

过氧化氢酶的研究与应用新进展

刘灵芝^{1,2}, 钟广蓉¹, 熊 莲^{1,2}, 常雁红², 肖宝清², 罗 晖¹

(1. 北京科技大学生物科学与技术系, 北京 100083; 2. 北京科技大学环境工程系, 北京 100083)

摘 要:过氧化氢酶是一种广泛存在于好氧微生物和动、植物体内、催化效率较高且具有重要工业应用价值的酶。在论述过氧化氢酶的类型划分、结构特点和功能的基础上, 阐述了过氧化氢酶的分纯化化和极端环境下微生物产过氧化氢酶的研究进展, 并对过氧化氢酶在食品、环保、造纸、纺织等行业中的应用进行了介绍。

关键词:过氧化氢酶; 极端微生物; 应用; 进展

中图分类号: Q 814

文献标识码: A

文章编号: 1672-5425(2009)03-0015-04

过氧化氢酶 (Hydrogen peroxidase) 又称触酶 (Catalase, CAT), 是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的末端氧化酶, 是以过氧化氢为底物, 通过催化一对电子的转移而最终将其分解为水和氧气。该酶是在生物演化过程中建立起来的生物防御系统的关键酶之一, 并在食品、医药、纺织、造纸、环保等行业具有重要的应用^[1,2]。

1 CAT 的来源及分类

迄今为止的研究表明, 几乎所有需氧微生物中都存在 CAT, 动物肝脏、红细胞、植物叶绿体等也含有大量 CAT。

早期按来源不同 CAT 被划分为真核 CAT 和原核 CAT, 真核 CAT 主要来源于动植物组织, 原核 CAT 主要来源于微生物。1989 年, Goldberg 等^[3] 按照结构和序列水平的异同将 CAT 划分为三个亚群^[4], 即单功能 CAT (Monofunctional catalase 或 Typical catalase)、双功能 CAT (Catalase-peroxidase, CAT-POD) 和锰 CAT (Mn-catalase)。按照催化中心结构差异 CAT 可分为两类: (1) 含铁卟啉结构的 CAT, 又称铁卟啉酶; (2) 含锰离子替代铁的卟啉结构的 CAT, 又称锰过氧化氢酶 (MnCAT)^[5]。

2 CAT 的结构特点和功能

单功能 CAT, 几乎存在于所有需氧生物中。尽管来源不同, 大部分单功能 CAT 在结构上具有高度相

似性, 都是由 4 个具有相同多肽链的亚基组成, 每个亚基含有一个血红素辅基作为活性位点, 该辅基的形式为铁卟啉, 一分子中含有 4 个铁原子, 相对分子量一般为 200~340 kDa^[6]。天然 CAT 的血红素活性位点处于高度自旋的 Fe³⁺ 状态, 它可以在过氧化氢的 2-电子氧化下形成复合物。

双功能 CAT, 广泛存在于动、植物组织中。其典型特点是具有两种不同的催化行为, 由于同样含有铁血红素结构, 所以具有与单功能 CAT 相同的催化功能, 但催化能力比单功能 CAT 要低 1 个数量级^[7], 不过在生物体中, 这种差别几乎可以忽略不计。双功能 CAT 对有机组织中过氧化反应具有更宽的底物范围, 对温度、pH 值、H₂O₂ 含量变化较为敏感。

到目前为止, 仅有 3 种锰 CAT 被发现, 由 Kono 等^[8] 和 Barynin 等^[9] 分别从乳酸菌和嗜热生物组织中获得。电子光谱与电子自旋共振 (ESR) 谱证实其中含有 2 个紧邻的锰离子, 存在混合价态 Mn₂ (II, III) 和 Mn₂ (III, IV)。还原态 Mn₂ (II, III) 显示弱的反铁磁性偶合, 而氧化态 Mn₂ (III, IV) 显示较强的反铁磁性偶合。

3 CAT 的研究进展

3.1 CAT 的分纯化

自 1937 年 Sumner 等得到牛肝过氧化氢酶的结晶之后, 人们开始利用不同的方法从各种动物组织和微生物中提纯过氧化氢酶^[10~13]。1999 年, 巴西生物学家利用血清蛋白和过氧化氢酶共纯化, 从人胎盘发

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2008BAD91B01), 北京市科技新星计划资助项目 (2006B22)

收稿日期: 2008-11-13

作者简介: 刘灵芝 (1983-), 女, 河南人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化工; 通讯联系人: 罗晖, 副教授。E-mail: luohui99@yahoo.com.cn。

生溶血的血液中提纯过氧化氢酶,并应用染料亲和层析法纯化了过氧化氢酶^[14]。林少琴等^[15]将新鲜贻贝肉匀浆抽提液经硫酸铵盐析、DEAE-Sepharose FF 柱层析纯化,得到过氧化氢酶。田荟琳^[16]以猪血为原料,采用 SephadexG-100 层析和 PEG 6000 分子筛层析法纯化了过氧化氢酶。随着基因工程方法的广泛应用,越来越多天然过氧化氢酶的基因被克隆并构建成为具有 6×His-tag 或其它多肽标签的融合蛋白,通过金属离子亲和层析等方法一步纯化即可获得高纯度的过氧化氢酶^[17,18]。Gustavo 等^[19]采用基因工程方法构建了一种带有 6×His-6×Arg 标签的重组辣根过氧化氢酶同工酶 C(HRP C),通过阴离子交换层析分离即可获得纯化倍数为 130 的蛋白,收率为 98.5%。

3.2 极端 CAT 的研究

虽然 CAT 的研究已经持续了一个多世纪,但研究和应用多局限于动物组织提取和常规微生物的培养。为了适应工业应用中的强酸(碱)、高温等条件,人们期望能寻找极端微生物中的 CAT。由于极端 CAT 具有超强的稳定性、贮存性、催化活性和抗化学变性能力,为工业领域中采用温和而低污染的生物法来催化降解 H₂O₂ 提供了新的机遇,因此越来越多地受到人们的关注。

3.2.1 嗜碱 CAT

1973 年, Kurono 等^[20]从土壤中筛选得到一株嗜碱细菌 *Bacillus* No. KU-1, 该菌最显著的特点是分泌胞外酶,因为 CAT 是细胞缓解代谢氧化压力的产物,是典型的胞内酶。1990 年, Yumoto 等^[21]从兼性嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* YN-2000 中分离得到了一种双功能 CAT。1995 年, Hicks^[22]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 3 种 CAT 同工酶。2001 年, Gudelj 等^[23]从纺织废水中筛选到了一株新的嗜热碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. SF, 对其所产生的双功能 CAT 进行了纯化和酶学性质的研究,发现该酶具有一定的工业应用价值。2002 年, Phucharoen 等^[24]也从纺织废水中筛选到了一株嗜碱耐盐的 CAT 高产菌株。

3.2.2 嗜热 CAT

1988 年, Suvit 等^[25]对 *Bacillus stearothermophilus* IAM11001 产生的 CAT 进行了分离纯化并进行了酶学性质的研究,发现该酶在 70℃ 条件下相对稳定,在 30℃ 条件下能保存一个月。1999 年, Kagawa 等^[26]从一株栖热菌中纯化并克隆了一种锰 CAT, 该酶含有双核锰簇结构,具有很好的耐热性。方芳等^[27]筛选得到了一株金黄色嗜热子囊菌 WSH 03201, 该菌株发酵

生产的 CAT 酶活较高,而且对热和碱的稳定性都较好,在纺织清洁生产中具有有良好的应用潜力。

3.2.3 极端 CAT 的生物技术

由于大多数极端微生物的培养和酶的提取都比较困难,难以获得大量低成本过氧化氢酶,因此,采用基因重组技术进行极端 CAT 的克隆和表达就成了必然的趋势^[28]。本课题组采用新的基因克隆策略,避开繁琐的菌株筛选过程,直接利用嵌套 PCR 技术从堆肥样品培养物的混合基因组模板中快速扩增得到嗜热脂肪芽孢杆菌过氧化氢酶基因 *perA*, 并构建得到该基因的重组大肠杆菌。经诱导表达后重组酶具有正常的生物学活性, SDS-PAGE 电泳结果显示重组 CAT 的量占可溶性蛋白的 20% 以上,通过金属亲和分离对重组酶进行纯化,过氧化氢酶的比酶活达到 484.56 U·mg⁻¹。该重组酶与目前国内生产的商品酶相比具有热稳定性好的优势,基本能满足纺织、印染等工业的高温要求,具有大规模生产的潜力^[29]。

3.3 锰 CAT 模拟研究

锰 CAT 的模拟研究,对解释配合物光谱、推测结构和磁性偶合的关系、研究金属离子的催化歧化作用、用化学方法模拟和研究生物化学反应进程等,都有着非常重要的意义,因而锰 CAT 越来越受到研究者的青睐。

自 1987 年以来,有大量不同氧化态的锰的双核配合物被合成,并作为模型物用来模拟 CAT 的特性,主要概括为以下几种类型^[30]: (1) 苯并咪唑模型; (2) 卟啉环模型; (3) 水杨醛席夫碱模型; (4) 大环配合物模型; (5) 酚氧二醛席夫碱模型; (6) 三氮环模型。研究表明天然酶含有苯酚基,现在的模拟研究则主要侧重于酚氧基的席夫碱大环配合物模型。Martell^[31]研究认为普通的大环配合物虽然能催化分解 H₂O₂, 但是其周期较短,不能对 H₂O₂ 进行循环催化,而采用一种连接于硅表面的 Mn(II) 配合物作为催化剂来分解 H₂O₂, 效率高且可以循环使用。

因为至今只分离出 3 种含锰的过氧化氢酶,相关信息较少,现在还未测得这类物质的氨基酸序列,并且发现和别的蛋白质有着不同系的现象暗示这种酶可能形成一种特别的基团。虽然合成了不少和锰 CAT 功能相似的模拟物,但是其活性还远远低于天然酶,大约相差 4 个数量级,所以在获得锰 CAT 的具体结构和提高模拟物的活性方面还需要进行大量的研究工作。

4 CAT 的应用现状

4.1 食品工业

半个世纪以前 CAT 就开始应用于食品工业。利用 CAT 能分解 H_2O_2 产生 O_2 的性质,可在烘烤食品制造过程中将 CAT 和过氧化氢一起用作疏松剂^[27]。但 CAT 更广泛的应用是对牛奶等的消毒。在牛奶保存或奶酪制造前用过氧化氢对牛奶或液体鸡蛋制品进行消毒,然后用 CAT 去除残余的过氧化氢。这一过程可以在低温下进行,从而避免高温处理造成的蛋白质变性和某些营养物质的破坏^[32]。

4.2 环保行业

目前发达国家环保行业的过氧化氢消费量约占过氧化氢总消费量的 10%~15%^[28]。用 CAT 取代化学试剂降解工业废水中含有的 H_2O_2 可以避免二次污染,同时也可以降解芳环化合物和脂族化合物^[33]。其中辣根过氧化氢酶(HRP)由于价格便宜且失活慢,已在很多含酚废水处理中得到了应用^[34]。

4.3 造纸工业

近年来造纸行业相继以 H_2O_2 漂白代替传统漂白方法,并通常用 SO_2 和亚硫酸氢钠去除漂白后的 H_2O_2 。随着世界各国对环境和安全问题的考虑,促进了去除 H_2O_2 方法的深入研究,有研究表明,CAT 可在 10 min 内将 H_2O_2 降解,在这个领域具有广阔的用前景^[33]。2004 年美国能源部的爱达荷国家工程和实验室(INEEL)的研究者们从 *Thermus brockianus* 中分离并生产了一种过氧化氢酶产品(命名为超稳定过氧化氢酶),可应用于纺织和造纸行业的漂白过程,该项工作被 R&D 杂志评为 2004 年 100 个最显著的技术成果之一^[35]。

4.4 纺织行业

在印染加工过程中,传统的去除过氧化氢的工艺有两种,一为织物经漂白后用大量热水、冷水反复清洗(至少应洗 3 次)再进行染色;二为织物经漂白后用还原剂还原,再用水清洗一遍后进行染色。而应用过氧化氢酶可快速去除过氧化氢,只需要冷洗一遍,甚至不用水洗,并可以与染色工艺同浴。该方法可节约用水及能源、缩短工艺时间、实现安全染色、减少布面磨损,并有利于保护环境^[36,37]。

4.5 工业酶催化

在许多氧化酶的催化过程中会生成 H_2O_2 的副产物,而 H_2O_2 往往会对底物、产物或酶造成降解,因此,过氧化氢酶能快速分解 H_2O_2 的性质使其在工业酶催化中也有重要的应用^[38,39]。例如,在利用乙醇酸氧化酶催化乙醇酸生产乙醛酸的过程中,由于副产物 H_2O_2 容易导致产物乙醛酸的降解和酶的失活,人们通常采用乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶的双酶催化体系,使催

化过程能够顺利进行,并保持较高的产率^[40]。

5 结语

自 1937 年得到牛肝 CAT 以来,相关的研究一直是生物界热门的研究课题。然而,仍有许多研究有待于进一步深入。由于我国境内分布着各种类型的天然极端环境,拥有丰富的极端微生物资源,加大力度开发各类极端微生物的 CAT,并不断提高产酶水平,有望改变我国对 CAT 依赖进口的局面。随着现代生物技术以及生物信息学的不断发展,将使得在体外对极端酶进行修饰和改造成为可能,极端微生物产 CAT 的开发和应用必将呈现更加诱人的前景。

参考文献:

- [1] Schrader M, Fahimi H D. Peroxisomes and oxidative stress[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2006, 1763(12):1755-1766.
- [2] Zamocky M, Furtmüller P G, Obin C. Evolution of catalases from bacteria to humans[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008, 10(9):1527-1548.
- [3] Goldberg I, Hochrnan, A. Three different types of catalase in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 268(1):124-128.
- [4] Zámocky M, Koller F. Understanding the structure and function of catalase: Clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1999, 72(1):19-66.
- [5] 王志华,沈良. 锰过氧化氢酶及其模拟物的研究进展[J]. *杭州师范学院学报(自然科学版)*, 2006, 5(6):465-468.
- [6] Jacek S, Loewen P C. Diversity of properties among catalases [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 401(2):145-154.
- [7] Dismukes G C. Manganese enzymes with binuclear active sites [J]. *Chem Rev*, 1996, 96(7):2909-2926.
- [8] Kono Y, Fridovich I. Isolation and characterization of the pseudo-catalase of *Lactobacillus plantarum*—A new manganese containing enzyme[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258(10):6015-6019.
- [9] Barynin V V, Grebenko A I. T-catalase is a nonheme catalase of extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* [J]. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 1986, 286(2):461-464.
- [10] Reubsat F A, Veerkamp J H, Brückwilder M L, et al. Peroxisomal oxidases and catalase in liver and kidney homogenates of normal and di(ethylhexyl) phthalate-fed rats [J]. *Int J Biochem*, 1991, 23(9):961-967.
- [11] Nakamura K, Watanabe M, Sasaki Y, et al. Purification and characterization of liver catalase in acatalasemic beagle dog: Comparison with normal dog liver catalase [J]. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2000, 2(1):89-98.
- [12] Yumoto I, Ichihashi D, Iwata H, et al. Purification and characterization of a catalase from the facultatively psychrophilic bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1^T exhibiting high catalase activity [J].

- J Bacteriol, 2000, 182(7):1903-1909.
- [13] Kang Y S, Lee D H, Yoon B J, et al. Purification and characterization of a catalase from photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1 grown under anaerobic conditions[J]. Journal of Microbiology, 2006, 44(2):185-191.
- [14] Goncalves V M, Cezar de Cerqueira Leite L, Raw I, et al. Purification of catalase from human placenta[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1999, 29(1):73-77
- [15] 林少琴, 黄义德. 贻贝超氧化物歧化酶的纯化及部分性质研究[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(4):25-29.
- [16] 田荟琳. 猪血中过氧化氢酶的提取及性质研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12):311-314.
- [17] Vitaly Grigorenko, Tatiana Chubar, Yury Kapeliuch, et al. New approaches for functional expression of recombinant horseradish peroxidase C in *Escherichia coli*[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 1999, 17(5):359-379.
- [18] Ryan B J, ÓFágáin C. Arginine-to-lysine substitutions influence recombinant horseradish peroxidase stability and immobilisation effectiveness[J]. BMC Biotechnology, 2007, 7(1):86-94.
- [19] Gustavo Levin, Fernando Mendive, Héctor M Targovnik, et al. Genetically engineered horseradish peroxidase for facilitated purification from baculovirus cultures by cation-exchange chromatography[J]. J Biotechnol, 2005, 118(4):363-369.
- [20] Kurono Y, Horikoshi K. Alkaline catalase produced by *Bacillus* No. KU-1[J]. Agr Biol Chem, 1973, 37(11):2565-2570.
- [21] Yumoto I, Fukumori Y, Yamanaka T. Purification and characterization of catalase from a facultative alkalophilic *Bacillus*[J]. J Biochem, 1990, 108(4):583-587.
- [22] Hicks D B. Purification of three catalase isozymes from facultatively alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1299(3):347-355.
- [23] Gudelj M, Fruhwirth G O, 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(6):423-429.
- [24] Phucharoen K, Hoshino K, Takenaka Y, et al. Purification characterization and gene sequencing of a catalase from an alkaliphilic and halo-tolerant *Bacillus Halomonas* sp. SK1[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(5):955-962.
- [25] Suvit Loprasert, Seiji Negoro. Thermostable peroxidase from *Bacillus stearothermophilus*[J]. Journal of General Microbiology, 1988, 134(7):1971-1976.
- [26] 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.
- [27] 方芳, 李寅. 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.
- [28] 王凡强, 王正祥. 嗜热脂肪芽孢杆菌过氧化氢酶基因 *perA* 在大肠杆菌中的高效表达[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(2):219-222.
- [29] 熊连, 罗晖, 常雁红, 等. 耐热过氧化氢酶基因工程菌的构建及酶学性质的研究. 第五届全国化学工程与生物化工年会[C]. 陕西西安, 2008:1146.
- [30] 张闻, 罗勤慧. 锰过氧化氢酶及其模型物研究进展[J]. 化学通报, 2000, 63(10):7-13.
- [31] Martell E. Silica-bound di-Mn(II) complex A robust material for heterogeneous disproportionation of H₂O₂ in aqueous solution [J]. Inorg Chem Acta, 2003, 343:343-346.
- [32] Chu H D, Leeder J G, Gilbert S G. Immobilized catalase reactor for use in peroxide sterilization of dairy products[J]. Journal of Food Science, 2006, 40(3):641-643.
- [33] 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, 232.
- [34] Singh S, Melo J S, Eapen S, et al. Phenol removal using *Brassica juncea* hairy roots: Role of inherent peroxidase and H₂O₂ [J]. J Biotechnol, 2006, 123(1):43-49.
- [35] 范景阳. 美科学家分离出超稳定过氧化氢酶[J]. 造纸信息, 2005, (2):20-21.
- [36] Paar A, Costa S, Tzanov T, et al. Thermo-alkali-stable catalases from newly isolated *Bacillus* sp. for the treatment and recycling of textile bleaching effluents[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 89(2,3):147-153.
- [37] 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, 32(19):1-3.
- [38] Trost E M, Fischer L. Minimization of by-product formation during D-amino acid oxidase catalyzed racemate resolution of D/L-amino acids [J]. Journal of molecular catalysis, B: Enzymatic, 2002, 19-20:189-195.
- [39] Yoshimoto M, Miyazaki Y, Kudo Y, et al. Glucose oxidation catalyzed by liposomal glucose oxidase in the presence of catalase-containing liposomes[J]. Biotechnol Prog, 2006, 22(3):704-709.
- [40] Seip J E, Fager S K, Gavagan J E, et al. Glyoxylic acid production using immobilized glycolate oxidase and catalase[J]. Bioorg Med Chem, 1994, 2(6):371-378.

Research and Application Progress of Catalase

LIU Ling-zhi^{1,2}, ZHONG Guang-rong¹, XIONG Lian^{1,2}, CHANG Yan-hong², XIAO Bao-qing², LUO Hui¹

(1. Department of Biological Science and Technology, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China; 2. Department of Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: As one kind of oxidase, catalase can be found in almost all animals, plants and microorganisms. With high efficiency in peroxide catalyzing, catalases have important potential in industrial applications. On the base of reviewing enzyme classification, functions and structure, this paper focuses on the enzyme purifying and the research progress of catalases from extremophiles, and introduces the applications of catalase on food industry, environmental protection, paper making industry and textile industry.

Keywords: catalase; extremophiles; application; progress