，阐明了过氧化氢酶活性部位几个重要的氨基酸残基在稳定蛋白质四级结构方面所起的重要作用。接下来的十年里，过氧化氢酶研究的重点放在其在原核生物以及低等真核生物(主要指酵母)体内的基因表达和细胞内定位<sup>[5]</sup>。

1980年Vainshtein等从一种低等真核细胞(*Penicillium vitale*)中分离出过氧化氢酶，并在分辨率3.5 Å条件下得到了第一个电子密度图谱。同年，Eventoff等得到了BLC晶体，并且在2.5 Å分辨率下与X射线衍射得出的细节非常符合<sup>[16]</sup>。1984年，Kirkman等发现了与BLC紧密结合的NADPH<sup>[17]</sup>，1985年在BLC的X射线衍射结构中也发现了这类NADPH<sup>[18]</sup>。在过去的十几年中，由于各种基因测序工程的飞速发展<sup>[19-21]</sup>，从各类生物中得到的过氧化氢酶序列图谱不断扩展和更新，从这些数据可以看出这一大类氧化还原酶是非同源的。

由于过氧化氢酶具有在医药和工业上的应用潜力，围绕着修饰和设计这种蛋白的方法不断被尝试。因为这种蛋白的结构很不稳定，起初的工作主要致力于提高蛋白结构的稳定性方面，如用双功能试剂交联得到活性改变的固定化过氧化氢酶，用聚乙二醇(PEG)修饰蛋白以提高过氧化氢酶的半衰期和降低其被蛋白质水解的敏感度<sup>[22]</sup>。

最近十几年，DNA操纵策略被广泛的应用于过氧化氢酶基因工程。第一个基因工

程过氧化氢酶合成于 1990 年, 从此对过氧化氢酶的分子生物学研究进入了一个崭新的时代<sup>[23]</sup>。

现在国外研究集中于用 X 射线分析过氧化氢酶的立体结构及活性中心<sup>[24]</sup>、过氧化氢酶去除染织中残留的过氧化氢的应用<sup>[25]</sup>、强磁场及超声波和辐射对过氧化氢酶酶活的影响等<sup>[26]</sup>。动物肝脏是过氧化氢酶的一个很大来源, 国内外均已实现这一工艺的工业化生产。巴西研究者又开发了从人胎盘中提取医用过氧化氢酶的技术<sup>[27]</sup>。现在市售商品过氧化氢酶基本为牛肝过氧化氢酶, 纺织用商品过氧化氢酶基本由丹麦 Novozyme 垄断, 产自经基因改性后的黑曲霉。

国外报道的产过氧化氢酶的细菌有溶壁微球菌、球形红假单胞杆菌、足球菌属、链球菌属、乳杆菌属、明串珠菌属、大肠杆菌及嗜热性细菌; 真菌有粗糙链孢霉、微紫青霉、嗜热链酶菌和黑曲霉。日本在过去 20 年间有 9 项专利用于霉菌、酵母、细菌和重组菌生产过氧化氢酶(包括固态发酵和液态发酵), 其中涉及过氧化氢酶在纺织工业中的应用。美国和丹麦各有 1 项用霉菌生产过氧化氢酶的专利。目前已用于生产过氧化氢酶的菌株及合成水平见表 1-1:

表 1-1 菌株产过氧化氢酶水平比较<sup>[12]</sup>

Table 1-1 Comparison of catalase activities from different strains

菌种	研究单位	过氧化氢酶水平	规模
<i>Thermophilic streptomyces</i>	中国科学院微生物研究所	140 U/mL	摇瓶
<i>Aspergillus niger</i>	中山大学生物工程研究室	389.17 $\mu\text{molmin}^{-1}\text{g}^{-1}$	摇瓶
基因工程菌	江南大学	185 U/mL	发酵罐
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	苏州大学生命科学学院	292 U/mL	摇瓶
<i>Penicillium Variabile</i>	意大利 Basilicata 大学	735 U/mL	发酵罐
<i>Aspergillus niger</i>	波兰, Maria Curie-Sklodowska 大学	78 U/mL	发酵罐
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	印度, 中央食品技术研究院	104 U/g 湿菌体	发酵罐
<i>Pseudomonad</i>	瑞典, Heino Kuusk	161 U/mL	摇瓶
<i>Vibrio rumoiensis</i>	日本, 早稻田大学	321 U/mg 细胞	摇瓶
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	日本, 三菱气化公司	10700 U/mL	发酵罐
基因改性黑曲霉	Novozyme	50000 U/mL	商品
基因改性黑曲霉	Genencor	50000 U/mL	商品
未知	Reyonet	50000 U/mL	商品
嗜热子囊菌	江南大学	2762 U/mL	发酵罐

最近, 更多的学者把目光投向了将对过氧化氢酶的理论研究应用于医学和环保领域, 也有一些学者试图发现更多不同来源或者特殊性质的过氧化氢酶, 以期开拓过氧化氢酶这一古老酶新的研究方向。

2006 年, Kimiyasu 等<sup>[28]</sup>报导了分离出超过 100 株能在 pH 1.0 或 pH 2.5 培养基上生长的真菌。其中四株很特殊曲霉菌株, 所产的过氧化氢酶在 pH 2.0 的环境下稳定性很高。四株中的三株产的过氧化氢酶又很特殊, 有两种是胞外酶, 四种是胞内酶。四种胞内酶中的两种胞内酶的催化性质和  $pI$  又和胞外酶的相似。2007 年, Jamal 等<sup>[29]</sup>通过小鼠实验发现过氧化氢酶作为媒介引起小鼠纹状体中乙醛的形成。他们的发现强烈表明,

过氧化氢酶在小鼠大脑肾上腺皮质激素的直接形成中扮演着重要的角色。2008年, Ebara等<sup>[30]</sup>从嗜热细菌中获得耐碱且高酶活的过氧化氢酶, 克隆了过氧化氢酶基因, 并在大肠杆菌中表达。纯酶的最适 pH 为 10.0, 其耐碱特性使该酶有希望应用于生物技术领域, 比如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 净化系统。2008年, Kim等<sup>[31]</sup>第一次克隆了甲虫类的过氧化氢酶基因 *PbCat*, 并研究了该过氧化氢酶的性质。他们的研究拓宽了昆虫过氧化氢酶的分子信息, 也为将来昆虫过氧化氢酶基因的研究作出了贡献。

目前, 国内对微生物过氧化氢酶的研究主要停留在不同来源过氧化氢酶的性质和提高酶活力方面, 真正将其进行工业化生产的不多, 但是正逐步从理论研究向工业化应用方向转变。江南大学对过氧化氢酶的研究比较多, 包括高产菌株的筛选、极端酶的筛选, 发酵条件优化、基因工程菌的构建、酶的纯化和性质研究等。

2001年, 王凡强等<sup>[32]</sup>优化了热稳定性过氧化氢酶工程菌株的发酵条件, 使得工程菌在最适条件下酶活力可达 30000-35000 U/L 以上, 约是原始菌株的 10 倍。且工程菌在无选择压力的条件下连续传代 60 代, 基本保持稳定, 连续传代 100 代, 仍有 80% 左右的菌株携带重组质粒。2002年, 刘建忠等<sup>[33]</sup>通过表面响应法优化了黑曲霉过氧化氢酶的发酵条件。2004年, 洪海军等<sup>[34]</sup>通过单因子和正交实验优化了溶壁微球菌的发酵条件。2007年, 赵志军等<sup>[35]</sup>从纺织厂的车间污水中分离获得菌株 WSHDZ-01, 并通过该菌的形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析, 鉴定该菌为枯草芽孢杆菌, 并且优化了该菌的培养条件。

2002年, 王凡强等<sup>[36]</sup>继续研究了重组大肠杆菌热稳定性过氧化氢酶的纯化及性质。将产热稳定性过氧化氢酶的重组大肠杆菌培养后得到的菌体进行超声波破碎, 破碎后的粗酶液经热处理、硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析、HiPrep 16/10 Phenyl 疏水作用层析、Superdex 200 HR 10/30 凝胶过滤层析提纯后得到电泳纯的酶, 比酶活达到 15629 U/mg。此酶的最适温度为 70°C, 最适 pH 7.0, 在 60°C 保温 60 min 酶活基本不变, 在 pH 3-8 的范围内比较稳定。此酶的 K<sub>m</sub> 和 V<sub>max</sub> 分别为 7.75 mmol/L 和 27.8 mmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>。1 mmol/L 的 Zn<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 可使该酶完全失活, KCN、NaN<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 和巯基乙醇对酶活有抑制作用, 50 mmol/L 的 EDTA 不影响酶活性。2005年, 张心齐等<sup>[37]</sup>从一株低度嗜盐、兼性嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. F26 中纯化得到一种碱性过氧化氢酶, 并对该酶进行了性质研究。该酶与单功能过氧化氢酶亚群有一定的相似性, 且有热敏感和良好的盐碱稳定性等特点。首次发现该酶在 pH 11 的高碱条件下表现出最高活力和一定的稳定性。

2008年, 同济大学 Chen 等<sup>[38]</sup>将过氧化氢酶用于生物传感器, 用来检测水中农药、杀虫剂和重金属等污染物, 这将对环境生物传感器的发展起到积极的作用。

## 1.3 立题依据

### 1.3.1 不同来源过氧化氢酶的性质比较

从人或动植物组织中提取的过氧化氢酶热稳定性很差(表 1-2)<sup>[39,40]</sup>, 且受来源和季

节等因素影响较大，容易污染。与之相比，用微生物法发酵制备酶制剂具有生产者来源范围广、容易培养、生产周期短、价格便宜、可大规模生产等优点。

表 1-2 不同来源过氧化氢酶最适 pH 及热稳定性的比较

Table 1-2 Comparison of optimum pH and thermal stability with separate source catalases

来源	pH	热稳定性
细菌	溶壁微球菌最适 pH 在 7-9， 通常活性在 pH 6。	随来源不同而不同，如鼠伤寒沙门氏菌的 CAT 可耐 80℃ 处理 30 min。
肝脏	在 pH 5.3-pH 8.0 有活性，最适 pH 为 7 左右，pH 5.3 以下急剧失活。	很差。
植物	—	低温时较好，温度较高时则较差。
嗜热子囊菌	在 pH 5-pH 12 范围内稳定。	好。
黑曲霉及青霉	在 pH 2-pH 7 显示一定的活性。黑曲霉的 CAT，即使在 pH 3 这样低的环境下也稳定。	室温 24 h 能保持其活性的 70 %。

### 1.3.2 生产菌株的选择依据

不同来源过氧化氢酶的研究仍然是学术界研究的热点<sup>[30,31]</sup>，到目前为止，国内尚无粘质沙雷氏菌产过氧化氢酶的报道，国外虽有一例<sup>[41]</sup>，但研究的并不详细，且  $K_m$  值太高。表 1-3 列举了一些不同来源过氧化氢酶的动力学参数和比活力<sup>[41]</sup>。

本研究试图筛选出一株较高产过氧化氢酶的粘质沙雷氏菌菌株，并对该菌株所产的过氧化氢酶的性质做一个比较详细的研究，希望在  $K_m$  值上和酶学性质上有更好的结果，使其有更好的应用价值。据报道，该菌产生的灵菌红素还具有杀死蓝藻的功效<sup>[42]</sup>，在未来环保业中也具有潜在的应用价值。

表1-3 不同来源过氧化氢酶的动力学参数和比活力

Table 1-3 Kinetic parameters and specific activities of separate source CATs

Source	$V_{max}^a$	$K_m$ (mM)	SA <sup>b</sup>
<i>A. niger</i>	277,000	465	21,400
<i>B. fragilis</i>	380,000	279	69,100
<i>B. pertussis</i>	595,000	154	225,000
Bovine liver	212,000	93	91,800
<i>B. abortus</i>	562,000	174	145,800
<i>E.coli</i> HP II	70,000	64	20,700
<i>H.pylori</i>	272,000	127	61,400
Human erythrocyte	587,000	80	273,800
<i>L. seeligeri</i>	214,000	111	89,300
<i>M. luteus</i>	313,000	152	109,100
<i>P. mirabilis</i>	1630,000	537	160,000
<i>P. aeruginosa</i>	71,000	67	71,800
<i>P. syringae</i>	281,000	92	84,600
CN <sup>-</sup> <i>S. cerevisiae</i>	355,000	125	116,100
<i>S. marscesens</i>	243,000	228	98,900
<i>X. campstris</i>	297,000	77	99,900

<sup>a</sup>Units of  $V_{max}$  are  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \mu\text{mol heme}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

<sup>b</sup>SA, specific activity expressed in units/mg protein.

## 1.4 本论文的主要研究内容

本论文的主要研究内容包括以下四个方面：

- (1) CAT产生菌的分离、鉴定及系统发育分析。从自然界筛选出产CAT的菌株，并对分离菌株进行形态学、生理生化和系统发育分析。
- (2) 初步研究该菌株产CAT的营养条件和环境条件，并对发酵过程进行初步分析，希望通过采用改进后的摇瓶发酵条件提高CAT酶活，缩短发酵周期。
- (3) CAT的纯化。通过硫酸铵沉淀、凝胶过滤和离子交换等方法对目标酶进行纯化，以获得CAT纯品，为酶学特性分析提供材料。
- (4) 纯酶的性质研究。

## 第二章 CAT 产生菌的筛选和鉴定

### 2.1 前言

CAT 广泛存在于动物、植物和微生物中,如动物肝脏、红细胞、植物叶绿体以及细菌、真菌、放线菌等。国内外对微生物来源的 CAT 研究有溶壁微球菌、球形红假单胞菌、大肠杆菌、芽孢杆菌和黑曲霉等。但是目前国内外对粘质沙雷氏菌产 CAT 的研究只有一例<sup>[41]</sup>,并且对其酶学性质的研究存在  $K_m$  值高,很多重要性质的研究还缺乏等问题。基于此,本实验选择了筛选到的粘质沙雷氏菌为研究对象,希望对其产的 CAT 的性质做全面的研究,特别是解决  $K_m$  值高这个突出问题,也希望该菌所产的 CAT 在纺织和环保领域有很好的应用价值。

从自然界中分离菌种主要包括以下几个方面:首先是调查研究,根据目的查阅充分的资料,然后设计实验方案,接着开始采样、富集培养、平板分离、初筛、复筛和单株纯种分离,最后得到目标菌株。本文以特殊的无机培养基进行平板筛选,将从自然界中筛选得到的 6 株菌株在 LB 培养基上进行划线分离,得到单菌落后进行接触酶反应实验,发现 5 株产 CAT 的菌株,将 5 株菌株分别进行发酵培养,然后通过复筛,用 CAT 酶活水平高低的检测方法,最终确定 1 株相对高产 CAT 的菌株为实验菌株。然后在形态学和生理生化特性研究的基础上,结合 16S rDNA 序列分析,鉴定该菌株。

### 2.2 材料和方法

#### 2.2.1 实验材料

##### (1) 菌株

从无锡惠山上采集的 20 个土壤试样,筛选出 5 株产 CAT 的菌株。

##### (2) 试剂

酵母粉为 OXOID 公司产品; *Taq* DNA 聚合酶, dNTPs 为 TaKaRa 公司产品; 胶回收试剂盒均为上海博大泰克生物工程有限公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。

##### (3) 仪器

旋转式恒温摇瓶柜	上海苏坤实业有限公司
冷冻高速离心机	日本日立(HITACHI)公司
超声波破碎仪	Ultrasonic Processor
UV-2100型紫外分光光度计	尤尼科(上海)仪器有限公司
立式压力蒸汽灭菌锅	上海医用核子仪器厂
电热恒温水浴锅	上海一恒科技有限公司
PE9700扩增仪	PE公司
恒温培养箱	广东省医疗器械厂

#### (4) 培养基

初筛培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 氯化钠 0.3, 硫酸镁 0.3, 硫酸铵 0.5, 氯化钾 0.3, 琼脂 20, 亚磷酸 0.82, 硫酸亚铁 0.152, 氯化钙 0.111, 琼脂 15, pH 7.0。

种子培养基(g/L): 蛋白胨 2.0, 酵母粉 1.0, 硫酸铵 6.0, 七水硫酸镁 0.5, 磷酸氢二钾 10.0, 氯化钠 0.5, pH 7.2。

复筛培养基(g/L): LB 液体培养基(蛋白胨 10、酵母浸提物 5、氯化钠 5)。

斜面培养基(g/L): LB 固体培养基(蛋白胨 10、酵母浸提物 5、氯化钠 5, 琼脂 15)。

### 2.2.2 实验方法

#### (1) 斜面培养

将筛选到的菌株接入斜面培养基, 30℃恒温培养 2 d。

#### (2) 摇瓶培养

250 mL 三角瓶装液量 50 mL, 接入培养 8 h 的种子菌悬液 4%(v/v), 旋转式摇床转速 180 r/min, 30℃培养 24 h。

#### (3) 初筛

将采集到的土样悬浮于 5 mL 水中, 用 8 层纱布过滤除去较大的杂质颗粒, 取 2 mL 于种子培养基中富集, 旋转式摇床 180 r/min, 30℃培养 12 h。取 1 mL 涂布于初筛培养基上, 30℃下培养 2 d。用铂丝接种环挑起单菌落, 在 LB 固体培养基上划线分离。将 24 h 培养的斜面菌种, 以铂丝接种环取一小环涂布于已滴有 3%过氧化氢的载玻片上, 如无气泡产生, 则接触酶反应实验为阴性, 有气泡产生的为阳性, 斜面保藏。

#### (4) 复筛

将待试菌种接种于 20 mL 种子培养基, 180 r/min 摇床 30℃培养 12 h, 按 4%(v/v) 接种量到 50 mL 复筛培养基, 培养 24 h。测定相应的 CAT 酶活, 并进行菌株间比较。

#### (5) 形态学和部分生理生化鉴定

将筛选到的菌株划线于 LB 固体培养基, 30℃培养 1 d-2 d, 观察单菌落形态。并在电子显微镜下观察菌株的细胞形态(由江南大学电子显微镜实验室完成)。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版)<sup>[43]</sup>和《工业微生物实验技术手册》<sup>[44]</sup>等文献中的方法进行生理生化实验鉴定。

#### (6) 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析

##### A 引物

本实验采用细菌 16S rDNA 通用引物分别进行 PCR 扩增, 其序列如下:

Primer A: 5'-CAGCAGCCGCGTAATAC-3'

Primer B: 5'-CGATTACTAG CGATTCC-3'

Primer 01: 5'-GCTCAGATTGAACGCTG-3'

Primer 02: 5'-CCGCAGGTTCCCCTACG-3'

##### B 细菌总 DNA 的提取

参见文献<sup>[45]</sup>, 取发酵液 1.5 mL, 2000 × g 条件下离心 2 min, 弃上清, 用 100 μL ddH<sub>2</sub>O

悬浮菌体，吹吸混匀，然后置于沸水浴中煮 10 min。-20℃保存，备用。

### C PCR 反应体系

于 PCR 管中按顺序依次加入 ddH<sub>2</sub>O 34.5 μL, 10 × PCR Buffer 5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2μL, dNTPs 4μL, Primer A (Primer 01) 1 μL, Primer B (Primer 02) 1 μL, 模板 2μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL。

### D PCR 反应条件

95℃预变性 4 min, 94℃变性 1 min, 52℃退火 1 min, 72℃延伸复性 90 s, 35 个循环后于 72℃继续延伸 6 min, 12℃保温 10 min。

### E PCR 产物测序

PCR 扩增产物用 0.8 %琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果。用胶回收试剂盒纯化 PCR 扩增产物, 电泳验证。PCR 产物测序由上海申速生物技术有限公司完成。

### F 系统发育分析

将测序结果在 NCBI 中进行 Blast 后交送 GenBank 数据库, 与数据库中已有序列进行系统发育分析。

#### (7) 粗酶液的制备

取一定体积发酵液在 10800 × g 条件下冷冻离心 15 min, 菌泥以 50 mmol/L 的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液(pH 7.0)洗涤两次, 以适量相同的缓冲液重悬后置冰浴预冷。超声波破碎(工作 1 s, 停 3 s, 总工作时间 10 min, 功率 300 W), 在 27000 × g 条件下冷冻离心 20 min, 上清液即为胞内 CAT 粗酶液。

#### (8) 过氧化氢酶活力测定方法<sup>[37,46]</sup>

4 mL 反应体系中包括粗酶液 0.1 mL, 0.1 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液(pH 7.0)2 mL, 0.12 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 0.5 mL(新鲜配制), 去离子水 1.4 mL。以去离子水替代 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液作为空白对照, 30℃保温, 加入酶液反应即开始。以 240 nm 下体系吸光度的下降来衡量过氧化氢的酶促降解速度。每隔 10 s 读取一次吸光度值, 一般持续进行 1 min 后停止测定, 以反应的线性范围计算酶活。酶活力定义为 1 min 分解 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所需酶量为 1 个酶活力单位(U)。酶活按照 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 240 nm 下的摩尔消光系数 39.4 mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> 进行计算。

## 2.3 结果与分析

### 2.3.1 菌的筛选

通过特殊的无机初筛培养基, 从采集的 20 个土样中, 共分离获得 6 株能在初筛培养基上生长的形态各异的菌株。经接触酶反应实验发现, 其中 5 株菌株为过氧化氢酶阳性, 但产生气泡的速度和数量有差异。所以 5 株菌株都作为复筛的对象。通过重复实验得到验证, 该培养基能够高效地筛选沙雷氏菌。

对上述 5 株初筛菌株产 CAT 能力进行复筛, 选出产酶最高的菌株。如图 2-1 所示,

将2号菌株与4号菌株进行比较,2号菌株酶活优势显著( $P<0.05$ ),达到 $438\pm 37.28$  U/mL。所以,将2号菌株作为进一步研究的目标菌株。

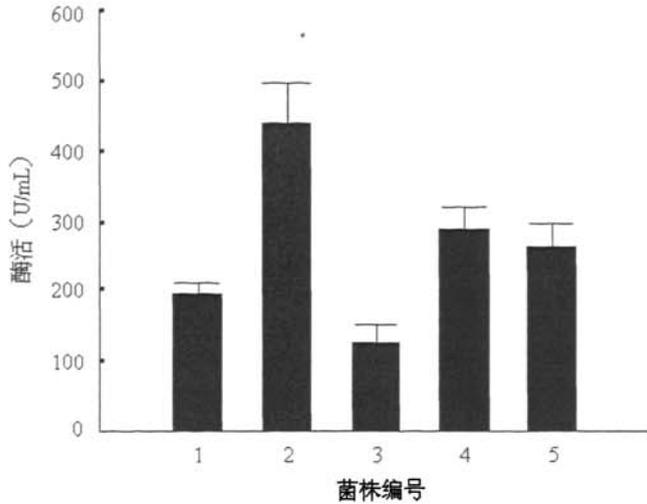


图 2-1 不同菌株过氧化氢酶酶活比较

Fig.2-1 Comparison of catalase between different strains

### 2.3.2 菌株的形态学和生理生化特征

样品经初筛和复筛得到的相对高产过氧化氢酶的菌株 2(编号为 SYBC-01), 在 LB 固体培养基上  $30^{\circ}\text{C}$  培养 1 d 后出现红色菌落, 2 d 后菌落颜色加深, 呈深红色, 菌落直径达约 4 mm, 不透明, 圆形, 中间稍隆起, 粘稠, 边缘整齐光滑, 如图 2-2 所示。培养的细胞经扫描电镜观察, 细胞呈短杆状, 长约  $0.9\ \mu\text{m}$ , 直径约  $0.5\ \mu\text{m}$ , 端圆, 如图 2-3 所示。其菌落形态和细胞形态符合沙雷氏菌属的特征。



图 2-2 SYBC-01 菌株的菌落形态

Fig. 2-2 Micrographs of the strain SYBC-01



图 2-3 SYBC-01 菌株的细胞形态(10000×)

Fig. 2-3 Electronic microscope graph of the strain SYBC-01

生理生化特征鉴定见表 2-1, 由表可知, 该菌为革兰氏阴性, 接触酶反应阳性, V-P 反应阳性, M-R 实验为阴性, 能发酵多种糖类产酸, 其大部分生理生化特性与粘质沙

雷氏菌(*Serratia marcescens*)最为接近, 只有利用木糖产酸情况明显不同, 而葡萄糖产酸时, 颜色呈棕色, 与粘质沙雷氏菌略有不同。

表 2-1 菌株 SYBC-01 的部分生理生化特性及其与相近菌种的比较

Table 2-1 Comparison of physiological characteristic of strain SYBC-01 with standard strains

特性	SYBC-01	粘质沙雷氏菌 <i>S. marcescens</i>	液化沙雷氏菌 <i>S. liquefaciens</i>	格式沙雷氏菌 <i>S. grimesii</i>	深红沙雷氏菌 <i>S. rubida</i>
接触酶反应	+	+	+	+	+
V-P 试验	+	+	+	d	+
M-R 试验	-	-	+	+	-
吲哚实验	-	-	-	-	-
革兰氏染色	-	-	-	-	-
硫化氢	-	-	-	-	-
纤维二糖产酸	-	-	-	-	+
肌醇产酸	+	+	d	-	-
甘油产酸	+	+	+	-	-
葡萄糖产酸	d	+	+	+	+
乳糖产酸	-	-	-	-	+
棉子糖产酸	-	-	+	+	+
木糖产酸	+	-	+	+	+
海藻糖产酸	+	+	+	+	+
乙酸钠产酸	d	d	d	-	+

注: +: 阳性; -: 阴性; d: 棕色(弱阳性)。

### 2.3.3 产胞内过氧化氢酶菌株基于 16S rDNA 序列的系统发育分析

提取细胞总 DNA, 以 Primer A 和 Primer B 为引物扩增菌株 SYBC-01 的 16S rDNA 基因部分片段, 测序结果显示, 引物间距离为 835 个碱基, 序列与 *S. marcescens* 的 16S rDNA 基因的同源性超过 99%。根据 *S. marcescens* 的 16S rDNA 基因序列设计引物 Primer 01 和 Primer 02, PCR 扩增获得 1505 个碱基的基本完整的序列, 利用 Blast 软件将该序列(已提交 GenBank, 国际基因库接受号为 EF585319)与 GenBank 中收集的所有细菌基因进行比对, 结果显示 SYBC-01 的 16S rDNA 基因序列, 与 *S. marcescens* DSM 30121 的 16S rDNA 基因序列相似性最高, 为 99.9%, 结合生理生化等特性, 确定 SYBC-01 属于 *S. marcescens*, 因此将其命名为 *S. marcescens* SYBC-01。

## 2.4 讨论

粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*)是革兰氏阴性兼性厌氧杆菌, 属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)沙雷氏菌属(*Serratia*), 能产生红色非扩散性色素——灵菌红素(Prodigiosins)。灵菌红素族是一种天然红色素家族的总称, 可以由多种放线菌和细菌产生。这一族色素通常都具有甲氧基吡咯的骨架结构, 具有一定的免疫抑制性质。近年来, 研究人员把注意力集中在对沙雷氏菌所产灵菌红素应用于临床的研究。灵菌红素(Prodigiosin)是一种很有潜力的抗肿瘤药物, 它对人结肠腺癌细胞及人胃癌细胞株的实

验均证实其对这些肿瘤细胞有诱导凋亡的作用。也有报道称, 灵菌红素在环保领域具有潜在的应用价值。从菌落形态可以看出, 该粘质沙雷氏菌能产红颜色色素, 因此推测该色素为灵菌红素。

目前, 不同来源 CAT 的研究仍然是学术界研究的热点, 而本实验中所选择的粘质沙雷氏菌作为研究对象在国内是首次, 国外虽有粘质沙雷氏菌的研究<sup>[41]</sup>, 但报道不多, 其 CAT 的  $K_m$  值为 228 mmol/L, 显示它对过氧化氢的亲合力较低。经过初步研究发现, 通过无机培养基筛选得到的菌株 *S. marcescens* SYBC-01 产过氧化氢酶的能力达到  $438 \pm 37.28$  U/mL, 下一章对其发酵条件做进一步研究。

## 第三章 *S. marcescens* SYBC-01 摇瓶发酵条件的优化

### 3.1 前言

为了进一步提高菌株 *S. marcescens* SYBC-01 产 CAT 的能力, 对其发酵条件优化是很好的方法。通过对工艺条件等各个方面的探索, 不仅能较大幅度的提高产酶性状, 而且也能显示出菌株各方面的特性, 这也为深入研究打下基础。

一方面, 必须对培养基中的各种营养成分进行优化, 在最佳的工艺条件下进行发酵, 为最终的工业化生产奠定基础。另一方面, 运用一些实验设计(如正交实验设计、因次分析设计、Doehlert 设计等), 可以减少工作量并且使实验结果具有更高的可信度和实际应用价值。发酵的环境条件也是不可忽略的重要因素, 影响细胞生长以及产生 CAT 的因素主要有种龄、温度、pH、溶解氧、接种量和发酵时间等。种子的生长情况直接影响到微生物细胞的生长情况和代谢产物的形成速率; 温度直接影响着代谢中各种酶的活性和生化反应速率; pH 决定营养物的解离状态, 制约着微生物细胞对营养物质的吸收利用速率; 溶氧的大小控制着细胞对氧的需求; 而接种量的大小则影响迟滞期的长短以及细胞倍增繁殖的速度; 发酵过程则在一定程度上反映了代谢产物的流向和细胞生长情况。因此, 在营养条件确定的基础上, 对环境因素的优化也必不可少。

目前, 国内外已有较多关于 CAT 产生菌发酵条件方面的研究报道。王凡强等<sup>[32]</sup>对热稳定性过氧化氢酶工程菌株发酵条件做了研究, 考察了诱导剂, 诱导时间, 诱导温度, 起始 pH 和装液量对 CAT 酶活的影响。洪海军等<sup>[34]</sup>考察了碳、氮、无机盐等营养元素和浓度以及初始 pH、温度、装液量、接种量和培养时间对溶壁微球菌产 CAT 的影响。赵志军等<sup>[35]</sup>考察了碳源和氮源对菌株产碱性 CAT 的影响。段绪果等<sup>[47]</sup>对耐热 CAT 基因工程菌在 LB 培养基和半合成培养基中的发酵条件进行了优化。

本章主要对 CAT 产生菌 *S. marcescens* SYBC-01 的摇瓶发酵培养基进行优化, 并对影响 *S. marcescens* SYBC-01 菌株发酵的条件进行初步研究, 在改进的摇瓶发酵条件下使 CAT 酶活得到了一定提高。

### 3.2 材料和方法

#### 3.2.1 实验材料

- (1) 菌株: *S. marcescens* SYBC-01
- (2) 化学试剂和仪器同 2.2.1(2), 2.2.1(3)。
- (3) 种子培养基(g/L)

蛋白胨 2.0, 酵母粉 1.0, 硫酸铵 6.0, 七水硫酸镁 0.5, 磷酸氢二钾 10.0, 氯化钠 0.5, pH 7.2。

- (4) 基础发酵培养基(g/L)

甘油 10.0, 蛋白胨 10.0<sup>[48]</sup>。在考察不同的碳源和氮源对发酵产酶的影响时, 分别以其他碳源和氮源代替上述培养基中的甘油和蛋白胨。

### 3.2.2 实验方法

#### (1) 种子培养

将保藏在斜面上的菌种接入种子培养基中, 250 mL 三角瓶装 50 mL 培养基, 回转式摇床转速 180 r/min, 30℃, 培养 12 h。

#### (2) 摇瓶培养

种子以 4 % (v/v) 的接种量接入发酵培养基中, 回转式摇床转速 180 r/min, 30℃, 培养 24 h。

#### (3) CAT 的提取

同 2.2.2(7)。

#### (4) 菌体浓度的测定

菌体浓度的测定可以使用分光光度计测 600 nm 下的吸光度值 OD<sub>600</sub>。

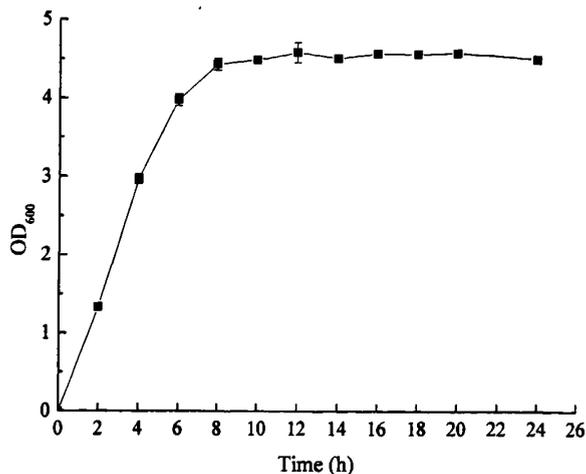
#### (5) 生物量的测定

在 50 mL 离心管中加入 20 mL 发酵液, 在 10800 × g 条件下 4℃ 冷冻离心 10 min, 取沉淀并使用去离子水洗涤两次, 在 105℃ 电热恒温干燥箱中干燥 3 h, 取出置入干燥器中冷却至室温, 称重; 每隔 15 min, 同上操作直至恒重。洗去菌体后离心管也干燥至恒重, 称重。

## 3.3 结果与分析

### 3.3.1 *S. marcescens* SYBC-01 种子生长曲线

种子培养基为菌体生长和繁殖提供营养, 合适的培养基可使菌体长得饱满, 成为活力强的种子。种子液质量的优劣对于发酵生产起着关键性的作用, 代谢旺盛、数量足够的种子, 将使发酵生产周期缩短、设备利用率提高, 而其中的种子培养时间(种龄)可以直接反映种子液的好坏, 因此首先确定适宜的种龄。种龄以菌体处于生命力极为旺盛的对数生长期的中后期, 且培养液中的菌体量还未到达最高峰时较为合适, 因此就需要对种子的生长过程进行考察。由图 3-1 可以看出, 菌体从 2 h 进入对数生长期, 菌浓呈上升趋势, 12 h 左右细胞基本进入稳定期, 此时细胞生长量达到最大并趋于稳定。因此选用培养 8 h 左右的菌体作为接入发酵培养基的种子。在整个培养过程中, pH 一直呈上升趋势, 24 h 后趋于稳定。

图 3-1 *S. marcescens* SYBC-01 种子生长曲线Fig. 3-1 Time course of *S. marcescens* SYBC-01 growth in seed culture

### 3.3.2 发酵培养基的确定

#### (1) 碳源对 *S. marcescens* SYBC-01 菌体生长和产酶的影响

碳源是菌体自身骨架合成过程中重要的营养物质和能源物质,它提供菌体生长所需的碳骨架和维持菌体生命活动所需的代谢能,因此是影响菌体生长和代谢产物合成的关键因素(图 3-2)。

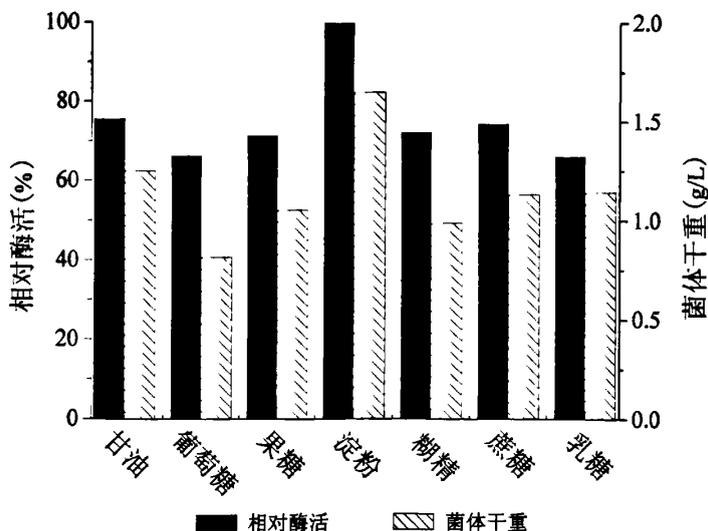


图 3-2 碳源种类对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3-2 Effects of carbon sources on cell growth and CAT activity

菌体细胞在以蛋白胨为氮源,唯一碳源分别为总碳摩尔数相同(以 10 g/L 的甘油为

基准)的甘油、葡萄糖、果糖、可溶性淀粉、糊精、蔗糖和乳糖的培养基中生长,相同的发酵条件下,其生长和产酶能力不一。当以可溶性淀粉为碳源时,菌体不仅生长良好,而且产CAT的酶活力最高。在此基础上,研究了各种浓度的可溶性淀粉溶液对菌体生长和产酶的影响(图3-3)。

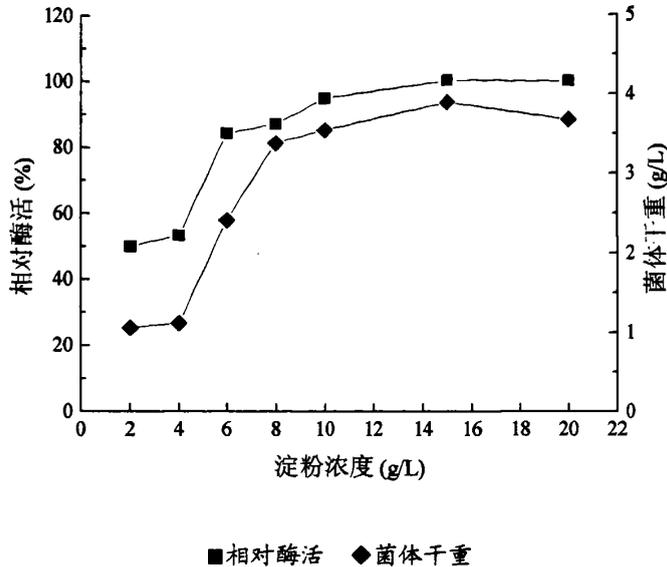


图 3-3 淀粉浓度对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3-3 Effects of starch concentrations on cell growth and CAT activity

当培养基中淀粉浓度不断增加时,菌体干重和产酶能力也随之增加,当淀粉浓度为 15 g/L 时,菌体生长达到最佳,而且产酶能力也达到最高。但是,当淀粉浓度继续增加时,菌体干重没有再次呈现上升趋势,反而随之下降,而酶活也不再提高。由此可知,培养基中可溶性淀粉浓度对产酶及生物量影响均很大,当可溶性淀粉浓度从 2 g/L 提高到 15 g/L,酶活提高了约 1 倍, pH 由 8.71 逐步升高到 8.75。但当添加量大于 15 g/L 时,酶活和生物量有所下降, pH 下降为 8.68,可能是产酸的原因,抑制了菌体生长和产酶。因此,确定可溶性淀粉的最佳浓度为 15 g/L。

## (2) 氮源对 *S. marcescens* SYBC-01 菌体生长和产酶的影响

氮源是菌体合成自身蛋白和遗传物质的主要来源,也是代谢产物中氮元素的来源之一,氮的来源可以分为无机氮和有机氮。菌株在以可溶性淀粉(浓度为 15 g/L)为唯一碳源,氮源分别为总氮摩尔数相同的有机氮源和无机氮源(以 10 g/L 蛋白胨为基准)的培养基中的菌体生长和产酶能力各异(图 3-4)。该菌对有机氮源的利用情况要远远好于无机氮源,这可能是因为有机氮源中含有丰富的营养因子,有利于细胞生长,也可能是因为有机氮源中的氮主要是蛋白质的降解产物,都可以被菌体直接吸收利用,称为速效性氮源,速效氮源通常有利于菌体生长。因此在含有有机氮源的培养基中,菌体生长普遍较好,酶活较无机氮源高。其中酵母膏是菌体生长和产酶最适宜的氮源,菌体干重和相对酶活均为最高。进一步研究氮源酵母膏浓度对产酶的影响。

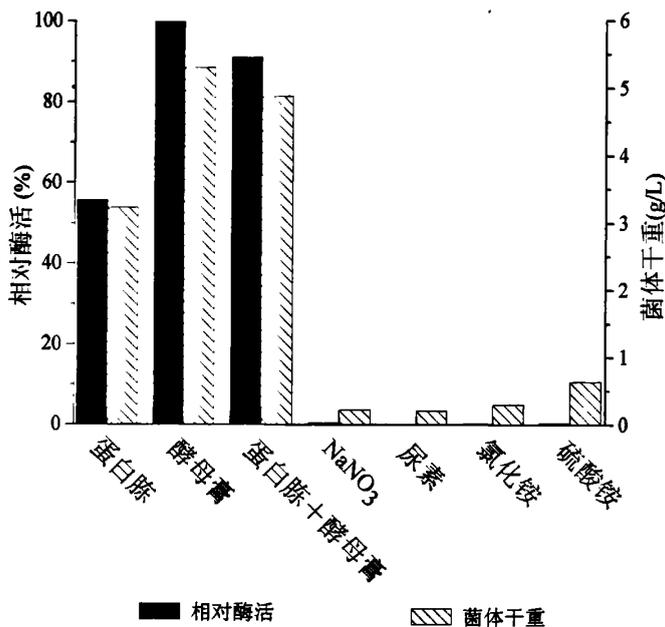


图 3-4 氮源种类对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3-4 Effects of nitrogen sources on cell growth and CAT activity

从图 3-5 中可以看出，菌体干重随着酵母膏浓度的增加而不断增加，但酶活在酵母膏浓度为 15 g/L 时达到最大，即使酵母膏浓度再增加，酶活也不再增加。因此，确定酵母膏的最佳添加量为 15 g/L。

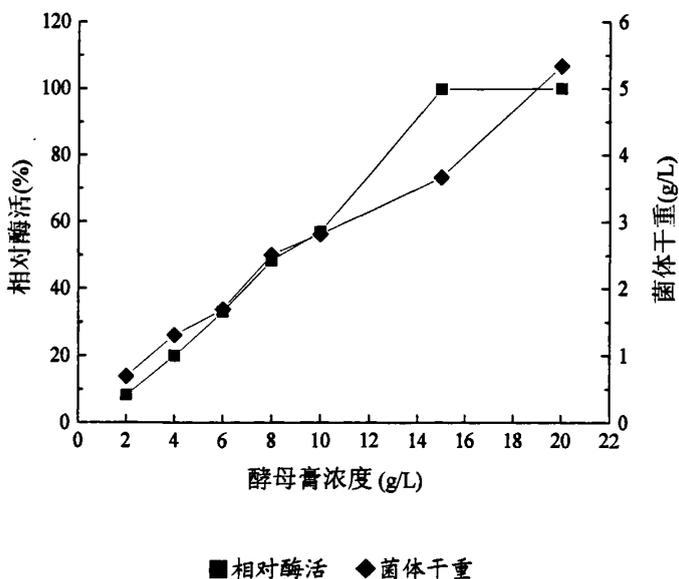


图 3-5 酵母膏浓度对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3-5 Effects of yeast extract concentrations on cell growth and CAT activity

(3) 磷酸根离子对 *S. marcescens* SYBC-01 菌体生长和产酶的影响

磷是核酸和蛋白质的必要成分，也是重要的能量物质·ATP 的成分，在代谢调节方面，磷也起着重要作用，而且磷酸盐还能起到缓冲发酵过程 pH 的作用。如图 3-6 所示，菌株 *S. marcescens* SYBC-01 在不同浓度的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的培养基中，菌体生长和产酶情况各不相同。总之，磷酸盐的浓度对菌体生长和产酶也有一定的促进作用，在含有 1.0 g/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的培养基中，菌株 *S. marcescens* SYBC-01 的产酶能力达到最大值，菌体干重也在  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为 1.0 g/L 时达到最大值。

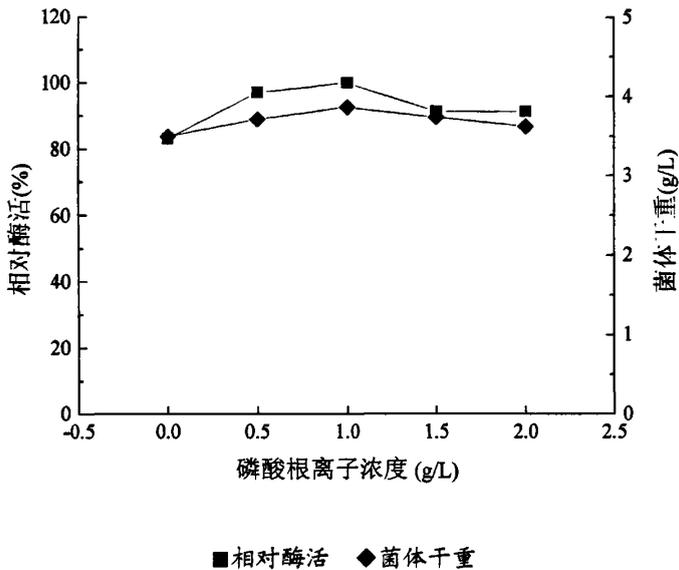


图 3-6 浓度磷酸根离子对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3-6 Effects of concentrations of  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  on cell growth and CAT activity

(4) 初始 pH 对 *S. marcescens* SYBC-01 菌体生长和产酶的影响

虽然在各种 pH 的环境下都可以发现微生物，但它们细胞内的 pH 十分接近中性。在酸性环境里，微生物细胞可以通过阻止氢离子的进入，或者一旦氢离子进入后立即进行排除，来保持 pH 值接近中性，因为细胞内有许多对酸碱不稳定的成分。培养基中的 pH 值与微生物的生命活动有着密切的联系。它会影响到细胞膜所带的电荷，从而影响细胞对营养物质的吸收。此外，还可以通过改变培养基中有机化合物的离子化程度，而对细胞施加间接的影响，因为多数非离子状态的化合物比起离子状态的化合物更易渗入细胞，碱性物质刚好与有机酸相反，在碱性条件不能离子化，于是较易进入细胞。本实验考察了 pH 在 3-10 之间 8 个不同 pH 值对菌体生长和产酶的影响(图 3-7)。在实验的 pH 范围内，除了 pH 3 以外，其他 pH 条件下，细胞生长都较好，主要是因为培养基中的磷酸盐对 pH 具有缓冲作用。菌株干重和产酶能力均在 pH 为 8 的时候达到最大值。而当 pH 大于 8.0 时，菌体干重和酶活开始下降。则起始最佳 pH 为 8。

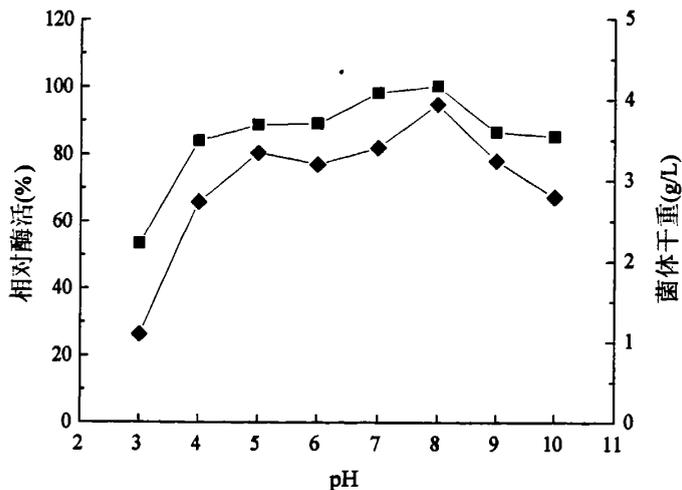


图 3-7 初始 pH 值对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3-7 Effects of initial pH value on cell growth and CAT activity

### 3.3.3 发酵培养基的优化实验

为了对产酶条件进行进一步的优化,在单因素试验的基础上,采用  $L_9(3^4)$  正交试验因素水平表安排正交实验。根据实验设计表 3-1 进行 9 组实验,正交试验结果方差分析见表 3-2。由实验结果可知:级差分析表明,各因素对酶活的影响程度为  $B>D>A>C$ ,得出最佳发酵培养基组分为 A2B3C1D2,即可溶性淀粉 12.5 g/L,酵母膏 15 g/L,磷酸二氢钾 0.5 g/L, pH 8.0。

表 3-1 正交试验设计表

Table 3-1 Arrangement of orthogonal design

因素/水平	1	2	3
A: 可溶性淀粉(g/L)	10	12.5	15
B: 酵母膏(g/L)	10	12.5	15
C: $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)	0.5	1.0	1.5
D: 初始 pH	7.5	8.0	8.5

表 3-2 正交实验结果

Table 3-2 Results of orthogonal experiment

实验号/因素	A	B	C	D	酶活 (U/mL)
1	1	1	1	1	578.68
2	1	2	2	2	746.19
3	1	3	3	3	791.88
4	2	1	2	3	548.22
5	2	1	2	3	761.42
6	2	3	1	2	984.77
7	3	1	3	2	548.22
8	3	2	1	3	638.59
9	3	3	2	1	903.56
K1	705.58	558.37	734.01	747.89	
K2	764.80	715.40	732.66	759.73	
K3	696.79	893.40	700.51	659.56	
k1	235.19	186.12	244.67	249.30	
k2	254.93	238.47	244.22	253.24	
k3	232.26	297.80	233.50	219.85	
R	22.67	111.68	11.17	29.45	

### 3.3.4 发酵培养条件的确定

#### (1) 装液量对 *S. marcescens* SYBC-01 菌体生长和产酶的影响

溶氧是影响微生物发酵的重要因素之一。在摇瓶发酵培养过程中，可以通过转速和装液量来考察溶氧对发酵的影响。粘质沙雷氏菌是兼性厌氧细菌，从图 3-8 可以看出，60 mL/250 mL 装液量时，*S. marcescens* SYBC-01 产 CAT 的活性最高，菌体生长最好，增加或减少装液量都会使产酶量降低。

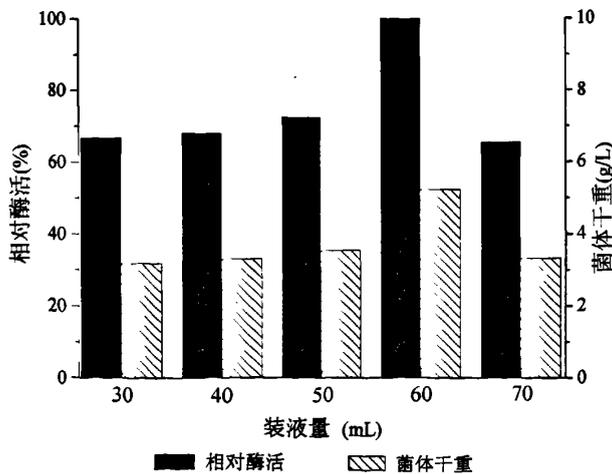


图 3-8 装液量对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3-8 Effect of medial volume on cell growth and CAT activity

(2) 接种量对 *S. marcescens* SYBC-01 菌体生长和产酶的影响

接种量对 *S. marcescens* SYBC-01 产 CAT 的影响如图 3-9 所示, 可以看出接种量为 10% (v/v) 时, 菌体生长最好, 产 CAT 活性最高。

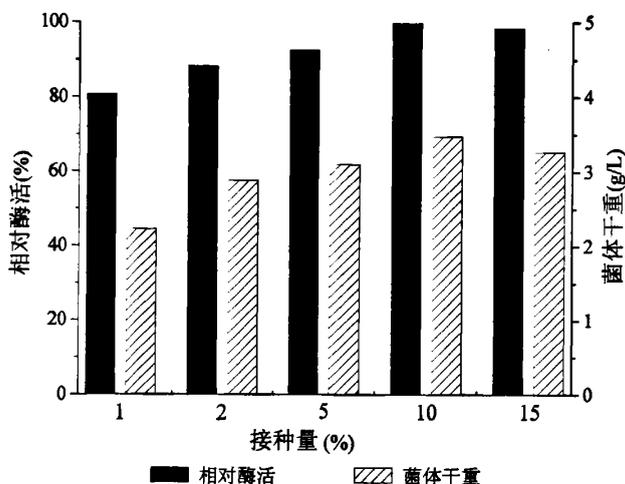


图 3-9 接种量对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3-9 Effects of inoculum size on cell growth and CAT activity

(3) 发酵温度对 *S. marcescens* SYBC-01 菌体生长和产酶的影响

温度是影响微生物代谢和生长的重要因素。对同一微生物来说, 其不同的生理生化过程有着不同的最适温度。因此, 需要考察该菌株达到最佳的生产能力时的培养温度。在不同的温度下 (25°C, 28°C, 30°C, 35°C, 37°C) 分别进行发酵培养 (图 3-10), 发现在 28°C 时产 CAT 活性相对最高, 因此选择 28°C 为最佳培养温度。

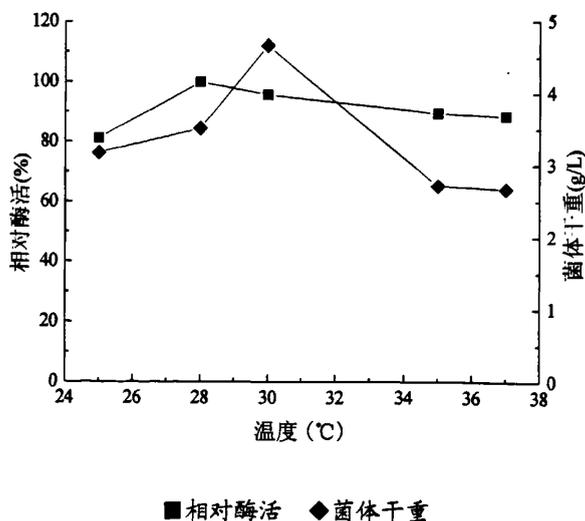
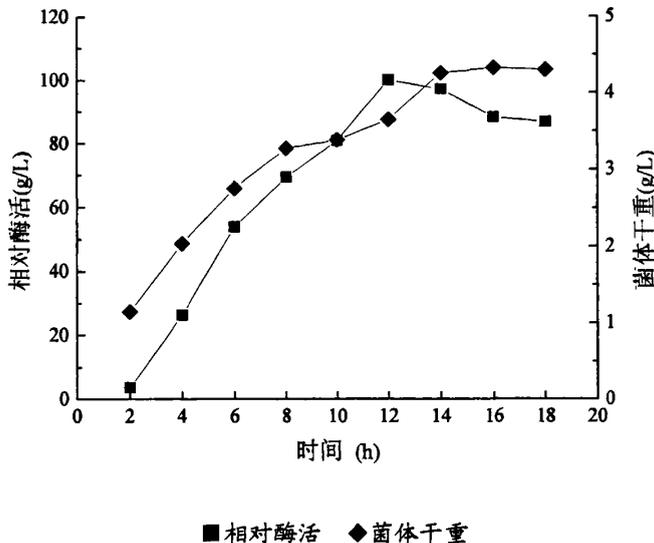


图 3-10 发酵温度对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3-10 Effects of temperature on cell growth and CAT activity

3.3.5 优化发酵条件下 *S. marcescens* SYBC-01 产 CAT 摇瓶发酵曲线

在优化了营养条件和环境条件的情况下, 考察菌株 *S. marcescens* SYBC-01 进行摇瓶发酵的过程, 定时取样测定酶活。由图 3-11 可见, 在培养时间为 0 h-12 h 内, CAT 酶活随着菌体量的增加酶活升高直到最大, 12 h 后产酶能力有所下降, 而细胞生长在 16 h 达到最大值, 之后随时间缓慢下降, 综合选取 12 h 为产酶的最佳发酵时间。

图 3-11 *S. marcescens* SYBC-01 的摇瓶发酵进程曲线Fig. 3-11 Time course of CAT activity of *S. marcescens* SYBC-01 in 250 shake flask3.3.6 优化前后 *S. marcescens* SYBC-01 菌体生长和产酶情况的比较

按照优化前后不同的培养基和培养条件分别进行菌体摇瓶培养, 分别测定其菌体干重和酶活, 结果见表 3-3。优化后菌株 *S. marcescens* SYBC-01 菌体干重提高了 0.98 倍, 酶活提高了 1.30 倍。

表 3-3 摇瓶实验结果

Table 3-3 Results of flask experiment

指标	优化前	优化后	提高倍数
菌体干重 (g/L)	1.925	3.805	0.98
酶活 (U/mL)	480.20	1105.58	1.30

## 3.4 讨论

通过对菌株 *S. marcescens* SYBC-01 发酵培养基的优化, 得出其最佳发酵培养基成为可溶性淀粉 12.5 g/L, 酵母膏 15 g/L, 磷酸二氢钾 0.5 g/L, 初始 pH 为 8.0。从本实验选取的单因素正交实验可以看出, 酵母膏是影响产酶的最大因素, 其次依次分别为初始 pH, 可溶性淀粉和磷酸二氢钾。酶活从 480.20 U/mL 提高到 984.77 U/mL, 提高了一

倍。通过对菌株 *S. marcescens* SYBC-01 培养条件的优化, 得出其最佳培养条件: 种龄为 8 h, 装液量为 250 mL 的三角瓶中装 60 mL 培养基, 接种量为 10%(v/v), 摇瓶发酵时间为 12 h, 培养温度为 28 °C。发酵培养基和培养条件优化后, 菌株 *S. marcescens* SYBC-01 产过氧化氢酶的酶活达到 1105.58 U/mL, 比优化前提高了 1.30 倍。因此, 对于菌株 *S. marcescens* SYBC-01 发酵产过氧化氢酶而言, 培养基对产酶的影响要大与培养条件对产酶的影响。将该菌产 CAT 酶活水平与表 1-1 比较, 酶活水平有一定的优势。

该菌株较其他报道的细菌的一个明显特点是发酵产酶周期短, 只需要 12 h 便达到产酶最高峰, 与真菌的发酵周期相比就更有优势了。赵志军等<sup>[35]</sup>报道的枯草芽孢杆菌产胞内过氧化氢酶的发酵周期为 35 h。方芳等<sup>[49]</sup>报道的嗜热子囊菌产 CAT 的发酵周期为 84 h。

本研究中, 菌株 *S. marcescens* SYBC-01 产 CAT 与菌体生物量和生长阶段密切相关, 产酶水平随菌体生物量的增加而增加。胞内酶活的提取比胞外酶活工作量大, 本研究曾试图通过底物诱导产胞外酶活, 效果并不理想。本实验中是利用三次重复实验得出的数据平均值进行作图比较, 但为证实实验的可重复性和试验数据的可靠性, 进一步利用标准差分析是一种更精确的分析方法。



0.5, pH 7.2。

(4) 发酵培养基(g/L)

可溶性淀粉 12.5, 酵母膏 15, 磷酸二氢钾 0.5, pH 8.0。

(5) 凝胶电泳工作液

A 液(丙稀酰胺储液): 30 %丙稀酰胺, 0.8 %甲叉双丙稀酰胺。

B 液(4×分离胶缓冲液): 1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)

C 液(4×浓缩胶缓冲液): 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)

(6) 非变性凝胶电泳样品缓冲液(10 mL)

1 mol/L Tris-HCl buffer (pH 6.8) 3.1 mL, 50 %的甘油 5.0mL, 1 %的溴酚蓝 0.5mL, 去离子水 1.4 mL。

(7) 变性凝胶电泳样品缓冲液(10 mL)

1 mol/L Tris-HCl(pH 6.8) 0.6 mL, 50 %的甘油 5.0mL, 10 %的 SDS 2.0 mL,  $\alpha$ -巯基乙醇 0.5 mL, 1 %的溴酚蓝 1.0 mL, 去离子水 0.9 mL。

(8) 非变性电泳缓冲液(1 L)

3.0 g/L Tris, 14.4 g/L Gly, pH 8.8。

(9) 变性凝胶电泳缓冲液(1 L)

3.0 g/L Tris, 14.4 g/L Gly, 1.0 g/L SDS, pH 8.3。

(10) 活性染色试剂

0.06 %的  $H_2O_2$  溶液; 三氯化铁/铁氰化钾显色剂(2 %的三氯化铁:2 %的铁氰化钾=1:7(v/v))

(11) 蛋白染色试剂(1 L)

考马斯亮蓝-R250 1.0 g, 甲醇 50 mL, 乙酸 100 mL, 去离子水 450 mL。

(12) 蛋白脱色试剂(1 L)

甲醇 100 mL, 乙酸 100 mL, 蒸馏水 800 mL。

#### 4.2.2 实验方法

(1) 种子培养: 250 mL 的三角瓶装液量为 50 mL, 从平板接入一环菌, 旋转式摇床转速 180 r/min 摇瓶培养, 30℃培养 7 h。

(2) 发酵培养: 250 mL 的三角瓶装液量为 60 mL, 接入培养 8 h 的种子菌悬液, 接种量为 10 % (v/v), 旋转式摇床转速 180 r/min 摇瓶发酵, 28℃培养 12 h。

(3) CAT 粗酶液 I 的制备

粗酶液 I 的制备方法同 2.2.7。

(4) 蛋白质含量的测定

采用 Bradford 法测定样品中的蛋白质含量<sup>[55]</sup>。

(5) 非变性凝胶电泳

主要参照《蛋白质技术手册》。

A 7.5 %分离胶的制备(10 mL)

试剂	去离子水	A 液	B 液	过硫酸铵(10%)	TEMED
体积(mL)	5.0	2.5	2.5	0.05	0.01

## B 5%浓缩胶的制备(4 mL)

试剂	去离子水	A 液	C 液	过硫酸铵(10%)	TEMED
体积(mL)	2.3	0.67	1.0	0.03	0.005

电泳时, 进入分离胶电压为 80 V, 进入浓缩胶后电压为 120 V。

## (6) 变性凝胶电泳

## A 12%分离胶的制备(8 mL)

试剂	去离子水	A 液	B 液	过硫酸铵(10%)	SDS(10%)	TEMED
体积(mL)	2.8	3.2	2.0	0.08	0.04	0.005

## B 5%堆积胶的制备(5 mL)

试剂	去离子水	A 液	C 液	过硫酸铵(10%)	SDS(10%)	TEMED
体积(mL)	3.0	0.67	1.25	0.04	0.05	0.006

样品加入样品缓冲液后, 于沸水浴中煮沸 3 min; 电泳时, 电压保持 60 V, 至示踪分子迁移到凝胶底部时停止; 蛋白染色同 Native PAGE。

## (7) 过氧化氢酶活性染色

电泳后的凝胶先用冷蒸馏水漂洗 3 次, 用滤纸将其四周残余的水轻轻吸干, 倒入现配的浓度为 0.06% 的  $H_2O_2$  溶液浸泡, 轻轻摇动凝胶 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, 轻轻摇动凝胶 5 min, 出现亮黄色活性带及墨绿色背景; 弃去显色剂, 用蒸馏水漂洗 3 次后凝胶成像处理。

## (8) 蛋白质染色

缓慢振荡染色 30 min, 去除染液, 振荡脱色过夜, 凝胶成像处理。

## (9) 硫酸铵沉淀

量取一定量的粗酶液 I, 于冰浴中缓慢加入研细的硫酸铵, 边加边搅拌, 至 30% 饱和度(5 min-10 min 内加完), 继续搅拌 10 min, 4℃放置 1 h; 10800 × g 条件下冷冻离心 20 min, 收集上清; 同上再加到 60% 饱和度, 4℃放置 1 h, 10800 × g 条件下冷冻离心 20 min, 获取蛋白质沉淀, 以磷酸钾缓冲液充分溶解蛋白质沉淀, 17300 × g 条件下冷冻离心 20 min, 取上清, 即为粗酶液 II。留样测酶活和蛋白含量, 其余用于下一步实验。

## (10) 透析

层析上样的各样品需要和不同的起始缓冲液盐浓度一致, 所以在上样前, 根据需要进行透析处理。将粗酶液 II 装入处理好的透析袋中, 于 4℃相同缓冲液透析过夜, 中间更换缓冲液数次。

## (11) 浓缩

粗分离阶段得到的酶液体积较大, 浓度较低, 因此采用冷冻干燥处理。样品于 -20℃ 预冻后于 -70℃ 冷冻干燥, 72 h 后可以得到干燥的样品, 上样前用缓冲液复溶。细分离阶段得到的酶液体积较小, 因此用聚乙二醇浓缩。将样品装入透析袋, 在 4℃ 条件下透

析袋表面均匀撒上聚乙二醇-20000。

#### (12) 凝胶过滤层析

柱子情况: Sephacryl™ S-200(16 mm×60 cm), pH 7.0 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液预平衡(缓冲液需超滤), 柱体积为 120 mL, 分级范围为 5 KDa-250 KDa。

将样品置 12000 × g 条件下离心 10 min, 0.45 μm 孔径膜过滤后上样, 上样量为 2 mL, pH 7.0 0.5 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液洗脱, 流速为 1 mL/min, 计时收集(1 min/管); 测定每管酶活, 将有酶活部分合并, 测体积, 留样测酶活和蛋白含量, PEG-20000 浓缩处理。

柱子用 20 %乙醇清洗并保存。

#### (13) 离子交换层析

柱子情况: Mono Q(10 mm×100 mm), pH 7.0 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液预平衡(缓冲液需超滤), 柱体积为 1.7 mL。

将浓缩样品 12000 × g 条件下离心 10 min, 0.45 μm 孔径膜过滤后上样, 上样量为 2 mL, 用缓冲液洗柱以除去未结合的杂蛋白; 0-0.7 mol/L NaCl 梯度的 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液(pH 7.0)线性洗脱, 计时收集(1 min/管); 测定每管酶活, 将有酶活部分合并, 测体积, 留样测酶活和蛋白含量。

柱子以 2 mol/L 的 NaCl 清洗, 然后用 20 %乙醇清洗并保存。

### 4.3 结果与分析

#### 4.3.1 酶蛋白的硫酸铵沉淀

沉淀法是生化制备中最常用的一种方法, 通过沉淀可以使目的物浓缩, 并初步除去一些杂质<sup>[56]</sup>。当高浓度盐存在时, 蛋白质的表面电荷和水化膜均遭到破坏, 蛋白质往往凝聚并析出沉淀。不同的蛋白质在不同浓度的盐中形成沉淀。因此, 分级盐析常用于蛋白质的分离纯化。选择硫酸铵是因为它具有一些优良性质, 如盐析的有效性、pH 范围广、溶解度高、溶液散热少和经济使用。

以不同饱和度的硫酸铵沉淀粗酶液 I, 通过比较沉淀酶的酶活, 选择最佳硫酸铵饱和度范围。图 4-1 为不同硫酸铵饱和度沉淀粗酶液所得结果, 可以看出酶活主要集中在 30 %-40 %, 40 %-50 %和 50 %-60 %的硫酸铵饱和度的沉淀中, 因此硫酸铵沉淀方法为饱和度 30 %除杂, 收集 40 %-60 %硫酸铵饱和度的沉淀, 溶解于少量 pH 7.0 的 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液中, 即为粗酶液 II。

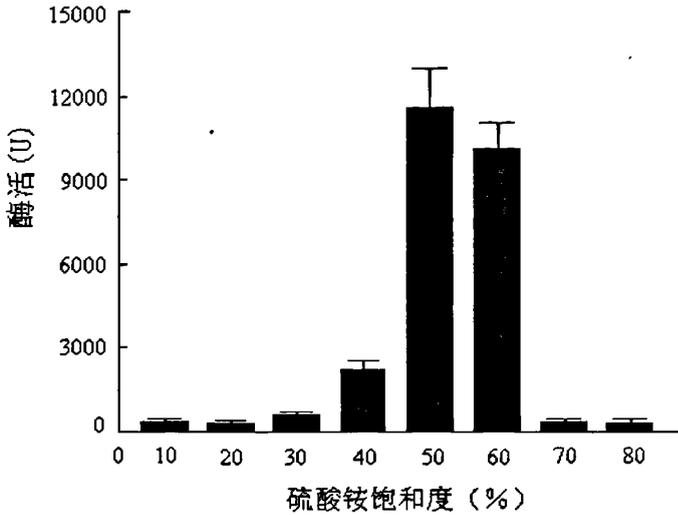


图 4-1 硫酸铵分级沉淀

Fig. 4-1 Ammonium sulphate fractional precipitation

### 4.3.2 酶蛋白的凝胶过滤层析

据文献报道, CAT 的分子量大约在  $3.5 \times 10^4$  Da- $2.7 \times 10^5$  Da 之间<sup>[36]</sup>, 由预实验发现 CAT 酶活峰出现的较早, 因此首先选择了分级范围为  $5 \times 10^3$  Da - $2.5 \times 10^5$  Da 的 Sephacryl<sup>™</sup> S-200。将经透析, 冷冻干燥和复溶处理的粗酶液 II 用于上柱。经过 Sephacryl<sup>™</sup> S-200 凝胶过滤, 洗脱结果如图 4-2 所示。

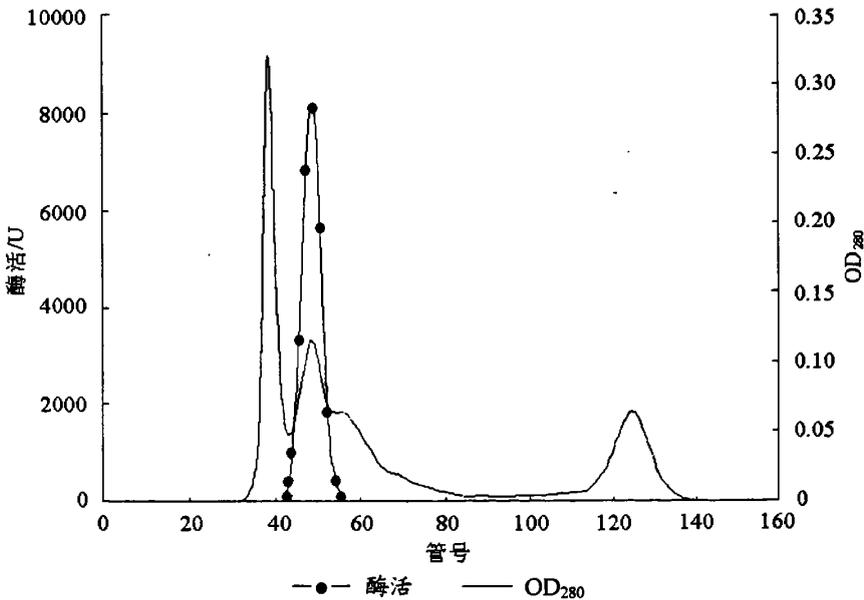


图 4-2 Sephacryl<sup>™</sup> S-200 凝胶过滤层析

Fig. 4-2 Gel filtration of CAT on Sephacryl<sup>™</sup> S-200

图中呈现三个蛋白质峰, 只有第二个峰有酶活, 为确保目标酶的最终纯度, 只将酶活最高的 5 管酶活收集合并。

### 4.3.3 酶蛋白的离子交换层析

将凝胶过滤层析收集的有酶活部分加样到 Mono Q 离子交换层析柱, 先用 pH 7.0 的 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液洗去未结合的蛋白, 即第一个峰, 如图 4-3 所示。平衡后用含 NaCl 的 pH 7.0 的 0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液线性洗脱, NaCl 的浓度梯度为 0-0.7 mol/L。共出现五个峰, 经测定, 第四个峰有酶活, 酶活峰对应的 NaCl 浓度大约为 0.3 mol/L。为确保目标酶的最终纯度, 只将酶活最高的 20, 21, 22 管酶液合并。

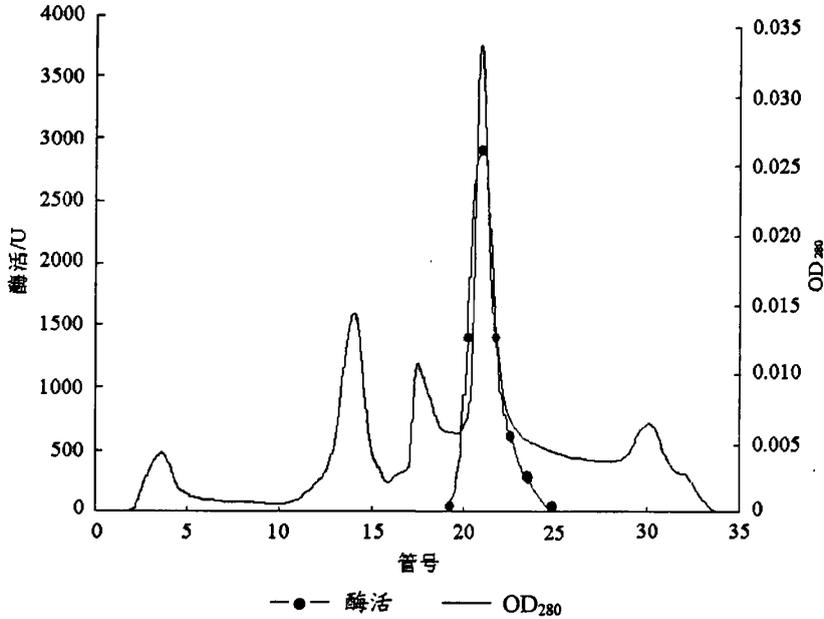


图 4-3 Mono Q 离子交换层析

Fig. 4-3 Ion exchange chromatography of CAT on Mono Q

### 4.3.4 CAT 纯化结果分析

现将纯化过程总结于表 4-1, 可知纯化后酶的比活力达到 46619.69 U/mg, 纯化倍数为 62.51, 得率为 32.06%, 此外, 各步纯化的分离结果均以 Native PAGE 和 SDS-PAGE 进行了鉴定。

表 4-1 *S. marcescens* SYBC-01 CAT2 的纯化总结

Table 4-1 Purification of *S. marcescens* SYBC-01 CAT2

步骤	总活力(U)	总蛋白(mg)	比活力(U/mg)	得率(%)	纯化倍数
粗酶液	584609.14	783.93	745.74	100	1
硫酸铵沉淀	411776.65	384.82	1070.05	70.44	1.43
凝胶过滤层析	241786.80	36.68	6591.79	41.36	8.84
Mono Q	187411.17	4.04	46619.69	32.06	62.51

从图 4-4 的活性电泳同功酶染色结果可以看出, 经过硫酸铵沉淀、凝胶过滤层析和离子交换层析三步纯化后, 最终的纯化样品显示单一的酶活亮带, 即 CAT2; 从图 4-5 可以看出, 得到了电泳纯的 CAT2。SDS-PAGE 的结果也显示了单一的蛋白质条带, 见

图 4-6, 这说明已经得到了电泳纯的目标酶, 且该酶的分子构型应该是单体或者同源寡聚体。

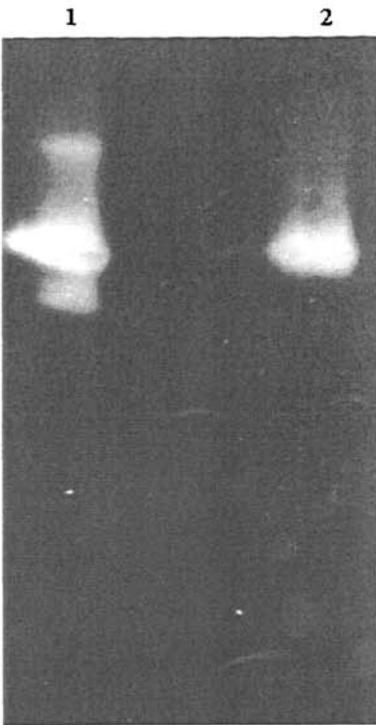


图 4-4 CAT 同工酶非变性 PAGE 电泳分析  
Fig.4-4 Electrophoretic analysis of CAT isozyme  
on native PAGE  
1, cell extract; 2, purified enzyme

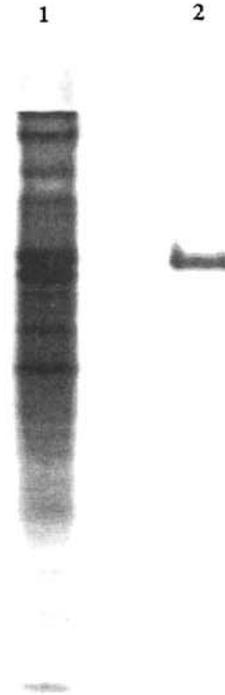


图 4-5 CAT 蛋白质非变性 PAGE 电泳分析  
Fig.4-5 Electrophoretic analysis of CAT on  
native PAGE  
1, cell extract; 2, purified enzyme

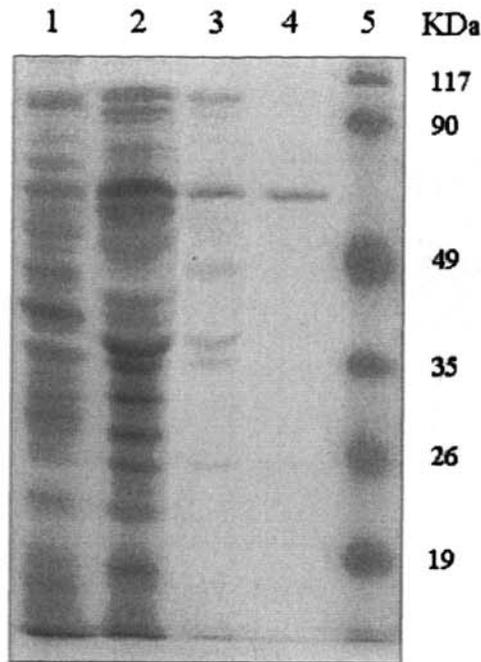


图 4-6 CAT2 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.4-6 Electrophoretic analysis of CAT2 on SDS-PAGE

1 cell extract; 2  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation; 3 Gel filtration; 4 Ion exchange; 5 Marker

以 SDS-PAGE 方法测定了 CAT2 的亚基分子量, 电泳结果见图 4-6, IgM-Rf 标准曲线见图 4-7, 估算的分子量大小为 70 KDa, 与文献<sup>[1]</sup>报道的来自枯草芽孢杆菌过氧化氢酶的亚基分子量一致。

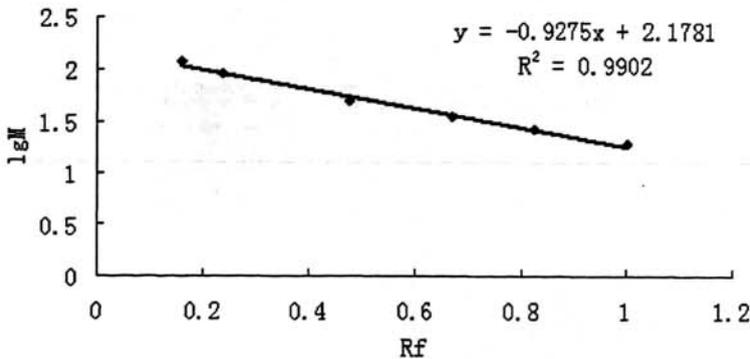


图 4-7 亚基分子量标准曲线

Fig.4-7 The standard curve subunit molecular weight

#### 4.4 讨论

张心齐等<sup>[1]</sup>通过硫酸铵、离子交换层析、凝胶过滤层析及疏水层析四步纯化得到了电泳纯的 CAT, 纯化倍数为 58.5, 酶蛋白得率仅为 2.6%, 离子交换这一步损失的酶活最多。本实验设计的硫酸铵、凝胶过滤层析及离子交换层析三步纯化过程最终得到了均一的 CAT2 样品, 相对于其他文献报道的 CAT 纯化过程而言, 32.06% 的得率是较高的,

并且重复性很强。纯化效率高，最主要的原因在于有好的纯化设备和选择合适的柱子，可以减少纯化的步骤而达到很好的纯化效果。

在实验过程中发现，同工酶染色质量的好坏与染色试剂  $H_2O_2$  的浓度有很大的关系，浓度太低条带和背景色区别不明显，浓度太高又会产生很多气泡。因此，在参考文献的基础上，将  $H_2O_2$  的浓度做了调整，确定合适的浓度为 6%，取得了很好的同工酶活性染色效果。

本实验纯化的目标酶是酶活相对最有优势的 CAT2，对其他同工酶并没有做详细的分析。

本章通过分离纯化得到了电泳纯 CAT，为下一步对该酶进行酶学性质的研究做好了准备。

## 第五章 *S. marcescens* SYBC-01 过氧化氢酶酶学性质研究

### 5.1 前言

为了更好地对酶反应的特征进行研究,酶学性质是一个重要的考察对象。反应体系的 pH 值不但会影响酶的构型和酶的稳定性,还会影响酶的活性中心必须基团以及底物的解离状态,从而影响酶的立体选择性和催化活性;反应温度的高低也会影响催化反应的速度以及蛋白质的活性;在不同的反应阶段,反应产物的纯度和产率都可能不同,而对于某些反应而言,甚至可能得不到产物。因此,反应体系及其环境条件会对酶催化反应的活性,底物转化的反应速度,以及最终的反应结果产生显著的影响。

本章研究了 *S. marcescens* SYBC-01 所产 CAT 的最适 pH 及 pH 稳定性、最适温度及温度稳定性、金属离子、抑制剂和有机溶剂对 CAT 酶活性的影响,并分析了酶活-底物浓度关系,计算出 CAT2 的表观  $K_m$  值和  $V_{max}$  值。通过天然分子量和亚基分子量的测定,确定该酶的分子构型。

### 5.2 材料和方法

#### 5.2.1 实验材料

##### (1) 试剂

试剂均为国产分析纯。

##### (2) 仪器

仪器	型号	生产厂家
分析天平	AL204	瑞士 METTLER TOLEDO 公司
紫外可见分光光度计	UNICO2100	美国 UNICO 公司
电热恒温水浴锅	SHZ-2	上海医疗器械五厂
pH 计	pSH-3C	瑞士 METTLER TOLEDO 公司

##### (3) 酶液

经第四章纯化后的酶液。

#### 5.2.2 实验方法

##### (1) 最适 pH

配制 pH 3-10 梯度缓冲溶液(pH 3-pH 8 缓冲液为 50 mmol/L  $K_2HPO_4$ -柠檬酸, pH 9-pH 10 缓冲液为 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH),按照常规方法在各 pH 下测定酶活。以最高酶活为 100%,计算相对酶活力。

##### (2) pH 稳定性

配制 pH 3-pH 10 梯度缓冲溶液(pH 3-pH 8 缓冲液为 50 mmol/L  $K_2HPO_4$ -柠檬酸, pH

9-pH 10 缓冲液为 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH), 8  $\mu$ L 酶液加 392  $\mu$ L 相应 pH 的缓冲液后于 30 $^{\circ}$ C 放置 24 h, 取 0.1 mL, 标准条件下测定残余酶活。以最高酶活为 100 %, 计算相对酶活力。

### (3) 最适温度

设定 30 $^{\circ}$ C-90 $^{\circ}$ C 反应温度梯度, 50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液下(pH 7.0)下测定酶活, 反应体系于各温度下预热 1 min。以最高酶活为 100 %, 计算相对酶活力。

### (4) 温度稳定性

设定 30 $^{\circ}$ C-80 $^{\circ}$ C 反应温度梯度, 将酶液(31  $\mu$ g/mL)于各温度下保温 30 min 和 60 min, 回复至 30 $^{\circ}$ C 并保温 1 min 后测定残余酶活。以未经保温的酶活力为 100 %, 计算相对酶活力。

### (5) 动力学参数 $K_m$ 及 $V_{max}$ 的测定

以 50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液下(pH 7.0)配制不同浓度的底物, 分别为: 2.5 mmol/L, 5 mmol/L, 7.5 mmol/L, 10 mmol/L, 12.5 mmol/L, 15 mmol/L, 20 mmol/L, 25 mmol/L, 30 mmol/L, 30 $^{\circ}$ C 下测定各底物所对应的酶活。

### (6) 金属离子及抑制剂对酶活的影响

在纯酶溶液中分别添加不同的金属离子及抑制剂, 30 $^{\circ}$ C 保温 10 min 后在标准条件下测定酶活, 以未加金属离子和抑制剂的酶液为 100 %, 计算相对酶活。

### (7) 有机溶剂对酶活的影响

酶液、95 %乙醇及氯仿以 10:5:3 的体积比混合, 30 $^{\circ}$ C 下放置 10 min 后按照常规方法测定残余酶活, 计算相对酶活力。

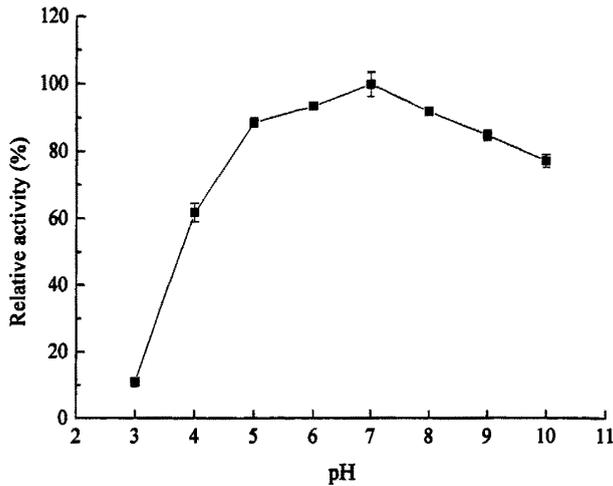
### (8) 过氧化物酶活性测定

测定体系为 4 mL, 包括 1 mL 40 mmol/L 的愈创木酚(Methyl catechol), 1 mL 40 mmol/L 的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1.9 mL 100 mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液(pH 6.0)。加入 0.1 mL 酶液后启动反应, 于 30 $^{\circ}$ C 波长 470 nm 下记录 OD 值变化。一个酶单位定义为测定条件下每分钟产生 1  $\mu$ mol/L 产物所需的酶量。

## 5.3 结果与分析

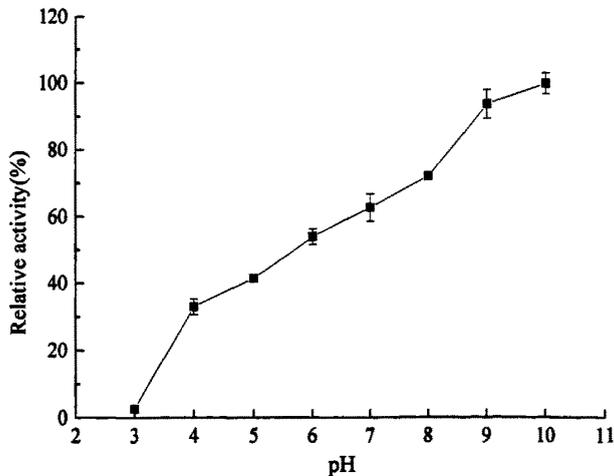
### 5.3.1 最适 pH

不同的酶由于其分子构成及表面构像的不同, 其解离的 pH 值范围也不同, 发挥作用的 pH 值区域也有差异。一种酶对于某一特定的底物, 在一定 pH 值下具有最大的反应速度, 这一特定的 pH 值就是该酶对这种底物的最适 pH 值。CAT2 在不同 pH 下的相对酶活见图 5-1, 结果表明, 该酶在 pH 3-pH 10 范围内均显示活性, pH 为 4 时, 相对酶活为 60 %左右; pH 为 10 时, 相对酶活为 77 %左右; pH 5-pH 9 范围内酶活受 pH 影响很小。统计学分析表明, pH 7 时的酶活显著高于 pH 6 和 pH 8 时的酶活( $P < 0.05$ )。但是由于在 pH 4-pH 10 范围内, 相对酶活都在 60 %以上, 所以 CAT2 适宜的 pH 范围很宽。

图 5-1 *S. marcescens* SYBC-01 过氧化氢酶的最适 pHFig. 5-1 Optimal pH of catalase in *S. marcescens* SYBC-01

### 5.3.2 pH 稳定性

CAT2 在一系列不同 pH 缓冲液中, 在 30℃ 下处理 24 h, 然后在原条件下测定残余酶活(图 5-2)。结果显示该酶在 pH 6-pH 10 范围内比较稳定, 相对酶活均在 50% 以上。当 pH < 6 时, 酶活力受到较大影响, 相对酶活低于 50%。

图 5-2 *S. marcescens* SYBC-01 过氧化氢酶的 pH 稳定性Fig. 5-2 pH stability of catalase in *S. marcescens* SYBC-01

### 5.3.3 最适温度

温度对酶的催化反应速度有着密不可分的关系, 既影响酶与底物的亲和力, 也影响

着酶-底物络合物的分解,对酶的应用具有重要意义。当反应温度由冰点升高,酶催化反应速度也随之上升,当温度达到某个值时,反应速度达到最大值,这个温度就叫酶反应的最适温度。

通过在不同温度下按照常规方法测定CAT2的最适反应温度,结果见图5-3所示。统计学分析表明,温度对酶活力的影响相对较小,温度为40℃,50℃,60℃和70℃时,酶活没有显著差异( $P>0.05$ ),但是70℃时的酶活要显著高于30℃和80℃时的酶活( $P<0.05$ )。因此,CAT2适宜的温度范围较宽(40℃-70℃)。

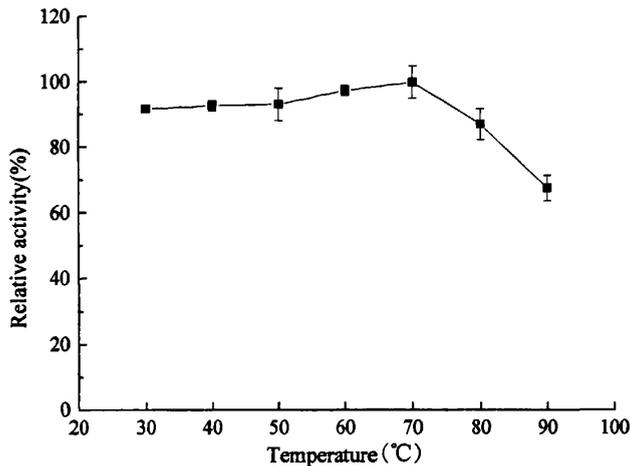


图 5-3 *S. marcescens* SYBC-01 过氧化氢酶的最适温度

Fig. 5-3 Optimal temperature of catalase in *S. marcescens* SYBC-01

#### 5.3.4 温度稳定性

酶活温度稳定性实验表明(图 5-4),CAT2 分别在 30℃-60℃保温 30 min 和 60 min,稳定性都较好,残余酶活大于 70%。当温度超过 60℃,酶活下降迅速;70℃保温 30 min,残余酶活为 15%左右,70℃保温 60 min,残余酶活为 6%左右,80℃分别保温 30 min 和 60 min,酶活几乎损失殆尽。

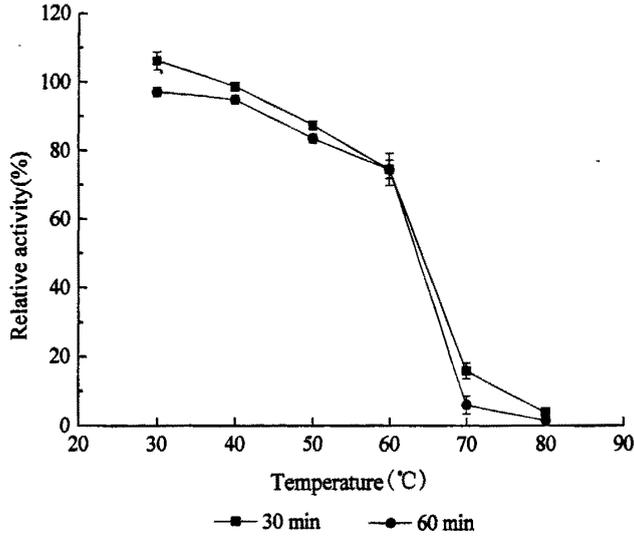


图 5-4 *S. marcescens* SYBC-01 过氧化氢酶的温度稳定性  
Fig. 5-4 Temperature stability of catalase in *S. marcescens* SYBC-01

### 5.3.5 动力学参数 $K_m$ 及 $V_{max}$ 的测定

由于过氧化氢是一种高活性的氧化物质，在一定的浓度下它将引起 CAT 的氧化失活，因此，本实验研究了不同的底物浓度对 CAT2 活性的影响，结果见图 5-5。

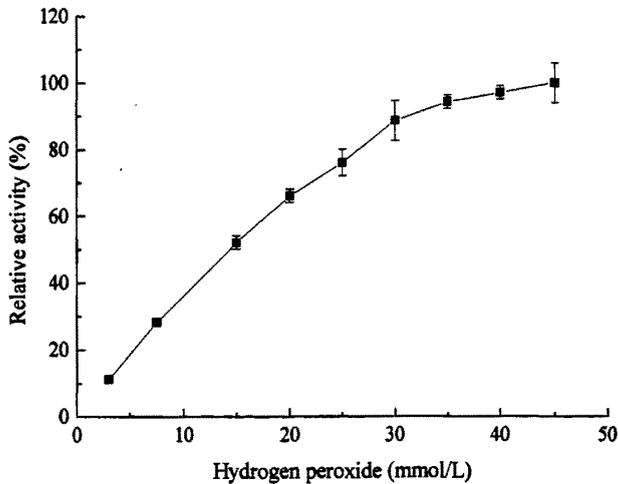


图 5-5  $H_2O_2$  浓度对 CAT2 活性的影响  
Fig. 5-5 Effect of  $H_2O_2$  concentration on the catalytic activity of CAT2

可见，在  $H_2O_2$  浓度小于 30 mmol/L 时，CAT2 的活性随着底物浓度的增加而升高，当  $H_2O_2$  浓度分别为 30 mmol/L, 35 mmol/L, 40 mmol/L, 45 mmol/L 时，相对应的酶活

均无显著变化( $P>0.05$ )。有文献报道<sup>[1]</sup>, 70 mmol/L 后活性开始迅速下降。

鉴于 CAT 和底物之间的这种特殊的相互作用关系, Aebi 认为该种氧化还原酶的动力学行为并不遵循常规的动力学方程, 因为 CAT 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。Hochaman 等人也认为, 用米氏动力学理论无法完全客观的解释 CAT 的动力学行为。因此, 目前学术界对 CAT 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, 类似于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。

本实验采用 Lineweaver-Burk(双倒数)作图法分析了 30 mmol/L  $H_2O_2$  以下的酶活-底物浓度关系(见图 5-6), 并计算出 CAT2 的表观  $K_m$  值为 29.7 mmol/L,  $V_{max}$  值为 80925.79 U/mg。结果表明, *S. marcescens* SYBC-01 所产过氧化氢酶的  $K_m$  值大大低于有关沙雷氏菌的有关报道<sup>[41]</sup>。

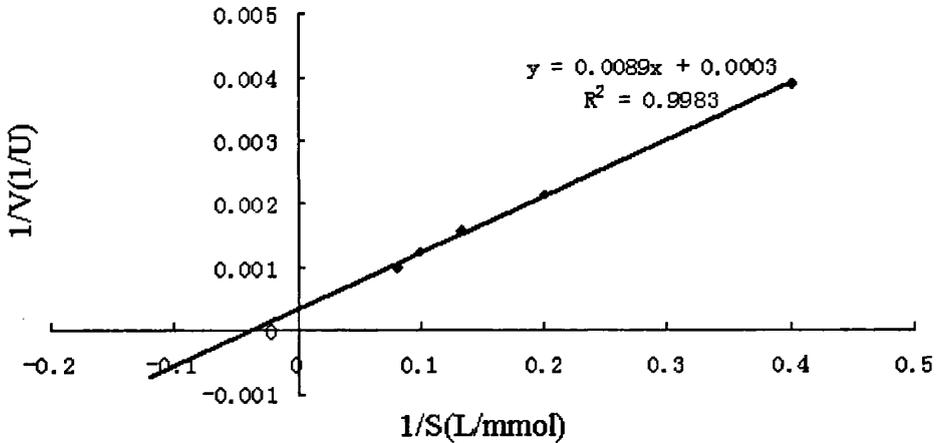


图 5-6 *S. marcescens* SYBC-01 过氧化氢酶的双倒数图

Fig. 5-6 Lineweaver-Burk plot of the catalase in *S. marcescens* SYBC-01

### 5.3.6 金属离子及有机溶剂对酶活的影响

金属离子及有机溶剂的影响见表 5-1, 经统计学分析表明, 0.5 mmol/L 的  $Mg^{2+}$  以及 1.0 mmol/L 的  $Ca^{2+}$  对 CAT2 有显著的激活作用( $P<0.05$ )。  $Zn^{2+}$  对 CAT2 的作用不显著( $P>0.05$ )。  $Mn^{2+}$  对 CAT2 虽然有抑制的趋势, 但可能由于浓度太低, 所以作用也不显著( $P>0.05$ )。至于对乙醇和氯仿等有机溶剂的耐受性( $P>0.05$ ), 这都是单功能过氧化氢酶亚群所共有的特点, 但 CAT2 是否是单功能过氧化氢酶还需要进一步证实。

表 5-1 金属离子及有机溶剂对酶活的影响

Table 5-1 Influence of heavy metal and organic solvent on the catalytic activity (mean±S.D, n=3)

金属离子	浓度(mmol/L)	相对酶活(%)
Zn <sup>2+</sup>	0.5	86.27±4.49
	1.0	103.51±6.08
Mg <sup>2+</sup>	0.5	121.57±3.40
	1.0	101.75±8.04
Ca <sup>2+</sup>	0.5	114.71±5.88
	1.0	119.30±3.04
Mn <sup>2+</sup>	0.5	111.76±5.09
	1.0	92.98±3.04
酶液+乙醇+氯仿	10:5:3	92.78±2.06

### 5.3.7 抑制剂及表面活性剂对酶活的影响

由表 5-2 可知, 叠氮化物, 较高浓度的金属螯合剂, 邻苯二酚, SDS 均对 CAT2 有特别显著的抑制作用( $P<0.001$ ), 其中以叠氮化物的抑制作用最强, 达到了 100 % ( $P<0.001$ ), 低浓度的金属螯合剂有显著的抑制作用( $P<0.05$ ); 邻苯二酚和金属螯合剂对 CAT2 的抑制作用均随着浓度的增加而加强。这与单功能 CAT 的性质一致。加入表面活性剂后, 随着浓度的增加, 酶活也相应提高, 这可能是由于同源寡聚体的存在, 表面活性剂使蛋白质的四级结构打开并使亚基分开, 从而使酶活提高。

表 5-2 抑制剂及表面活性剂对酶活的影响

Table 5-2 Influence of inhibitors and alkaterge on the catalytic activity (mean±S.D, n=3)

抑制剂/表面活性剂	浓度(mmol/L)	相对酶活(%)
NaN <sub>3</sub>	0.125	0
	0.25	0
EDTA	1	91.41±2.38
	5	68.04±3.57
catechol	1	67.35±3.15
	5	40.55±1.19
SDS	1	130.58±6.30
	5	163.57±4.29

### 5.3.8 过氧化物酶活性测定

虽然同为细胞抗氧化体系成员, CAT 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。后者则需要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。

张心齐等<sup>[1]</sup>曾以邻联茴香胺(Dianisidine)、邻苯二胺(Phenylenediamine)和二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine, DAB)为底物, 本文以愈创木酚为底物, 结果显示, CAT2 对该底物不显示酶活。CAT2 不显示过氧化物酶活性, 说明该酶不属于第二类过氧化氢酶。

### 5.3.9 天然分子量

用凝胶过滤色谱法测得的天然分子量在 125 KDa-200 KDa 之间, 其标准曲线见图 5-7。由第四章可知 CAT2 为单体或同源寡聚体, 亚基分子量大小为 70 KDa, 由此可以认为 CAT2 为同源二聚体构型。与文献<sup>[1]</sup>报道的结果一致。

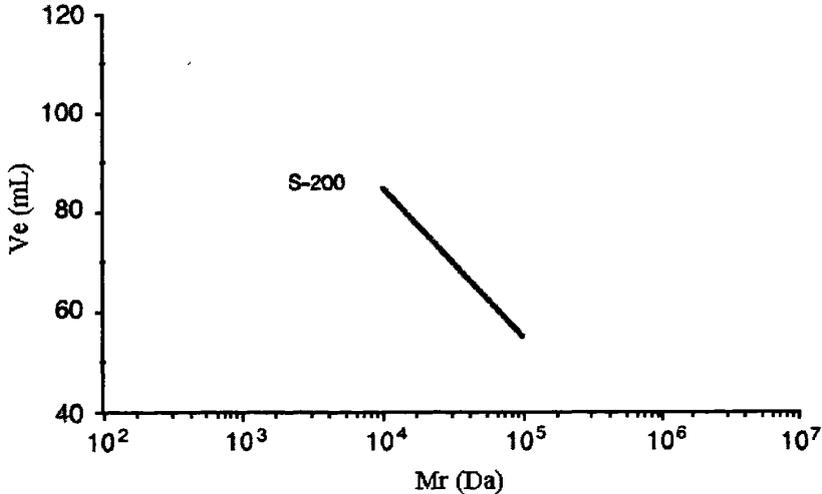


图 5-7 凝胶过滤色谱分子量标准曲线

Fig. 5-7 The standard curve of native molecular weight obtained by gel filtration chromatogram

## 5.4 讨论

一般来说, 典型的单功能CAT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-pH 10)。而CAT2正具备这样的特点, pH适宜范围较宽 (pH 4-pH 10)。pH稳定性实验发现, 随着pH升高, 该酶的相对酶活也相应升高, 体现了该酶的“嗜碱性”。据文献报道, 一般单功能CAT不像双功能CAT那样对热敏感。CAT2的最适温度范围也是较宽的(40°C-70°C)。温度稳定性良好, 在60°C以下分别保温30 min和60 min, 残余酶活均在70%以上。目前, 纺织行业应用CAT的条件见表5-3<sup>[49]</sup>。基于CAT2在pH和温度方面的特点, 该酶有一定的工业化应用前景。

表5-3 纺织行业中应用CAT的条件

Table 5-3 Bleaching effluents conditions when using CAT before dye process

Process	Temperature	pH	Temperature time/min
A	60°C-100°C	9-11	10-30
B	60°C-70°C	9-10.5	10-60

0.5 mmol/L 的  $Mg^{2+}$  对 CAT2 有激活作用, 1.0 mmol/L 的  $Ca^{2+}$  对 CAT2 也有激活作用。Zn<sup>2+</sup> 对 CAT2 的作用不显著; 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 的  $Mn^{2+}$  对 CAT2 的抑制作用也不显著; EDTA 对酶活力的抑制作用很强。与已报道的重组大肠杆菌 CAT 完全不同: 1.0 mmol/L 的  $Zn^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  可以使酶活力完全丧失;  $Ca^{2+}$  有较强的抑制作用; 低浓度的 EDTA 不抑制酶活。与已报道的嗜热链霉菌的 CAT 比较接近:  $Ca^{2+}$  对 CAT 有激活作用,  $Zn^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  不影响酶活力, EDTA 强烈抑制酶活力。已报道的 *Bacillus* 属的过氧

化氢酶:  $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 和  $Ca^{2+}$ 对该酶有不同程度的抑制作用。由此可见,离子和金属螯合剂对不同来源的 CAT 的作用是有差别的。

一般来说典型的单功能 CAT 构型为同源四聚体,但同时 CAT 在结构和序列上的多样性背景也孕育出了一些新构型的酶。到目前为止,已发现的新型 CAT 几乎均属于单功能 CAT 亚群,包括两个同源二聚体,一个异源二聚体,三个同源六聚体,甚至还有一个异源三聚体。已报道的同源二聚体单功能 CAT 有来源于 *Klebsiella pneumoniae*, 其亚基分子量为 80 KDa, 也有来源于 *Bacillus* 属, 其亚基分子量为 74 KDa。本实验中获得的 CAT2 是一个来源于 *S. marcescens* 的同源二聚体单功能 CAT。

## 第六章 结论与展望

### 6.1 结论

本文以获取 CAT 为主要目的, 进行包括产酶菌株筛选、菌种的部分鉴定、发酵产酶条件优化、酶的分离纯化及性质研究等工作, 主要结论如下:

(1) 从无锡惠山上采集的 20 个土壤试样中, 分离得到一株产胞内 CAT 的菌株, 经初步鉴定属于 *Serratia* 属, 其 16S rDNA 基因序列与 *S. marcescens* DSM 30121 的 16S rDNA 基因序列相似性最高, 为 99.9%。因此, 命名该菌为 *S. marcescens* SYBC-01。

(2) 菌株 *S. marcescens* SYBC-01 产 CAT 的适宜发酵培养基组成(g/L): 可溶性淀粉 12.5, 酵母膏 15, 磷酸二氢钾 0.5, 初始 pH 8.0。 *S. marcescens* SYBC-01 产 CAT 的适宜发酵条件为: 种龄为 8 h, 装液量 60 mL/250 mL, 接种量为 10% (v/v), 摇瓶发酵时间为 12 h, 培养温度为 28 °C。优化前菌株 *S. marcescens* SYBC-01 产 CAT 的酶活为 480.20 U/mL, 优化后酶活达到 1105.58 U/mL, 提高了 1.30 倍。

(3) 经过硫酸铵分级沉淀、Sephacryl™ S-200 凝胶过滤层析和 Mono Q 离子交换层析三步纯化得到了电泳纯 *S. marcescens* SYBC-01 产的 CAT2。最终纯化倍数为 62.51, 酶蛋白得率为 32.06%, 比活为 46619.69 U/mg。

(4) CAT2 的酶学特征: 纯化后的 CAT2 的最适 pH 为 7, 在 pH 6-pH 10 范围内稳定性较好, 相对酶活均超过 50%; CAT2 的最适温度为 70°C, 该酶的温度稳定性较好, 在 30°C-60°C 范围内分别保温 30 min 和 60 min, 残余酶活均超过 70%; 表观  $K_m$  值为 29.7 mmol/L,  $V_{max}$  值为 80925.79 U/mg;  $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  对 CAT2 有激活作用; 受单功能过氧化氢酶抑制剂的抑制; 对乙醇和氯仿等有机溶剂具有耐受性; CAT2 不显示过氧化物酶活性; CAT2 的分子构型为同源二聚体, 亚基分子量为 70 KDa。根据以上结论, 将 CAT2 归属为单功能过氧化氢酶亚群。

### 6.2 展望

(1) 若要将菌株 *S. marcescens* SYBC-01 产 CAT 应用于工业化生产, 还需进行放大论证如大罐发酵生产 CAT, 并优化大罐发酵生产工艺等工作。

(2) 菌株 *S. marcescens* SYBC-01 所产 CAT2 具备较宽的 pH 活性范围和良好的温度稳定性等特点, 显示其具有工业开发价值和潜力。因此, 在今后工作中还将着重于该酶基因的克隆及高效表达等工作, 这对于大规模提取酶蛋白很必要, 因为从野生菌复杂的同工酶体系中有效地纯化目标酶有一定难度。

(3) 考虑到灵菌红素在临床研究和环保领域的潜在价值, 该菌所产红色素值得做进一步研究。

## 致 谢

本论文是在廖祥儒教授的悉心指导和热情关怀下完成的。廖老师严谨求实的治学态度、细致入微的逻辑思维、渊博的学识和开阔的思路教会了我科学的研究方法和研究态度，从论文的选题、实验的设计到论文最终的定稿，廖老师都倾注了大量心血；在此谨向辛勤培育我的恩师致以衷心的感谢和最真挚的敬意！

蔡宇杰副教授、唐蕾副教授、田亚平教授、严群等老师在作者硕士阶段给予了无私的帮助，对他们帮助与支持表示诚挚的感谢！

沈微副教授在作者实验阶段提供了很多帮助，在此表示最深切的谢意！感谢中心实验室张峰老师、陈蕴老师、韩业慧老师和刘海丽老师在仪器使用方面给予的指导和帮助。

特别感谢硕士刘尚、李志强、王臻和高建峰的巨大帮助！感谢金永生、张晓晴、王蕾、周凤丽、谢焱、杨鲁强、魏亚娟、李泉、林杰、宋光明、孙慧碧、丁春生、许美娟、王方、郗丽红、施晓燕、吴会广、庞建勋、钟义华、陈杰在实验过程和论文写作中给予的帮助，祝各位年轻人前程似锦。本实验室博士研究生张建国老师、吴立峰、梁晓辉、苑博华、王志新对我学习上的帮助，在此表示衷心感谢！

感谢张荣珍老师和饶志明老师在读研过程中给我的无私帮助。感谢荆燕老师，陶丽华老师，王冰老师和雷虹老师对我的关怀和帮助。

感谢我的室友姚璐焯、许红对我的关心和帮助，这份友情永远难忘。

感谢朱林江师兄，刘景师姐和张一心对论文修改提出的宝贵意见和建议。

最后特别要感谢我的父母，尽管于他们而言，也许根本不需要说谢谢二字。当我生病了，当我遇到困难了，你们永远是最坚强的后盾和温暖的港湾。我在外求学二十载，你们的头发开始变白了，以后的日子是我报答孝敬你们的时候了！

## 参考文献

- [1] 张心齐.碱性过氧化氢酶产生菌的筛选及其酶的分离纯化与性质研究[D]:[硕士学位论文].无锡:江南大学生物工程学院, 2004
- [2] 方允中, 李文杰.自由基与酶—基础理论及其在生物学和医学中的应用[M].北京, 科学出版社, 1989, 129-146
- [3] Goldberg I, Hochman A. Three different types of catalase in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Arch Biochem Biophys, 1989, 268(1): 124-128
- [4] Zámocký 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
- [5] 焦铭.过氧化氢酶去折叠及其与超氧化物歧化酶相互作用的研究[D]:[硕士学位论文].武汉:武汉大学生命科学院, 2003
- [6] 莫简主.医学自由基生物学导论[M].北京:人民卫生出版社, 1989
- [7] 相尺考亮.酶应用手册[M].上海:上海科学出版社, 1989
- [8] 怀斯曼 A.酶应用手册[M].上海:上海科学技术出版社, 1986: 382
- [9] 李艳, 李静.葡萄糖氧化酶及其应用[J].食品工程, 2006, 3: 9-11
- [10] Göth L. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture [J]. Clin Chim Acta. 1991, 196:143
- [11] 冯国基.现代诊断与治疗[M].北京, 人民卫生出版社, 1994
- [12] 王明星.纺织用碱性耐热过氧化氢酶的微生物法生产及保存稳定性的研究[D]:[硕士学位论文].无锡:江南大学生物工程学院, 2005
- [13] 刘冰, 梁婵娟.生物过氧化氢酶研究进展[J].中国农学通报, 2005, 21(5): 223-224
- [14] Loewen P C, Klotz M G, Hassett D J. Catalase-an “old” enzyme that continues to surprise us [J]. ASM News, 2000, 66(2): 76-82
- [15] Paar A, Costa S, Tzanov T, *et al.* Thermo-alkali-stable catalase from newly isolated *Bacillus* sp. for the treatment and recycling of textile bleaching effluents [J]. J Biotech, 2001, 89: 147-153
- [16] Reid T J, Murthy M R, Sicignano A, *et al.* Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 angstrom resolution [J]. PNAS, 1981, 78(8): 4767-4771
- [17] KirKman H N, Gaetani G F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound

- molecules of NADPH[J]. PNAS, 1984, 81: 4343-4347
- [18]Fita I, Rossmann M G. The NADPH binding site on beef liver catalase [J]. PNAS, 1985, 82: 1604-1608
- [19]Harting A, Ruis H. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T [J]. Eur J Biochem, 1986, 160(3): 487-490
- [20]von Ossowski I, Mulvey M R, Leco P A, *et al.* Nucleotide sequence of *Escherichia coli* katE, which encodes catalase HP II [J]. J Bacteriol, 1991, 173(2): 514-520
- [21]Guan L, Scandalios J G. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid [J]. PNAS, 1995, 92: 5930-5934
- [22]Beckman J S, Minor Jr R L, White C W, *et al.* Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance [J]. J Biol Chem, 1988, 263(14): 6884-6892
- [23]Binder M, Schanz M, Hartig A, *et al.* Vector-mediated overexpression of catalase A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* induces inclusion body formation [J]. Eur J Cell Biol, 1991, 54(2): 305-312
- [24]Sosa R C, Masy D, Rouxhet P G. Influence of surface properties of carbon black on the activity of adsorbed catalase [J]. Carbon, 1994, 32(7): 1369-1375
- [25]Gudelj M, Fruhwirth G O, Paar A. 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]Pape L L, Perret E, Mechaud-Soret I. Magnetization studies of the active and fluoride-inhibited derivatives of the reduced catalase of *Lactobacillus plantarum*: toward a general picture of the anion-inhibited and active forms of the reduced dimanganese catalase [J]. J Biol Inorg-Chem, 2002, 7: 445-450
- [27]Goncalves V M, Cezar de Cerqueira Leite L, Raw I, *et al.* Influence of surface properties of carbon black on the activity of adsorbed catalase [J]. Biotech Appl Biochem, 1999, 29: 73-77
- [28]Isobe K, Inoue N, Takamatsu Y, *et al.* Production of catalase by fungi growing at low pH and high temperature [J]. J Biosci Bioeng, 2006, 101(1): 73-76
- [29]Jamal M, Ameno K, Uekita I, *et al.* Catalase mediates acetaldehyde formation in the

- striatum of free-moving rats [J]. *NeuroToxicol*, 2007, 28: 1245-1248
- [30] Ebara S, Shigemori Y. Alkali-tolerant high-activity catalase from a thermophilic bacterium and its overexpression in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression Purification*, 2008, 57: 225-260
- [31] Kim B Y, Kim H J, Lee K S, *et al.* Catalase from the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis*: cDNA sequence, expression, and functional characterization [J]. *Compar Biochem Physiol*, 2008, 149: 183-190
- [32] 王凡强, 王正祥, 邵蔚蓝. 热稳定性过氧化氢酶工程菌发酵条件的研究. *食品与发酵工业*[J], 28(2): 11-14
- [33] 刘建忠, 翁丽萍, 计亮年. 表面相应法优化黑曲霉过氧化氢酶的发酵工艺[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(5): 17-21
- [34] 洪海军, 许赣荣. 产过氧化氢酶菌株培养条件的优化[J]. *无锡轻工大学学报*, 2004, 23(6): 85-89
- [35] 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]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 667-671
- [36] 王凡强, 王正祥, 邵蔚蓝. 重组大肠杆菌热稳定性过氧化氢酶的纯化及性质[J]. *微生物学报*, 2002, 42(3): 348-353
- [37] Zhang X Q, Xue Y F, Zhao A M, *et al.* Purification and Characterization of a Monofunctional Catalase from an *Alkaliphilic* [J]. *Chin J Biotech*, 2005, 21(1): 71-77
- [38] Chen H, Mousty C, Chen L, *et al.* A new approach for nitrite determination based on a HRP/catalase biosensor [J]. *Mat Sci Eng C-Bios*, 2008, 28, 726-730
- [39] 黄文涛. 酶应用手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1989
- [40] Wang H X, Yukiko Y, Shinoyama H, *et al.* Purification and characterization of a thermostable catalase from culture broth of *Thermoascus aurantiacus* [J]. *J Ferment Bioeng*, 1998, 85(2): 169-173
- [41] Switala J, Loewen P C. Diversity of properties among catalases [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 401: 145-154
- [42] 新华社. 韩国发现能治理赤潮的海洋微生物[DB/OL]. <http://www.39kf.com>, 2007-9-18
- [43] R·E·布坎南, N·E·吉本斯等编. 中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册翻译组译. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984, 453-454
- [44] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994,

145-178

- [45]黄培堂.分子克隆[M].北京:北京科学技术出版社,2002,485-486
- [46]Monti D, Baldaro E, Riva S. Separation and characterization of two catalase activities isolated from the yeast *Trigonopsis variabilis* [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 2003, 32: 596-605
- [47]段绪果,沈微,李艳丽等.耐热过氧化氢酶基因工程菌的构建及其发酵条件[J].食品与生物技术学报,2006,25(2):74-78
- [48]陶金莉,沈亚领,魏东芝等.产灵菌红素沙雷氏菌的诱变育种[J].微生物学通报,2004,31(2):45-48
- [49]方芳,李寅,堵国城.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
- [50]金凤燮,李宪臻,张春枝等.生物化学[M].北京:中国轻工业出版社,2004,135
- [51]Wang H X, Tokusige Y, Shinoyama H. Purification and Characterization of a Thermostable Catalase from Culture Broth of *Thermoascus aurantiacus* [J]. *J Fermentation Bioeng*, 1998, 85(2): 169-173
- [52]田亚平.生化分离技术[M].北京:化工出版社,2006,5-8
- [53]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
- [54]Monti D, Baldaro D E, Riva S. Separation and characterization of two catalase activities isolated from the yeast *Trigonopsis variabilis* [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 2003, 32: 596-605
- [55]汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000,42
- [56]苏拔贤.生物化学制备技术[M].北京:科学出版社,1998

## 附录

菌株 *S. marcescens* SYBC-01 的 16S rDNA 序列:

```

1      GCTCAGATTG AACGCTGGCG GCAGGCTTAA CACATGCAAG TCGAGCGGTA GCACAGGGGA
61     GCTTGCTCCC CAGGTGACGA GCGGCGGACG GGTGAGTAAT GTCTGGGAAA CTGCTGATG
121    GAGGGGGATA ACTACTGGAA ACGGTAGCTA ATACCGCATA ACGTCGCAAG ACCAAAGAGG
181    GGGACCTTCG GGCCTCTTGC CATCAGATGT GCCCAGATGG GATTAGCTAG TAGGTGGGGT
241    AATGGCTCAC CTAGGCGACG ATCCCTAGCT GGTCTGAGAG GATGACCAGC CACACTGGAA
301    CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGCA CAATGGGCGC
361    AAGCCTGATG CAGCCATGCC GCGTGTGTGA AGAAAGCCTT CGGGTGTAA AGCACTTTCA
421    GCGAGGAGGA AGGTGGTGAA CTTAATACGC TCATCAATTG ACGTTACTCG CAGAAGAAGC
481    ACCGGCTAAC TCCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGGAGG GTGCAAGCGT TAATCGGAAT
541    TACTGGGCGT AAAGCGCACG CAGGCGGTTT GTTAAGTCAG ATGTGAAATC CCCGGGCTCA
601    ACCTGGGAAC TGCATTTGAA ACTGGCAAGC TAGAGTCTCG TAGAGGGGGG TAGAATTCCA
661    GGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGAGATCTGG AGGAATACCG GTGGCGAAGG CGGGCCCCTG
721    GACGAAGACT GACGCTCAGG TCGGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT
781    AGTCCACGCT GTAAACGATG TCGATTTGGA GGTGTGCCC TTGAGGCGTG GCTTCCGGAG
841    CTAACGCGTT AAATCGACCG CCTGGGGAGT ACGGCCGCAA GGTAAAACCT CAAATGAATT
901    GACGGGGGCC CGCACAAGCG GTGGAGCATG TGGTTTAATT CGATGCAACG CGAAGAACCT
961    TACCTACTCT TGACATCCAG AGAACTTTCC AGAGATGGAT TGGTGCCTTC GGGAACTCTG
1021   AGACAGGTGC TGCATGGCTG TCGTCAGCTC GTGTTGTGAA GTGTTGGGTT AAGTCCCPCA
1081   ACGAGCGCAA CCCTTATCCT TTGTTGCCAG CGGTTCCGCC GGGAACTCAA AGGAGACTGC
1141   CAGTGATAAA CTGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAGTCA TCATGGCCCT TACGAGTAGG
1201   GCTACACACG TGCTACAATG GCGTATACAA AGAGAAGCGA CCTCGCGAGA GCAAGCGGAC
1261   CTCATAAAGT ATGTCGTAGT CCGGATTGGA GTCTGCAACT CGACTCCATG AAGTCGGAAT
1321   CGTAGTAAT  CGTAGATCAG AATGCTACGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT GTACACACCG
1381   CCCGTCACAC CATGGGAGTG GGTGCAAAA GAAGTAGGTA GCTTAACCTT CGGGAGGGCG
1441   CTTACCACTT TGTGATTCAT GACTGGGGTG AAGTCGTAAC AAGGTAACCG TAGGGGAACC
1501   TGCGG

```

## 攻读硕士学位期间发表的论文

- [1] 热稳定性过氧化氢酶高产菌的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(2): 238-242
- [2] Purification and characterization of the thermal stability catalase isolated from *Serratia marcescens* SYBC-01. Enzyme Microbial Technol. (Submitted)

## 酶学性质研究

作者: [钱斯亮](#)  
学位授予单位: [江南大学](#)

## 相似文献(3条)

1. 学位论文 [齐放军](#) 1. 信号分子对水稻细胞过敏反应的诱导作用; 2. 甜菜夜蛾生防菌资源的发掘、基因克隆和工程菌的构建 2006

本文研究内容分为两部分:

第一部分: 信号分子对水稻细胞过敏反应的诱导作用, 主要结论是:

1. 成功建立了水稻细胞过敏反应(HR)的定量分析方法, 发现溴酚蓝染色法的效果明显优于伊文氏蓝染色法。线性回归分析显示, 在0.625~20 μg/mL范围内的溴酚蓝最大吸收值与其浓度间的相关系数为0.9994。溴酚蓝染色法优化的测定条件为: 0.03%溴酚蓝染色15min, 水洗去除未结合染料, 再在50℃下用50%甲醇/1%SDS抽提与死亡细胞结合的染料30min, 测定抽提液光吸收值(OD595), 以甲醇处理15min的细胞作为全系死细胞参照。用优化方法测定的水稻细胞死亡率与实际死亡率一致。

2. 报道了过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)不同添加方法诱导水稻细胞过敏反应(HR)的剂量和时间作用效应。由葡萄糖/葡萄糖氧化酶组成的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>发生体系能稳定持续产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 有效地诱导HR; 然而, 直接添加的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>则被水稻细胞快速降解, 不能有效地诱导HR。利用添加过氧化氢酶清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>发生体系产生的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 控制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对水稻细胞作用时间的方法, 揭示H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导水稻细胞HR存在时间作用效应。此外, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>也是水稻与病原菌不亲和互作中诱导HR的信号组分之一。

3. 对信号分子一氧化氮(NO)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导水稻细胞过敏反应(HR)的协同作用进行了研究。结果表明, 这两种信号分子可以独立或协同诱导水稻细胞HR的产生, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对NO诱导的水稻细胞HR具有调节作用, 但在诱导过程中可能不存在NO与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度平衡作用机制。

第二部分: 为了构建防治农作物危害性害虫甜菜夜蛾(Spodoptera exigua Huber)的生防工程菌, 在分离鉴定甜菜夜蛾致病菌的基础上, 对该菌中具有重要生防作用的几丁质酶基因进行克隆, 并构建了该基因的高效表达载体, 在枯草芽孢杆菌中实现了高效表达。主要结论是:

1. 从自然罹病死亡的病虫体中分离出甜菜夜蛾致病菌QL-1, 对其30项生理特征分析结果表明, QL-1菌株与肠杆菌科(Enterobacteriaceae), 沙雷氏菌属(Serratia)中的粘质沙雷氏菌(Serratiamarcescens)的生理特征相符合。进一步用PCR扩增出QL-1的16SrDNA基因片段, 测定其序列并进行系统发育分析, 结果也表明, 该菌株与Serratiamarcescens处于同一进化分支中, 相似性达99.2%以上。

2. 用设计的特异性引物和PCR技术, 成功地从粘质沙雷氏菌(Serratiamarcescens)QL-1基因组DNA中扩增并克隆几丁质酶A基因(chiA)序列(GenBank登录号: AY433954)。核苷酸序列测定分析结果表明, chiA扩增片段长为1,841bp, 含有一个1,692bp的开放阅读框(ORF), 编码蛋白ChiA由563个氨基酸组成。氨基酸序列同源性分析及结构域分析表明, ChiA为糖基水解酶18家族的成员, 包括信号肽区(23AA)、PKD区(73AA)和催化区(387AA)三个结构域。

3. 将克隆几丁质酶A基因克隆到大肠杆菌和芽孢杆菌的穿梭载体pMA5中, 并切除了重组载体中的抗生素标记基因Ampr, 得到重组表达质粒pMA5-chiA-2, 转化枯草芽孢杆菌BS168、BCL1050后, 实现了几丁质酶的高效表达和分泌。这一安全性生防工程菌的构建为实现病虫害的生物防治建立了良好的基础。

2. 期刊论文 [钱斯亮](#). [蔡宇杰](#). [廖祥儒](#). [沈微](#). [吴元](#). [张峰](#). [张大兵](#). [QIAN Si-liang](#). [CAI Yu-jie](#). [LIAO Xiang-ru](#). [SHEN](#)[Wei. WU Kang](#). [ZHANG Feng](#). [ZHANG Da-bing](#) 热稳定性过氧化氢酶高产菌的筛选、鉴定及酶学性质研究 -西北农业学报2008, 17(2)

从无锡惠山采集的土样中分离获得一株过氧化氢酶产量较高的菌株SYBC-01, 根据其形态、生理生化特性和16S rDNA序列分析, 鉴定该菌为粘质沙雷氏菌(Serratia marcescens)。初步试验表明, 该菌产过氧化氢酶酶活达293.88 U/mg细胞, 所产过氧化氢酶的最适反应pH 7, 最适反应温度70℃, 在pH6~10范围内较稳定, 60℃以下热稳定性较好, 表观Km值为23.71 mmol·L<sup>-1</sup>, Vmax为34 672 U·mg<sup>-1</sup>蛋白。

3. 学位论文 [王秀娟](#) Lambda-cyhalothrin胁迫下农田土壤微生物特征及降解菌筛选 2008

本文通过采集高效氯氟氰菊酯(Lambda-cyhalothrin)不同胁迫浓度下农田土壤样品, 对微生物三大主要类群和功能群数量、土壤呼吸、土壤酶活性等土壤微生物和生化指标进行测定, 首次评价高效氯氟氰菊酯对土壤微生物和土壤酶活性的影响。并利用分子生物学手段研究降解菌筛选过程的原理。初次利用高效氯氟氰菊酯降解菌及其胞内粗酶液进行受污染植物的盆栽试验, 并对受污染土壤进行生物修复研究。<br>

在实验的30d内, 高效氯氟氰菊酯对固氮菌和解磷菌没有影响。7d测定20mg·L<sup>-1</sup>和50 mg·L<sup>-1</sup>高效氯氟氰菊酯使放线菌数量明显高于对照组(p<0.05), 表现出对生长有促进作用; 同时100mg·L<sup>-1</sup>高效氯氟氰菊酯对细菌和真菌都有明显抑制作用(p<0.05)。14d高浓度底物对真菌仍有明显抑制作用; 50 mg·L<sup>-1</sup>和100 mg·L<sup>-1</sup>高效氯氟氰菊酯对解钾菌有明显抑制作用(p<0.05)。0~14d100 mg·L<sup>-1</sup>的高效氯氟氰菊酯可促进土壤呼吸, CO<sub>2</sub>释放量明显高于对照组(p<0.05)。高效氯氟氰菊酯对过氧化氢酶和多酚氧化酶无影响。14d50 mg·L<sup>-1</sup>和100 mg·L<sup>-1</sup>的高效氯氟氰菊酯对土壤脱氮酶有抑制作用, 该酶活性与对照组相比差异显著(p<0.05)。从14d开始原100mg·L<sup>-1</sup>高效氯氟氰菊酯土样中脲酶活性降低且与对照组差异显著(p<0.05), 并且这种显著性一直持续到第21d。21d发现50mg·L<sup>-1</sup>高效氯氟氰菊酯也抑制脲酶活性, 该种酶活性与对照组差异显著(p<0.05)。以上结论可以得出由于高效氯氟氰菊酯向农田土壤中的投入, 高浓度的受试农药在30d中使土壤微生物种群数量、土壤性质发生变化, 进而影响到土壤质量, 使农田土壤生态系统的正常物质转化和能量循环发生了变化。本试验为更合理使用高效氯氟氰菊酯, 及农田生态效应评价提供有利的理论依据。<br>

利用16S rDNA-PCR-DGGE方法研究富集筛选降解菌过程中细菌的动态变化。通过组间矩阵相似度比较得知, 沈阳化工研究院农药厂周边受污染土壤样品从100<br>

mg·L<sup>-1</sup>到200 mg·L<sup>-1</sup>高效氯氟氰菊酯富集过程中相似性较低, 表现为58.5%, 表明由于加入高浓度的高效氯氟氰菊酯, 使得菌群变化明显。第二次筛选结束后菌群数量和种类都大幅度下降, 表现为组间相似度为55.6%。之后的筛选菌群相似性趋于稳定。沈阳市沙河镇废弃农药厂周边受污染土壤样品在各个富集过程中并未表现出菌群的明显变化, 而是在第三次降解菌筛选结束后表现出与第二次筛选菌群相似性明显降低, 为54.0%, 之后菌群变化趋于平缓。本结论为深入研究降解菌筛选机理提供理论依据。<br>

通过富集筛选培养方法分离得到两株高效降解高效氯氟氰菊酯的细菌wf2和Xs, 经过生理生化和分子鉴定确认分别为铜绿假单胞菌和粘质沙雷氏菌。经72h对100mg·L<sup>-1</sup>高效氯氟氰菊酯的降解率分别为84.47%, 82.74% wf2对高效氯氟氰菊酯降解作用的最优化条件为培养温度30℃、pH8.0、装液量60ml/250ml、接种量10.0%、底物浓度10mg·L<sup>-1</sup>; Xs对高效氯氟氰菊酯降解作用的最优化条件为培养温度30℃、pH7.5、装液量120ml/250ml、接种量15.0%、底物浓度10mg·L<sup>-1</sup>。Xs对多种抗生素敏感, 其中链霉素对Xs有强烈的抑制作用。wf2在培养过程中产生色素影响实验结果观察。两菌株同时对甲氧菊酯、氯菊酯和溴菊酯也有一定的降解效果, 降解率分别为69%和55%、40%和35%、42%和17%。<br>

盆栽试验表明菌株及其胞内粗酶液对青菜中残留的高效氯氟氰菊酯均有较好去除效果。wf2和Xs菌株72h对青菜表面高效氯氟氰菊酯的降解率达到70.58%和73.91%。胞内粗酶液降解实验也表现出较好的降解能力分别为34.42%和42.10%。<br>

降解菌对土壤修复也达到了一定的效果, wf2和Xs14d在未灭菌和灭菌土壤中降解率分别为38.85%和32.75%, 20.83%和17.65%。<br>

本研究为降解高效氯氟氰菊酯提供了菌种资源, 并为更合理地使降解菌应用于实际生产提供了理论参数。

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis\\_Y1397468.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis_Y1397468.aspx)

授权使用: 浙江大学(wfzjdx), 授权号: 7db3fa87-59f1-40d3-bc86-9ea0012ab387

下载时间: 2011年3月8日