

中国海洋大学

---

博士学位论文

---

南极海洋微生物N2a鉴定、系统学及一种低温过氧化氢酶BNC纯化与性质研究

---

姓名：王伟

---

申请学位级别：博士

---

专业：海洋生物学

---

指导教师：刘万顺;孙谧

---

20080601

## 独 创 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。据我所知，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，也不包含未获得\_\_\_\_\_（注：如没有其他需要特别说明的，本栏可空）或其他教育机构的学位或证书使用过的材料。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。

学位论文作者签名：王伟 签字日期：2008年6月4日

---

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，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。本人授权学校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。同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：王伟

导师签字：刘万顺

签字日期：2008年6月4日

签字日期：2008年6月4日

# 南极海洋微生物 N2a 鉴定、系统学及一种低温过氧化氢酶 BNC 纯化与性质研究

## 摘 要

低温过氧化氢酶(EC1.11.1.6)是好氧低温生物代谢必需的抗氧化酶。低温过氧化氢酶研究对于认识海洋微生物在低温下有氧代谢活动规律有重要意义。本研究从南极海水中筛选出高活性过氧化氢酶菌株,鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)细菌。详细研究了芽孢杆菌目(Bacillales)中产芽孢细菌尤其是芽孢杆菌属细菌的 16S rDNA 系统学,给出了新的分组结果。首次从海洋革兰氏阳性菌中分离纯化了过氧化氢酶并研究其性质,分析了低温酶和同源的中温酶差别不明显的现象。

从南极表层海水中分离细菌并筛选高过氧化氢酶活性的菌株,获得的 49 株细菌用硫代硫酸钠滴定法初筛后,其过氧化氢酶活性都高于大肠杆菌的酶活。用紫外分光光度法复筛后有 15 株菌的过氧化氢酶活性高于藤黄微球菌的酶活。其中 N2a 菌株活性最高,超声破碎细胞后活性达 1200 U/mg。49 株细菌的形态与生理生化特征表明它们属于同种细菌。进一步测定 N2a 的脂肪酸含量与 16S rDNA 序列后将其鉴定为芽孢杆菌属的细菌。N2a 是专性好氧,能运动,产芽孢的杆菌,主要脂肪酸为 iso-C14:1, iso-C15:0, anteiso-C15:0 和 iso-C14:0。N2a 与 *B. barbaricus*、*B. arsenicus*、*B. macauensis* 和 *B. gelatini* 的 16S rDNA 序列相似性分别为 99.4%、97.9%、96.1%和 95.3%。N2a 的表型(4℃生长, 7%NaCl 生长)和脂肪酸含量(不饱和脂肪酸占 40%以上)体现出低温海洋菌的特征,不同于和 N2a 的 16S rDNA 序列相近的菌株。所以 N2a 可能是 *Bacillus* 新种。

好氧产芽孢的细菌的系统学长期以来研究较少,特别是 *Bacillus* 属及相近属的系统学存在问题。本文根据 16S rDNA 序列,用邻位连接法(NJ)、简约法(MP)、最小进化法(ME)、最大似然法(ML)和贝叶斯推断(BI)五种算法构建了 181 种芽孢杆菌属及相关属细菌的系统进化树。BI 算法得到的进化树最理想,其次是 ML。各种系统进化树都表明, *Bacillus* 不是单系群,芽孢杆菌属及相关属细菌可以划分为 9 个组。芽孢杆菌属模式种 *B. subtilis* 属于组 1。N2a 菌株属于组 7。组 4, 组 6 和组 8 的细菌在表型上有一致性,分别为嗜热菌、嗜盐菌和嗜碱菌,而其它各组内的细菌在表型上无一致性。组 2, 组 4

和组 8 是由芽孢杆菌属及相关属细菌组成的, 说明目前芽孢菌的分类系统和 16S rDNA 系统进化树不完全一致。组 9 主要由芽孢杆菌科除 *Bacillus* 以外的属组成, 其中的 4 种芽孢杆菌可能属于其它的属。还有 4 种芽孢杆菌位于 9 个组之外, 应建立新属或划入其它属。

从 *Bacillus* sp. N2a 菌体中分离纯化其过氧化氢酶 (BNC), 采用 50 mmol/L pH7.5 Tris-Cl 缓冲液。菌体超声波破碎并离心后加入硫酸铵粉末, 收集 40%至 70%饱和度之间的沉淀, 样品透析后使用 ÄKTA FPLC 进行离子交换和分子筛层析。DEAE-Sephadex A-25 阴离子交换层析以 NaCl 梯度洗脱, 在 0.13 mol/L NaCl 时收集活性峰。聚乙二醇 20000 浓缩样品后使用 Sephacryl S200HR 分子筛层析。得到的过氧化氢酶在变性和非变性条件下电泳均为单一条带, 比活 80000 U/mg。Sephacryl S200HR 分子筛测定 BNC 分子量为 230 kD, SDS-PAGE 测得亚基分子量为 56 kD, 表明 BNC 是同源四聚体。Bio-Rad Rotofor 等电聚焦电泳测得 BNC 的 pI=4.2。BNC 最适温度 25°C, 最适 pH6-11, 活性受叠氮钠、盐酸羟胺和巯基乙醇的抑制。这些性质表明 BNC 属于小亚基单功能过氧化氢酶。BNC 的活化能 13 kJ, 表明它同其它小亚基单功能过氧化氢酶类似, 属于非温度依赖性的酶。BNC 在 4°C和 25°C的催化效率分别为  $3.6 \times 10^6$  和  $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。BNC 低温下高催化效率保证代谢产生的过氧化氢被迅速清除。BNC 的热稳定性低于来自中温芽孢杆菌的小亚基过氧化氢酶, 可以认为 BNC 属于低温酶。BNC 来自在自然环境中自由生活的细菌, 可以作为低温小亚基单功能过氧化氢酶的代表。BNC 和同源中温酶的活化能、催化效率及热稳定性差别不大, 是低温酶的特例。

关键词: 南极海水细菌分离鉴定; 芽孢杆菌系统学; 单功能过氧化氢酶; 纯化与性质; 低温酶;

# Isolation and identification of Antarctic marine bacteria N2a with high catalase activity, purification and characterization of a psychrophilic catalase and phylogenetic relationships between *Bacillus* species

## Abstract

Catalase (EC1.11.1.6) is a kind of high-active house-keeping protein among all organisms surviving in oxic environments, which scavenges  $H_2O_2$  produced by cellular metabolism of  $O_2$  to prevent  $H_2O_2$  from oxidizing lipids, proteins and nucleic acids. Studies on psychrophilic catalases are of significance to understand the metabolism of aerobic psychrophiles. Cold-adaptive catalases also have potential applications in dairy and water treatment in paper, food, textile and semiconductor industries. Bacteria with high catalase activities from Antarctic seawater have never been studied directly. Thus, an investigation of Antarctic marine bacteria containing high-activity hydroperoxidases is conducted by isolation and characterisation of the bacteria. The isolates are identified as *Bacillus*. The phylogeny of the new *Bacillus* species and the new genera of Bacillaceae have not been thoroughly studied. Therefore phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera by reconstructing 16S rDNA phylogenetic trees using several algorithms are established. To better understand psychrophilic catalases, a novel cold adapted catalase (BNC) from the *Bacillus* sp. N2a is purified and characterized, and its activation energy, thermostability and  $k_{cat} / K_m$  are compared with several psychrophilic and mesophilic homologous. This catalase is reported as the first characterized psychrophilic catalase from Gram-positive bacteria.

Forty-nine colonies are isolated from Antarctic surface seawater sample inoculated on Marine agar plates. After subcultured and identified by several morphological, biochemical and cultural methods, the Antarctic seawater isolates are all reciprocally similar. Cells are straight, Gram-variable, strictly aerobic and motile rods, 2.5–5  $\mu m$  long and 0.5–1  $\mu m$  wide.

They form oval endospores subterminally. Cells grow on marine agar at pH 6–11 (optimally at pH 7.5–8) and tolerated up to 6% NaCl (w/v). Colonies are whitish, translucent, flat, smooth, and circular with regular margins and approximately 1 mm in diameter within 24 h when grown on marine agar at 20 °C. Their cell extracts show high catalase activity of  $1200 \pm 295$  U/mg. High activity of the catalase at low temperatures is in accordance with the environmental conditions under which the microorganisms live. Identification of the Antarctic seawater isolates by several morphological, biochemical and cultural methods show that they belonged to the same species, among which the strain N2a is chosen as representative. This strain is determined to be a member of *Bacillus* according to its 16S rRNA gene and fatty acids profile. However, culturing properties (growth at 4 °C and in 7% NaCl) and relatively high unsaturated fatty acids (>40%) of the strain N2a are different from those of the 16S rRNA gene phylogenetic relatives, exhibiting the characteristics of psychrotolerant marine bacteria. Thus these results support the hypothesis that the Antarctic isolates are novel species of the genus *Bacillus*.

Neighbor-joining, maximum-parsimony, minimum-evolution, maximum-likelihood and Bayesian trees constructed based on 16S rRNA gene sequences from Genbank of 181 type strains of *Bacillus* species and related taxa manifest 9 phylogenetic groups, and the Bayesian tree is confirmed the best evolutionary tree, although the phylogeny of five species is uncertain. The phylogenetic analysis shows that *Bacillus* is not a monophyletic group. *B. subtilis* is in Group 1. *Bacillus* sp. N2a is in Group 7. Group 4, 6 and 8 respectively consist of thermophiles, halophilic or halotolerant bacilli and alkaliphilic bacilli, while the species in other groups differ much in the phenotype. Group 2, 4 and 8 consisting of *Bacillus* species and related genera demonstrate that the current taxonomic system does not agree well with the 16S rRNA gene evolutionary tree. The position of Caryophanaceae and Planococcaceae in Group 2 suggests that they might be transferred into Bacillaceae, and the heterogeneity of Group 2 implies that some *Bacillus* species in it might belong to several new genera. The close relationship

between *B. thermantarcticus* and *Geobacillus* in Group 4 seem that *B. thermantarcticus* should be accommodated in *Geobacillus*. Group 9 is mainly comprised of the genera (excluding *Bacillus*) of Bacillaceae, so some *Bacillus* species in Group 9: *B. salarius*, *B. qingdaonensis* and *B. thermcloacae* might not belong to *Bacillus*. Four *Bacillus* species, *B. schlegelii*, *B. tusciae*, *B. edaphicus* and *B. mucilaginosus* are clearly placed outside the 9 groups. It is proposed to respectively elevate *B. schlegelii* and *B. tusciae* to the rank of genus, and *B. edaphicus* and *B. mucilaginosus* should be transferred into *Paenibacillus*.

Catalase (BNC) from *Bacillus* sp. N2a is produced by the free-living bacterium from a cold habitat, rendering it more representative of cold-adapted catalases than any other reported psychrophilic catalases. After sonication of the harvested N2a strain cells, for the purification of BNC, a three-step protocol consisting of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation, anion exchange and gel filtration is developed. All purification steps are done at 4°C and chromatography was done by a Fast Protein Liquid Chromatography system (ÄKTA FPLC). The catalase is purified approximately 67-fold with a yield of about 26%. It shows a single protein band on SDS-PAGE and native PAGE. The purified catalase activity is about 80000 U/mg. The isoelectric point of the catalase is determined to be 4.2. BNC has a molecular mass of about 230 kD and is composed of four identical subunits of 56 kD. The catalase show optimal activity at 25°C and at pH range of 6-11. The enzyme could be inhibited by azide, hydroxylamine and mercaptoethanol. These characteristics suggest that BNC is a small-subunit monofunctional catalase. The activation energy of BNC is 13 kJ/mol and the apparent  $k_{cat}/K_m$  are  $3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at 4°C and 25°C, respectively. High catalytic efficiency of BNC at low temperatures enables this bacterium to scavenge  $\text{H}_2\text{O}_2$  efficiently. BNC can be categorized in psychrophilic enzymes according to its relatively low optimal temperature (25 °C) and low thermostability. BNC exhibited activation energy, catalytic efficiency and thermostability comparable to some mesophilic homologues. Such similarity of enzymatic characteristics to mesophilic homologues, though uncommon among

the cold-adapted enzymes in general, has also been observed in other psychrophilic small-subunit monofunctional catalases. The distinctive activation energy, thermostability and  $k_{cat} / K_m$  of small-subunit monofunctional catalases blur the boundary between psychrophilic and mesophilic catalases. The highly efficient mesophilic catalases with low activation energy have naturally adapted to the cold environment. In reverse, BNC exhibited cold-adapted characteristics not typical of psychrophilic enzymes.

**Keywords:** Isolation and identification of Antarctic seawater bacteria; 16S rDNA phylogeny of *Bacillus*; monofunctional catalase; purification and characterization; psychrophilic enzymes

# 1 引言

## 1.1 过氧化氢酶研究进展

### 1.1.1 过氧化氢酶生物学功能

过氧化氢酶 (hydroperoxidase, catalase, 过氧化氢氧化还原酶, EC1.11.1.6) 在生物界广泛存在, 其起源与演化和需氧生物进化关系密切[1]。它的活性容易检测, 底物  $H_2O_2$  廉价, 是被研究得最多的酶之一。它的主要生理功能是将  $H_2O_2$  分解为水和  $O_2$ 。

实际上所有生活在氧化性(oxic)环境中的生物, 不论它们是厌氧, 好氧还是兼性的生活方式, 都含有将活性氧中间体(ROI)转化为无害化合物的酶。ROI 主要包括超氧化物、 $H_2O_2$  和羟基自由基。它们是在生物代谢过程的氧化还原反应中产生的强氧化剂。如果它们不被歧化分解, 就会和生物大分子相互作用, 导致其构象改变而失活; 它们还会作用于细胞结构, 破坏其完整性。在 ROI 中, 超氧化物和羟基自由基反应活性高, 作用半径小; 而  $H_2O_2$  分子小且不带电荷, 能轻易穿过细胞壁或质膜等细胞结构, 还能加合到糖或氨基酸上, 再由众多通透酶(permeases)运至各处。因此  $H_2O_2$  能通过氧化蛋白质的巯基和断裂核酸单链而伤害到组织或细胞的任何一个地方。所有好氧生物和许多厌氧生物都有高效降解  $H_2O_2$  的保护性酶——过氧化氢酶, 以保证  $H_2O_2$  产生后立即被分解而不会损伤有机体[1]。

Fridovich 首先提出专性厌氧的生活史与缺乏抗氧化的酶这两者之间存在关联。这一假说被后来大量研究证实。有两种不同情况会使生物体受到 ROI 侵害: ①外源 ROI。 $H_2O_2$  由非生物过程或其它生物产生。②内源代谢过程中氧化还原反应产生 ROI。一个 *Escherichia coli* 细胞在葡萄糖基本培养基中处于指数生长期时, 每秒生成  $14 \mu mol$   $H_2O_2$ 。如果任其积累, 将很快杀死这个细胞。像原核生物和原生生物这样的单细胞生物, 它们所处的微环境不是受控的平衡环境, 所以它们进化出多种除去 ROI 的机制。多细胞真核生物通过终末组织分化和将涉及自由氧分子与铁的反应分区化这两种方式, 成功地避免了 ROI 胁迫。不仅如此, 真核生物还进化出专门的结构与机制产生“氧化爆发”(oxidative burst), 防御病害。在脊椎动物中, 这些功能发展为免疫反应。

在病原微生物与宿主长期协同进化过程中,病原生物也逐渐拥有了一套能保持其感染能力的抗氧化机能。在大多数生物中,ROI 的生成是细胞凋亡中的重要事件。如果不能控制这种“氧化爆发”,常会引起衰老加速和癌症[1]。在特殊情况下,如发病或不良环境,对酶的需求常会超出抗氧化酶的能力。过氧化氢酶在小鼠肝线粒体中组成型表达[2],其在小鼠线粒体中过量表达能使小鼠寿命增加 20%[3]。以上事实说明过氧化氢酶在生物生命活动中有至关重要的作用。

过氧化氢酶通过双电子转移氧化还原反应将  $H_2O_2$  歧化为水与氧气。它的亚基与四级结构的种类众多,根据氨基酸序列可以分为三大类:单功能过氧化氢酶、过氧化氢一过氧化物酶和锰过氧化氢酶[1]。

### 1.1.2. 单功能过氧化氢酶(monofunctional catalase)分类、性质与空间结构

#### 1.1.2.1 酶的分类

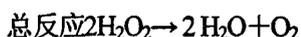
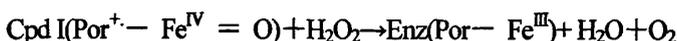
单功能过氧化氢酶广泛存在于真核与原核生物中。1900年就有关于其生化性质的报告;1937年获得结晶,成为最早获得结晶的酶之一[1]。在三类过氧化氢酶中,单功能过氧化氢酶种类最多,分布最广,活性最高,研究也最多。从生化角度根据酶亚基分子大小可将其分为两类:含大亚基(分子量75-84kD)的酶,所含的血红素为d型,不结合NADPH。含小亚基(分子量55-69kD)的酶,所含的血红素为b型,有的酶结合NADPH[1]。大亚基的酶在C末端比小亚基的酶多出约150个氨基酸,构成一个新的结构域。

通过晶体结构或电喷雾质谱研究过的单功能过氧化氢酶除少数例外几乎都是含相同亚基的四聚体[1]。序列已知单功能过氧化氢酶在300种以上。对这些序列进行系统发生学分析可将单功能过氧化氢酶分为三类:第一和第三类酶是小亚基的酶,而第二类酶是大亚基的酶[1]。这三类酶源自至少两次基因复制事件。第一类酶主要存在于植物中,还有一个亚类在细菌中。第二类酶存在于细菌和真菌。第三类酶存在于细菌、古菌、真菌和其它真核生物。可以推测第二类即大亚基的酶是最早的过氧化氢酶,它对热、过氧化氢和蛋白水解酶的稳定性高,利于抵御生命出现初期的不良环境。通过一次基因复制事件,它失去5'和3'端的序列,产生了第一类酶。这一事件发生得也比较早。而第三类酶不存在于较古老的生物类群中,推测它在进化中出现较晚,在细菌中通过一次基因

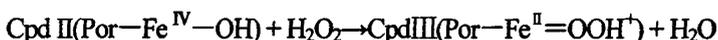
复制产生，随后通过水平基因转移进入古菌和真核生物[1]。

### 1.1.2.2 酶性质

单功能过氧化氢酶催化反应历程有两步。酶的血红素卟啉环(Por)和铁先被 $H_2O_2$ 氧化，生成 $Por^+-Fe^{IV}=O$ ，称为化合物 I (Cpd I)。接着这一处于氧化状态的酶把另一分子 $H_2O_2$ 氧化，产生原来的酶，水和氧气。反应如下[4-6]：



单功能过氧化氢酶也能经两步单电子反应将有机小分子（如甲醇或乙醇）氧化，这有些像过氧化物酶 (EC1.11.1.7)，但由于其活性位点空间限制，它只能作用于小分子而且活性很弱。[1]当 $H_2O_2$ 浓度低时，化合物 I 可能从还原性有机物得一个电子变为无活性的化合物 II。化合物 II 会进一步变为无活性的化合物 III[5, 6]：



化合物 II 和化合物 III 都可以转变为有活性的酶，也可能不可逆地变为失活的酶[6]。

单功能过氧化氢酶等电点小于7，最适pH范围广且偏碱性。酶不易被连二亚硫酸钠还原，活性受3-氨基-1,2,4-三唑的抑制[7]。单功能过氧化氢酶只在底物浓度较低时才遵循米氏动力学。在高底物浓度(0.3-0.5 mol/L)时，大多数小亚基的酶受到过氧化氢的抑制，不能达到根据在低底物浓度时反应速率计算出的最大反应速率。而大亚基过氧化氢酶只在 $H_2O_2$ 浓度大于3mol/L时才有可能受抑制，并且最大反应速率超出米氏方程的预期[7]。因此文献中关于过氧化氢酶的 $K_m$ 和 $V_{max}$ 都不是真正意义上的，而是根据实测值计算而来。如铜绿假单胞菌的过氧化氢酶KatB的转换数为 $54000s^{-1}$ ，而*Proteus mirabilis*的过氧化氢酶转换数高达 $833000s^{-1}$ [7]。不同过氧化氢酶的序列差异是催化效率差异的根本原因，但具体原因还有待对反应机理的深入研究。

以上关于过氧化氢酶的综述完全根据国外研究结果。国外对单功能过氧化氢酶纯化和性质方面的研究很多，表1-1只引用了部分微生物来源的单功能过氧化氢酶的研究。

表1-1 微生物单功能过氧化氢酶纯化与性质

Table 1-1 Property of the microbial monofunctional catalase

来源菌种 (菌株)	酶代号	纯化后比活 (U/mg)	亚基分子量 (kD)	等电点	最适酶活条件		酶活的温度稳定性	特征吸收峰 (nm)	文献
					温度 (°C)	pH			
<i>Halobacterium halobium</i>		6422	62	4	45	7	55°C5min 保留 35%	406	8
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>		120000	57.7	6.3*	ND	ND	ND	407	9
<i>Methanosarcina barkeri</i>		61500	54	6.3	15-55	4-10	ND	407	10
<i>Bacillus firmus</i> OF4	II	75000	60	ND	ND	8-10.5	ND	404	11
	III	8000	80	ND	ND	broad, <6.5	ND	402	
<i>Comamonas terrigena</i> N3H		55900	55.4 §	ND	ND	6-9	55°C75min 保留 44%	405	12
<i>Deinococcus radiodurans</i>	KatA	68800**	65	ND	30	ND	60°C30min 保留 30%	408	13
<i>Desulfovibrio gigas</i>		4200	61 ¶	ND	ND	7-9	50°C1h 保留 85%	405	14
<i>Halononas</i> sp. SK1		57900	57.8	ND	ND	6-10	37°C20min 保留 45%	ND	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KatB	ND	57	8*	ND	7-9.5	55°C1h 保留 17%	ND	16
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		55926	75, 68 §	5	54	6.5-9	30°C30min 保留 50%	406	17
<i>Rhodospirillum rubrum</i>		1256	79	ND	30	6-8	ND	ND	18
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	KatA	ND**	60	5.4	ND	5-9	ND	409	19
	KatC	ND**	85	5.5	ND	5-9	ND	408	
<i>Thermus brockianus</i>		5320	42.5	4.7	90	8-9	90°C2h 活性不变	410	20
<i>Vibrio rumoiensis</i> S-1		395000	57.3	6.5	40	6-10	55°C15min 保留 35%	406	21
<i>Vibrio salmonicida</i>	VSC	195000**	57	5.9*	0-10	8.8	50°C34min 保留 50%	405	22
<i>Xanthomonas campestris</i>	KatA	150000	56	ND	ND	7	55°C10min 保留 50%	ND	23
<i>Neurospora crassa</i>	Cat-1	1404891	88	ND	ND	4-12	85°C15min 活性不变	ND	24
<i>Thermoascus aurantiacus</i>		26195	75	4.5	70	6-10	85°C8h 保留 20%	405	25
<i>Trigonopsis variabilis</i>	TvC-II	55000	63	ND	ND	6-8	45°C3h 保留 10%	406	26

前三种酶来自古菌, 最后三种酶来自真菌, 其它酶来自细菌。\*此数据从基因序列预测计算得出。

§ 酶分子含有两个亚基。¶ 酶分子含有3个亚基。\*\*在 *E. coli* 中表达并纯化。ND: 未测。

国内过氧化氢酶纯化性质的相关研究较少。刘昌玲等 (1990) 从溶壁微球菌中分离并结晶了过氧化氢酶 [27]。周一等 (1990) 分离纯化了嗜热链霉菌的过氧化氢酶 [28]。张心齐等 (2005) 从一株低度嗜盐、兼性嗜碱的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. F26 中纯化得到一种碱性单功能过氧化氢酶, 并对该酶进行了性质研究 [29]。田荟琳等 (2006) 和张尔贤等 (1994) 分别从猪血中纯化了过氧化氢酶并研究其性质 [30, 31]。邓向军等 (2006) 从苹果中纯化了过氧化氢酶并研究其性质 [32]。肖湘等 (2003) 从牡蛎和泥蚶中纯化了过氧化氢酶并进行性质比较 [33]。林少琴等 (2000) 和徐炜虹等 (1996) 分别从贻贝和蚯蚓中纯化过氧化氢酶并研究了部分性质 [34, 35]。耿风廷等 (2007)、王凡强等 (2002)

和白杨等(2002)分别在大肠杆菌中表达人、嗜热脂肪芽胞杆菌和幽门螺杆菌的过氧化氢酶[36-38]。在过氧化氢酶发酵优化研究方面,华兆哲等(2007)研究了*Bacillus* sp. F26产过氧化氢酶的发酵条件[39]。段绪果等(2006)对嗜热脂肪芽胞杆菌过氧化氢酶[40];曹翔宇等(2006)和方芳等(2004)对金黄色嗜热子囊菌的碱性耐热过氧化氢酶[41, 42];洪海军等(2004)和陆挺等(2001)对溶壁微球菌过氧化氢酶[43, 44];刘建忠等(2002)对黑曲霉过氧化氢酶[45];王凡强等(2002)和周一等(1990)对耐热过氧化氢酶分别进行了发酵条件优化的研究[46, 47]。国内过氧化氢酶研究水平明显落后于国外。

### 1.1.2.3 酶空间结构

#### 结构概述

现有过氧化氢酶的空间结构都是对酶晶体进行X射线衍射分析得到的(表1-2)。国内研究者尚未开展这方面的研究。单功能过氧化氢酶空间构象高度保守。单个亚基主要有四个结构域。从N端至C端依次是: N端臂, 反平行八股 $\beta$ 桶, 突出的卷缠环区, C端 $\alpha$ 螺旋区。大亚基酶在C端还有一个黄素氧还蛋白样结构域, 通过一段突出的铰链区与 $\alpha$ 螺旋区相连[52]。N端臂与自身所在亚基肽链几乎无相互作用, 但它与四聚体另外三个亚基复杂地交织在一起。每个亚基N端臂像楔子或钩子一样伸入“对面”的亚基的卷缠环区。这种非共价的相互作用使过氧化氢酶稳定[66]。没有N端臂, 酶的亚基不能组装成四聚体[67]。

$\alpha$ 螺旋区含三或四个 $\alpha$ 螺旋, 在部分第三类过氧化氢酶中, NADPH结合位点由第一和第三个螺旋构成。黄素氧还蛋白样结构域属于 $\alpha/\beta$ 型结构域, 保守的His、Arg和Ser位于主通道入口附近, 可能与过氧化氢进入活性位点的调节有关。虽然黄素氧还蛋白样结构域与酶活性位点所在的核心区相互作用较少, 但缺失C端结构域的大亚基酶比正常的酶的稳定性的低[68, 69]。进化保守的残基主要分布在N端臂、 $\beta$ 桶和卷缠环区的起始部分 $\alpha$ 螺旋, 而酶蛋白序列相似性较低的部分主要位于卷缠环区的无规卷曲和 $\alpha$ 螺旋区以及黄素氧还蛋白样结构域, 它们远离活性位点、分布于四聚体表面[58]。

表1-2 获得晶体的过氧化氢酶

Table 1-2 Protein Data Bank accession numbers for catalases

过氧化氢酶	英文缩写	酶的来源	蛋白数据库 (PDB) 编号	参考文献	
单功能过氧化氢酶	I	CatF	<i>Pseudomonas syringae</i>	1M7S	48
		EKTA catalase	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	2J2M	49
	II	PVC	<i>Penicillium vitale</i>	2IUF	50
		HPII	<i>Escherichia coli</i>	1GGE	51
		CAT-1	<i>Neurospora crassa</i>	1SY7	52
	III	BLC	<i>Bos taurus</i> (liver)	7CAT	53
		MLC	<i>Micrococcus luteus</i>	1GWE	54
		PMC	<i>Proteus mirabilis</i>	2CAG	55
		CATA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1AE4	56
		HEC	<i>Homo sapiens</i> (erythrocyte)	1DGB	57
		HPC	<i>Helicobacter pylori</i>	1QWL	5
		VSC	<i>Vibrio salmonicida</i>	2ISA	59
	过氧化氢-过氧化物酶	HmCPx	<i>Haloarcula marismortui</i>	1ITK	60
		BpKatG	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1MWV	61
MtCP		<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1SJ2	62	
		<i>Synechococcus</i> PCC 7942	1UB2	63	
锰过氧化氢酶	LPC	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1JKU	64	
	TTC	<i>Thermus thermophilus</i>	2V8U	65	

### 过氧化氢酶活性中心

血红素埋在酶分子深处，位于  $\beta$  桶与  $\alpha$  螺旋围成的“口袋”中，和周围保守残基构成过氧化氢酶活性中心。血红素中心的三价铁并不位于血红素卟啉环平面上，而是在近侧（朝向四聚体核心的一侧）距血红素平面 0.03nm 处，与卟啉的四个吡咯环上的 N 原子形成四个配位键，与血红素平面的近侧 Tyr 的酚羟基形成第五个配位键（Fe-O 距离 0.15 至 0.19nm）。近侧另一个保守残基 Arg 通过与 Tyr 的氢键促进 Tyr 的苯酚基团 pKa 降低，利于配位键的形成。近侧的保守残基都位于卷缠环区。在血红素的远侧（朝向分子表面的一侧），在催化中起关键作用的 His 与血红素平面平行，在血红素第三或第四个吡咯环上方。另一个关键的 Asn 与第二个吡咯环的乙烯基相互作用。His 和 Asn 通过氢键使  $H_2O_2$  靠近血红素 [57]。

过氧化氢酶活性位点也是其正确折叠的保证。如果 *E. coli* 的 HPII 活性位点的 His 变为 Gln 或 Asn，整个过氧化氢酶构象就无法形成 [70]。而缺少血红素 Fe 原子的 PMC 虽然活性很低但仍能保持正确构象，甚至本应与 Fe 通过配位键相连的 Tyr 的构象也几乎不变。血

红素在单功能过氧化氢酶结构中处于核心位置，可它缺Fe却几乎不会使血红素本身构象或酶蛋白靠近血红素部分的构象改变，说明还是蛋白一级结构决定其空间构象[71]。

### 两种血红素及血红素定向

含血红素的过氧化氢酶多以铁原卟啉IV（血红素b）为辅基，而单功能过氧化氢酶第二类酶以血红素d为辅基。其差别在于第二类酶的血红素的第三个吡咯环5号C原子上多出一个羟基，6号C原子由不饱和变为饱和，其丙酸基自身酯化成环。血红素平面的空间取向以及和临近氨基酸残基的相互作用也发生变化。血红素d是过氧化氢酶催化时产生的单线态氧的氧化产物，即单线态氧将血红素b氧化成d[52]。这一变化使血红素抗氧化能力更强，不易形成无活性的化合物II。这也是大亚基的酶稳定性高的原因之一。

第一和第二类单功能过氧化氢酶活性位点的His位于血红素第四个环的上方，称为His-IV定向。而第三类酶活性位点His位于血红素第三个环上方，称为His-III定向。不同的氨基酸残基通过与血红素第一、第二个环上的甲基、乙烯基的范德华作用，决定了两种血红素定向[4]。如CatF的Ala301和Leu350通过靠近血红素第一、第二个环的乙烯基对血红素定向起决定作用。在单功能过氧化氢酶的301位，所有第一和第二类酶都没有Leu或Ile，而80%的第三类酶则有。这是由于这一位置的氨基酸残基侧链较大时，His-IV定向会受阻挡。69%第一类酶和所有第二类酶在第350位都有Leu，而第三类酶都没有。此处的Leu将阻止His-III定向[4]。这种序列特征能否成为决定血红素定向的规律？是否存在混合型血红素定向？第一第二类酶中有没有His-III定向，第三类酶中有没有His-IV定向这样的特例？更重要的是，不同的定向对酶催化的反应速率、活化能或历程是否有影响？定向的生物学意义何在？这些都需要更多研究。

### 大亚基酶侧链共价键

在CAT-1中Cys356的硫原子和Tyr379（与Fe形成配位键）的 $\beta$ C原子以共价键相连。这一共价键和血红素d的形成相似，也是在酶催化过程中被氧化形成[52]。共价键形成后，化合物I就不易夺取Tyr的电子，化合物II就难以形成。这样就提高了酶抗底物氧化的能力，使其在3 mol/L  $H_2O_2$ 中也不会失活[7]。所以尽管大亚基的酶不结合NADPH，却能更好地防止化合物II形成。在HP II中的His-Tyr侧链共价键在His咪唑环的 $\delta$ N与

Tyr的BC之间形成，缺少这一共价键的HP II没有活性[51]。

蛋白氨基酸残基侧链共价连接主要是Cys-Cys的二硫键，其它形式是罕见的。在大亚基的单功能过氧化氢酶中的侧链共价键的形成是一种特殊的翻译后修饰——底物修饰。共价键的形成是酶的底物和催化反应产物的强氧化性决定的。这一共价键有力地保证了酶高效催化。值得注意的是小亚基酶并无类似共价键。序列系统学分析认为小亚基酶由大亚基酶进化而来[1]，这种共价键是祖先酶的原始性状还是大亚基酶“最近”获得的次生性状？由于已知的大亚基酶的这种共价键仅两种（PVC没有这种共价键），所以有可能是次生性状。另一种解释考虑到血红素d的形成和侧链共价键形成有关联[51]，则这种共价键也是多数大亚基酶的特征，是生命早期极端环境下，酶对不良环境的适应[1]。这一观点需要发现更多的大亚基酶的侧链共价键才能成立。

#### NADPH结合

部分第三类酶能结合NADPH，它们都有一个NADPH结合区位于蛋白表面，如BLC的His193, Arg202, Val301和His304。这四个氨基酸是NADPH结合的特征位点。第一类酶在相应位置上都没有Arg202和His304，大部分没有His193和Val301，所以它们结合NADPH的可能性不大。第二类酶C端部分序列伸进本应结合NADPH的位置，使它们不能结合NADPH。结合NADPH在第三类酶中也不很普遍，所以可以推测第三类酶在进化和第一类酶分开不久就产生了His-III定向，而NADPH结合能力则是在后来才独立进化出来的[4]。

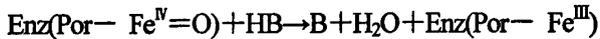
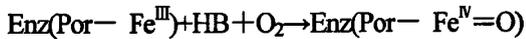
NADPH的功能是防止酶在催化过程中变成没有活性的化合物II [72]。但第一第二类酶和许多第三类酶都没有NADPH，也不形成化合物II。那应当如何解释部分第三类酶（包括所有哺乳动物过氧化氢酶）结合NADPH的能力呢？一种假说认为作为祖先的第二类酶能容易地避免化合物II的形成。当进化中产生小亚基酶时，它们或者不可能变为化合物II或者利用甲酸、苯酚及抗坏血酸等易合成的代谢物将化合物II还原为正常的酶。当进化中出现第三类酶以及出现更复杂的细胞内环境之后，还原性代谢物的获得受到限制或NADPH大量存在，使得一些生物利用NADPH作为防止化合物II形成的工具[4]。这种环境变化的解释多少有些牵强，如果发现NADPH的结合能赋予过氧化氢酶更多新功能，那将是更有力的论据。而Kirkman等认为防止化合物II形成只是结合的NADPH的次要功能，而

主要功能应当是还原反应中间体即还原化合物I [6, 73]。在 $H_2O_2$ 浓度低时, 化合物I氧化 $H_2O_2$ 的概率降低, 化合物I存在时间相应延长。由于化合物I的强氧化性, 化合物I存在时间越长, 酶的活性中心受破坏的可能性越大。结合的NADPH使化合物I还原为原初状态的酶, 具有重要的生理意义[73]。

### 酶的特殊活性

Heck等发现在人和鼠的角质形成细胞中, 紫外线B (UVB) 能促使过氧化氢酶产生活性氧, 即过氧化氢酶催化逆反应 $2H_2O+O_2\rightarrow 2H_2O_2$ 。以过氧化氢酶对UVB的吸收消除UVB对DNA的损伤。由于NADPH的最大吸收峰340 nm比血红素(405 nm)更接近UVB(290 nm-320 nm), 所以可以推测NADPH在这一逆反应中会发挥重要作用。令人困惑的是, 叠氮化物和3-氨基三唑这两种过氧化氢酶抑制剂能促进紫外灯下ROI产生 [74]。

Vetrano等报道了哺乳动物过氧化氢酶的氧化酶活性。当不存在 $H_2O_2$ 时, 过氧化氢酶能催化 $O_2$ 与还原性底物反应生成水和氧化产物。这一反应的关键是形成类似化合物II的中间体。这一化合物不仅不会被NADPH还原, 还将夺取还原性底物的H变回原酶。反应式如下:



氧化酶活性不需要NADPH, 其催化的反应是可逆的, 并且遵循米氏动力学, 这都不同于通常的过氧化氢酶[75]。

### 酶通道结构与“流穿机制”

所有过氧化氢酶都有通道通向位于酶分子深处的活性位点, 以供底物和产物出入。在 $H_2O_2$ 浓度很高时, 酶每秒分解 $10^6$ 个 $H_2O_2$ 分子[7], 其产物水分子和氧气也应以同等速率离开。如果产物再从底物进入的通道离开, 催化效率似乎会受影响。所以可以推测有一个底物 $H_2O_2$ 的入口, 还有一个产物氧气的出口[76]。这样才能防止底物产物的相互干扰, 保证酶的高效催化。

最明显的通道称为主通道, 几乎垂直血红素分子平面, 一向被认为是底物 $H_2O_2$ 的入口[5, 49, 50, 52, 57, 59, 76]。在小亚基的酶中, 主通道是漏斗状。而在大亚基的酶中,

主通道更长且有分支。研究发现突变蛋白HP II在主通道中存在水分子链，从酶表面一直伸到血红素。这是底物纵行穿过酶的一个重要证据。主通道的含水量与酶的活性呈负相关[48]；主通道的宽度，特别是靠近血红素的“瓶颈”部分的直径大小，与酶活性高低关系密切[49, 59]。

主通道末端靠近血红素的部分很狭窄（1.5nm），由疏水残基包围形成“瓶颈”，它在控制底物进入上起重要作用。在大亚基过氧化氢酶主通道中这一结构被称为“门”。在CAT-1的主通道中，Ser198的羟基和Arg144的羰基伸进主通道，羟基O与羰基O距离仅0.48nm，对于分子直径0.37nm的过氧化氢，通过这一狭窄的“门”是困难的。所有大亚基酶主通道上都有Ser或Thr的羟基伸到通道中，形成了控制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>进入通道的“门”。通向活性位点的通道中设一道门，能减少在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度低时化合物I的形成。因为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度低时，化合物I更容易变为无活性的化合物II，所以“门”是大亚基酶保护自身，防止化合物II形成的又一策略。“门”的开关受H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度调节：通道中“门”外水分子以及氨基酸残基相互形成的氢键网络有利于“门”的关闭状态，而“门”外H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>将改变氢键触发“门”的开启。这也可以解释高浓度过氧化氢条件下，大亚基酶不遵循米氏方程，反应速率高于预期值的原因。浓度越高，“门”开启程度越大，进入活性位点的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>就越多。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度通过改变“门”开启程度间接影响催化反应，“门”开启程度是催化速率的直接决定因素[52]。

主通道中的水分子是关注的焦点之一。所有结构已知的单功能过氧化氢酶的主通道中都有一个与催化残基His和Asn相互作用的水分子，某些酶如HP II，MLC和PMC在活性位点处还有第二个水分子。它能与血红素的铁和活性位点的His相互作用。从保守的Asp（距血红素1.2nm）到活性位点处的His是通道的疏水部分，不含水分子。这一现象可以用“分子尺”效应解释[4]。这段通道的氨基酸残基缺少相互作用位点，在空间距离上也不利于水分子之间以氢键相连形成稳定的网络结构。但这段通道对较大的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分子形成网络结构则是有利的。底物从主通道进入活性位点还受到许多复杂的相互作用控制。当这段疏水区的形状、体积通过氨基酸点突变的手段变大或变小时，酶的活性都有损失，这说明现有的三维结构是最佳的。若将那个保守的Asp替换成不带电的残基，不论是极性还

是非极性的，都会引起酶活损失和整个主通道含水量降低。若将Asp替换成结构相似的Glu，则酶活不变，但主通道疏水区消失，水分子充满整个通道。Asp这一带负电的残基在主通道中发挥了重要作用，它与血红蛋白中的 $\text{Fe}^{3+}$ 形成了疏水区电场，影响其中所有极性分子的定向。水和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 都是极性分子，它们的O原子将朝向 $\text{Fe}^{3+}$ ，而H原子将朝向Asp，溶剂分子的定向有利于氢键形成。当 $\text{H}_2\text{O}_2$ 进入活性位点时，朝向 $\text{Fe}^{3+}$ 的O原子上的H原子位于活性位点His的N原子的氢键距离内，另一个O原子则位于活性位点Asn的氨基的氢键距离内。这种定向方式也是分子动力学模拟研究认定的最佳定向方式。电场将极化过氧化氢中的电子，有利于过渡态中间体的形成，但电场强弱和酶催化能力之间有无对应关系？已知HEC的转换数远高于CatF和PMC，但发现HEC的 $\text{Asp-Fe}^{3+}$ 电场明显弱于后两种单功能过氧化氢酶，这似乎不能用电场强弱来解释。当用过氧乙酸处理后再观察HEC晶体时，其主通道疏水区结构不变但水分子能够进入，这也是不易解释的[4]。

第二个通道从侧面靠近血红素，几乎与血红素在同一平面内，称为侧通道。HP II侧通道上Glu-Arg离子对中的Arg260若不存在，则侧通道将扩大，酶活提高3倍[69]。但这还不能说明侧通道的确切功能。推测它是产物的出口，但仍需实验证据。

第三个通道将血红素与酶中央空腔连接起来，称为中央通道。中央通道从活性位点的远侧通向四聚体的中央空腔。由于中央通道是疏水的，又通向含水的中央空腔，所以它可能是氧气离开的通道[52]。氧气在中央通道中将经过Thr382这一在大亚基中保守的氨基酸，在Thr羟基引导下，氧气将朝向卟啉的第三个吡咯环，氧化血红素b。当突变造成主通道变宽时，HP II的血红素是b型而不是d型[77]，表明此时氧气通过主通道离开，不经过中央通道。还有研究者认为产物也从主通道离开[52, 59]；侧通道也是底物的入口[50]。

过氧化氢酶的高转换数 ( $10^6/\text{s}$ ) 使人联想到：过氧化氢酶催化不是一般的活性位点构象改变，而是独立的通道。这一假说称为“流穿机制”(flow through mechanism) [78]。也就是说，酶是底物穿过并变成产物的通道。这还可以解释酶对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 这种强氧化性底物的稳定性：通道减少了活性中心在 $\text{H}_2\text{O}_2$ 中的暴露时间，从而降低了受破坏的可能性。

研究展望

单功能过氧化氢酶研究中较少涉及亚基组装的问题。单功能过氧化氢酶在亚基缔合形成四聚体时，四个亚基的N端臂能否自发地插入卷缠环区？是否有分子伴侣的协助？血红素如何进入亚基中，如何实现定向？结构已知的单功能过氧化氢酶都是规则的同源四聚体，对于不常见的二聚体、六聚体和异源的多聚体，它们是否有和同源四聚体相似的空间构象，差别有多大，这都是应当进一步研究的问题。

今后应当重视过氧化氢酶空间结构的应用研究。现有的突变酶研究只是作为空间构象理论研究的手段，其实完全可以在已有的定点突变研究基础上，用分子设计的方法改变酶的氨基酸，提高酶的活性或稳定性。研究发现高活性的过氧化氢酶的稳定性较低[21]，而高稳定性的过氧化氢酶的催化效率不够高[7]。如果能根据酶空间构象的知识设计出兼顾稳定性与催化效率的新酶，比如使高活性的小亚基单功能过氧化氢酶产生血红素d与肽链侧链共价键，提高其稳定性，那将有很大的工业应用价值（详见下文）。目前没有将过氧化氢酶空间结构信息用于这些应用领域的报道。应用研究产生的突变酶的空间结构又能增进对血红素定向、侧链共价键和酶分子通道等理论问题的认识。在理论研究的深度上，除了继续探讨前述问题，还应结合酶的生理功能研究[73]，讨论酶在胞质溶液中的构象-功能关系问题；进一步解释为何不同酶的构象高度保守，但催化反应速率差别却很大[7]。

过氧化氢酶催化反应的性质要求酶既要高效催化分解 $H_2O_2$ ，同时又要抵御、耐受强氧化剂 $H_2O_2$ 和氧气对酶的伤害。过氧化氢酶在进化中成功地实现了酶高效催化与蛋白稳定的统一。单功能过氧化氢酶亚基N端相互作用主要提高了四聚体稳定性。而在催化中被氧化产生的血红素d和侧链间共价键则是化害为利，分别巧妙利用产物和底物的强氧化性，以部分结构被氧化为代价，获得了酶分子整体特别是活性中心的抗氧化性。这是生物在微观层次适应环境的典型。通道结构是决定过氧化氢酶催化的关键。过氧化氢酶并不是唯一具有通道结构的酶[79]。酶形成包含活性位点的通道构象以实现高效催化，这在生物界可能具有普遍性，可能是酶催化的基本模式之一。酶通道的研究在近年兴起，必将取得重要突破，深化人们对酶催化的认识。过氧化氢酶研究发现的新的现象以及提出的新概念深化了人们对生物大分子结构与功能复杂性的认识，为蛋白质工程和生物分子

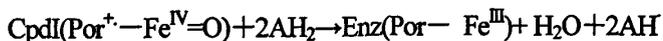
的人工设计提供了新思路。

### 1.1.3 过氧化氢-过氧化物酶 (Catalase-Peroxidase, CPX) 和锰过氧化氢酶

CPX 又被称为双功能过氧化氢酶, 即有过氧化氢酶和过氧化物酶两种酶的活性。它的过氧化物酶活性明显高于单功能过氧化氢酶的过氧化物酶活性。但是它在生物体内过氧化物酶的底物未知, 无法确定过氧化物酶活性的功能[4, 80]。

CPX 的过氧化氢酶活性明显大于过氧化物酶, 且过氧化氢酶催化机理和单功能过氧化氢酶相似。这主要是由于两类酶都含血红素作为活性中心[4]。CPX 和单功能过氧化氢酶一样不遵循米氏方程[80], 但 CPX 的许多性质不同于单功能过氧化氢酶, 其最适 pH 范围很窄, 易被连二亚硫酸钠还原, 活性不受 3-氨基三唑的抑制[19]。CPX 的蛋白序列和单功能过氧化氢酶相似度很低, 但和植物及真菌的第一类过氧化物酶 (如细胞色素 C 过氧化物酶) 有序列相似性, 而且结构也相似[1]。CPX 为同源二聚体或同源四聚体。CPX 亚基由两个序列和结构都相似的结构域组成: N-端结构域含有活性位点 (含血红素 b), 且保守性较高。C-端结构域在不同的 CPX 中序列变化大而且不结合血红素, 无催化活性。两个结构域主要由  $\alpha$  螺旋组成。可以进一步推测这两种结构域最初是同一基因编码, 后来基因多复制一次, 多出了一份拷贝。CPX 主要在原核生物中被发现, 但也有在真菌、原生动物和绿藻中存在的证据。序列已知的 CPX 约 300 种[81]。CPX 在进化中产生的时间尚不能确定[81], 基因水平转移的频率也很高。可以推测 CPX 通过基因水平转移从细菌进入真核生物中, 植物过氧化物酶就是从 CPX 进化而来的[1]。

催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解时, CPX 经历的两步反应与单功能过氧化氢酶相同。当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度较低并存在合适的有机电子供体时, CPX 的过氧化物酶活性将很明显。化合物 I 通过两次单电子反应氧化有机电子供体[4]:



CPX 亚基分子量在 80kD 左右。每个亚基由 20 个  $\alpha$  螺旋通过连接区相连构成,  $\beta$  折叠只有 3 到 4 段。这与单功能过氧化氢酶有很大差别[4]。亚基 C 端和 N 端各有 10 个  $\alpha$  螺旋, 这种假对称的构象在不同 CPX 中是保守的, 也证实了 CPX 的亚基是由一个基因复制后融合形成的。CPX 的血红素为 b 型, 比单功能过氧化氢酶的血红素位于蛋白的更深处。血红素

周围有六个保守残基（按mtCP氨基酸编码），Arg-104, Trp-107, 和His-108在“口袋”的远侧，而His-270, Trp-321, 和Asp-381在口袋的近侧。与过氧化氢酶相似，CPX也有一个漏斗状通道由表面通向血红素，但不是垂直而是从与血红素平面平行的方向靠近。要找到可能的底物结合位点并不容易，因为酶还有一个深的裂隙可能结合底物；另外仍有第二条通道通向靠近血红素的中央空穴。由于CPX的过氧化物酶天然底物未知，要解释这些结构的功能还是全凭猜测[4]。CPX亚基的C端结构域无催化活性，但缺失C端只有N端结构域的CPX虽然不改变二级结构，但过氧化氢酶和过氧化物酶两种活性都将失去[82]。C端结构域对于维持CPX血红素周围环境和催化活性是必不可少的。

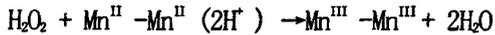
虽然来自嗜盐古菌的HmCpx有它的独特之处，即有许多 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Cl}^-$ 或 $\text{K}^+$ 稳定酶的结构，但是几种CPX有一个共性：活性位点Trp107（按mtCP氨基酸编码）的吲哚环和Met255的S原子通过Tyr229的苯环以共价键相连。这种侧链共价相连的独特结构既可以通过晶体X射线衍射电子密度图看出，也能通过质谱分析肽段证实。这一结构与过氧化氢酶活性密切相关[4]。若将Trp用Phe替换（这在植物过氧化物酶中很常见），则过氧化氢酶活性下降而过氧化物酶活性提高；将Tyr或Met换成其它氨基酸，同样是过氧化氢酶活性下降而过氧化物酶活性不变或提高。可以说Trp-Tyr-Met共价键对过氧化氢酶活性重要而与过氧化物酶活性无关。由此也可以解释为什么和CPX非常相似的植物过氧化物酶没有或仅有极小的过氧化氢酶活性。Trp被替代后，反应中间体化合物 I 出现积累。说明Trp不影响催化第一步即形成化合物 I，而是影响过氧化氢酶第二步反应——化合物 I 氧化过氧化氢。Trp的吲哚环与待还原的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 相互作用，维持形成过渡态中间体所需的键长。Trp-Tyr-Met共价键改变了吲哚环的电子分布，使它与底物相互作用能力提高，形成过渡态中间体更有利。但Met和Tyr具体的作用还要对缺失或取代Trp、Tyr、Met的突变体深入研究。Trp-Tyr-Met共价键是如何形成的？是发生在肽链合成后的修饰过程吗？更可能的是酶与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 接触时， $\text{H}_2\text{O}_2$ 氧化相应的氨基酸侧链产生共价键[4]。这有点类似于第二类单功能过氧化氢酶的血红素d的形成。

现在的过氧化物酶可能由CPX进化而来，Trp-Tyr-Met共价键断开使过氧化氢酶活性丧失而仅存过氧化物酶活性。这产生了一个问题：CPX的两种酶活性在进化中哪个先出

现？是原先的过氧化氢酶产生了过氧化物酶活性还是大亚基的过氧化物酶产生了过氧化氢酶活性？[4]

按BpKatG编码顺序，CPX的过氧化氢酶活性所需的保守残基有Trp111，Asp141，Asn142，Tyr238和Met264。利用它们可以产生过氧化氢酶活性缺失的突变体。突变体与植物过氧化物酶相比较，能够发现这两类酶的化合物 I 形成和过氧化反应的机理相似。

锰过氧化氢酶不含血红素，又称为假过氧化氢酶。酶的活性中心为双锰复合物，催化机理不同于含血红素的过氧化氢酶[4]。所以它的活性不受叠氮化物或氰化物的抑制。锰过氧化氢酶也不像含血红素的过氧化氢酶那样广泛存在。序列已知的酶有30多种，均来自原核生物[1]。系统发育学分析表明它在进化中出现的时间介于较早的单功能过氧化氢酶和较晚的CPX之间[1]。除个别例外，锰过氧化氢酶催化活性明显小于含血红素的过氧化氢酶。因此可以推断它在自然界分布不广的原因就是不如其它过氧化氢酶的活性高。它的催化机理也是两步反应[4]：



这两步反应不像血红素过氧化氢酶的两步反应，它们彼此没有时间顺序。

还有很多含血红素的蛋白，如氯过氧化物酶、植物过氧化物酶、肌红蛋白以及血红素本身都有低的过氧化氢酶活性，但通常不认为它们属于过氧化氢酶[1]。

#### 1.1.4 过氧化氢酶的应用

##### 1.1.4.1 处理含过氧化氢的废水

工业上对过氧化氢酶的需求是和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的大量使用密切相关的。目前各国相继禁止在纸浆和造纸工业上采用含氯漂白剂； $\text{H}_2\text{O}_2$  的氧化能力强于氯气和高锰酸钾，而且无毒无色无味。所以  $\text{H}_2\text{O}_2$  是比以前的化学试剂更理想的环境友好物质，漂白工艺已经向更为环保的  $\text{H}_2\text{O}_2$  漂白转变，因此  $\text{H}_2\text{O}_2$  用量逐年增加。这也意味着需要去除的  $\text{H}_2\text{O}_2$  随之增多。 $\text{H}_2\text{O}_2$  漂白废水的处理手段之一是用水稀释，但随之而来的是成本问题和产生更多的废水。另一个废水处理的方法是化学还原法，即用  $\text{SO}_2$  和亚硫酸氢钠去除漂白后的  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。但其产生的有害残余物又抵消了使用  $\text{H}_2\text{O}_2$  的环境效益。与冲洗法和化

学还原法相比,过氧化氢酶既能彻底除去  $H_2O_2$  又不产生副产物,而且有极高的催化效率,所以过氧化氢酶制剂在工业上有很大的应用价值。美国能源部爱达荷国家工程和环境实验室的研究人员从黄石国家公园的嗜热细菌中分离出超稳定过氧化氢酶[20],这一成果被 R&D 杂志评为 2004 年 100 个最显著的技术成果之一。

具体应用中,过氧化氢酶既可以用于含  $H_2O_2$  的废水处理,也可以用于  $H_2O_2$  处理之后的产品的残留  $H_2O_2$  的去除。如棉针织物氧漂染色工艺中采用过氧化氢酶生物除氧(即除  $H_2O_2$ )。过氧化氢酶在棉织物前处理过程中去除织物漂白废液中残余的  $H_2O_2$ ,以免给后续染色工序带来问题。应用过氧化氢酶实现漂染同浴,不仅能节省大量的水、电、气和人工,大幅度降低成本,提高生产效率,还能减少废水的排放,有利于环保。陈祥勤等(1997)、范梅等(2000)、张瑞萍(2000)、何照兴等(2001)、王天森(2001)等、吴学君等(2002)和冷晒祥等(2006)研究了过氧化氢酶在棉针织物漂染工艺中的应用,认为采用酶除氧代替传统的高温水洗除氧,对织物的强力无损伤[83-89]。徐刚(2005)研究了过氧化氢酶在染纱生产中的应用,认为在染纱前处理后的水洗过程中使用过氧化氢酶去除  $H_2O_2$ ,可节约生产成本约 127000 元/t 纱,提高设备利用率 3%,且不会影响纱线的强力和染色效果[90]。董颀等(2006)也取得了相似的结果[91]。巴西 Amorim 等(2002)研究了过氧化氢酶在棉织物漂染工艺中的应用,获得了和国内研究者相同的结果[92]。对埃及的一个纺织厂调查显示,使用过氧化氢酶可以在许多方面实现节约:能量节省 24%,化学药品成本节省 83%,用水量节省一半,工艺流程省时 33%[93]。奥地利 Paar 等(2001)、Fruhirth 等(2002),葡萄牙 Costa 等(2001)研究固定化过氧化氢酶处理印染废水使之循环使用,Paar 等(2003)还研究了固定化产过氧化氢酶的细菌细胞处理印染废水[94-97]。除去  $H_2O_2$  的漂白水循环使用与以前用淡水的工艺相比,染色后织物的色泽差异很小(视觉上无差异)。软木处理工艺中也使用  $H_2O_2$  漂白软木塞,然后再用过氧化氢酶除去  $H_2O_2$  [93]。韩国 Oh 等(2002)用来自微球菌属的过氧化氢酶处理含  $H_2O_2$  的半导体工业废水,发现酶稳定剂和消泡剂都不影响  $H_2O_2$  降解[98]。韩国 Yoon 等(2007)用壳聚糖固定商品过氧化氢酶 Terminox® Ultra 并用硅酸二甲酯处理,得到的固定化酶能在反应器中高效连续催化 24h[99]。

#### 1.1.4.2 食品工业上的应用

食品中使用的过氧化氢酶主要来自黑曲霉、藤黄微球菌和牛肝[100]。过氧化氢酶可以与葡萄糖氧化酶制剂联合使用除去食品中的氧，起到保鲜的效果。葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4) 催化的化学反应方程式为  $\beta$ -D-葡萄糖+O<sub>2</sub>→葡萄糖酸+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。过氧化氢酶催化反应： $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ，总反应为  $2\beta$ -D-葡萄糖+O<sub>2</sub>→2 葡萄糖酸[93]。过氧化氢酶催化的中间反应产生的氧还有杀菌和漂白作用。这两种酶已经用于蛋粉、茶叶、奶粉、冰淇淋、啤酒、葡萄酒、清酒、果汁、鱼虾和罐头等食品的脱氧保鲜[101]。

在牛奶保存和奶酪制造前用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对牛乳和干酪原料乳进行杀菌消毒，然后再用过氧化氢酶去除残余 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。Tarhan (1995) 用 DEAE 纤维素固定化过氧化氢酶处理牛奶中的残留 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 取得理想的结果[102]。范孝用等 (1999) 研究了葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶体系在牛奶保鲜中的应用，认为这个体系制成的保鲜酶制剂能使消毒的牛乳常温下保存一周质量不变，保鲜效果显著[103]。固定化过氧化氢酶技术保鲜奶制品的方法已被世界粮农组织和世界卫生组织批准，并确认不会对健康带来任何危害[101]。过氧化氢酶也是牛乳质量检测指标[101]。

#### 1.1.4.3 其他相关应用

纤维板生产中，用过氧化物酶和过氧化氢酶预处理木材碎片，再压制可以得到稳定性能接近中等质量的纤维板[93]。利用过氧化氢酶分解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 放出 O<sub>2</sub> 的性质，可以将其和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为发泡剂用于橡胶成型、塑料及多泡性粘合剂[104]。过氧化氢酶在生物界广泛分布，多种环境因子（紫外光、二氧化硫、氮氧化物、氨和重金属等）对生物代谢的影响可以通过体内过氧化氢酶表现出来。又由于过氧化氢酶活性易于定性或定量地测出，所以它可以用于环境生物学监测[105]。过氧化氢酶检测也是微生物分类鉴定的常规指标[106]。过氧化氢酶还可以用于医学诊断检测 [107]，可以标记免疫反应检测抗原或抗体[101]。过氧化氢酶作为公认的抗氧化酶，在医学上还有很大的应用潜力。土耳其 Alacam 等 (2000) 利用明胶作为载体将过氧化氢酶用于促进牙髓组织愈合，效果很显著[108]。在头孢菌素(cephalosporin)工业生产中，戊二酰基-7-氨基头孢烷酸(Glutaryl-7-ACA)是重要的中间体。在利用酵母 *Trigonopsis variabilis* 细胞破碎液中

的 D-氨基酸氧化酶生物合成 Glutaryl-7-ACA 的反应中,过氧化氢酶干扰生物转化[26]。而在利用乳酸氧化酶氧化乳酸生产丙酮酸的工艺中,过氧化氢酶是促进因素[109]。

Shi Xunlong 等构建了分泌表达芽孢杆菌过氧化氢酶的 *Bacillus subtilis* 重组菌株,用于大规模制备过氧化氢酶[110]。海洋中微生物资源丰富,长期以来研究关注较少。开发海洋微生物资源,寻找新型酶是应用生物技术研究的前沿。Lorentzen 等纯化了海洋细菌 *V. salmonicida* 的高活性过氧化氢酶,但未进行应用研究[22]。国内也没有海洋微生物过氧化氢酶方面的基础与应用研究报道。

## 1.2 低温生物与低温酶研究进展

地球上大多数生态系统处于永久的低温(小于 5°C)环境[111],如高山(alpine)和两极地区的陆地与水环境、海洋(尤其 1000 m 以下的深海)、浅层地下区域(如洞穴)、大气圈上部以及寒冷地区动植物体内与体表,这些环境面积超过地球表面积四分之三[111]。在这些寒冷环境中生存着大量低温微生物,如一种来自阿拉斯加海冰的杆菌能在 -12°C 生长[112]。我们周围还存在着许多人造低温环境,如冷库、冰箱等,生存于其中的低温微生物与人类的日常生活和健康密切相关。

低温微生物种类繁多,在已经了解的低温微生物中,细菌种类最多。革兰氏阴性菌的代表属包括 *Pseudoalteromonas*、*Moraxella*、*Psychrobacter*、*Polaromonas*、*Psychroflexus*、*Polaribacter*、*Moritella*、*Vibrio* 和 *Pseudomonas* 等。革兰氏阳性菌有 *Arthrobacter*、*Bacillus* 和 *Micrococcus* 等。此外还有古菌,如 *Methanogenium*、*Methanococcoides* 和 *Halorubrum*。低温环境中的真核微生物包括真菌(*Candida*、*Cryptococcus*、*Penicillium* 和 *Cladosporium* 等)和微藻(*Chloromonas*)等[111]。这些嗜冷菌包括自养菌(光合自养型和非光合自养型)和异养菌,好氧菌和厌氧菌。

Morita 将那些最适生长温度  $\leq 15^{\circ}\text{C}$ , 上限生长温度  $\leq 20^{\circ}\text{C}$  的微生物称为嗜冷微生物(psychrophilic microorganisms)[113]。根据嗜冷菌生长温度范围,可以将狭温性嗜冷菌称为专性嗜冷菌,将广温性嗜冷菌称为兼性嗜冷菌(psychrotrophs)或耐冷菌。Feller 等不赞成 Morita 的标准,他们认为温度的限定标准是主观确定的,而且这一标准不适用于多数真核生物;最重要的是,用生长速率的标准定义最适生长温度,不能如实地

反映微生物的生长状态[111]。基于类似的原因, Cavicchioli 也反对用上限生长温度判定嗜冷菌[114]。嗜冷菌的定义仍需要进一步完善。本论文不区分低温菌(微生物)与嗜冷菌, 低温酶(cold-adapted enzymes)与嗜冷酶这两组概念。

### 1.2.1 低温生物适应低温的机理

低温微生物与能度过短暂的寒冷时期的微生物(如大肠杆菌)不同, 它们永久地生存于低温环境中, 细胞有一套机制使膜结构、胞内溶质、核酸和蛋白质等所有细胞成分以及复制、转录和翻译等基本生命代谢活动适应低温。只有各个细胞组分的协同作用才能使低温微生物适应低温环境。

#### 1.2.1.1 细胞膜

为维持生命活动正常进行, 细胞膜必须有适当的流动性, 即维持有活性的液晶状态; 而低温会使其转变为失活的凝胶状态, 转变温度主要由膜磷脂的成分决定, 尤其是脂肪酸酰基链的成分。因此低温微生物必须有合适的磷脂构成成分以维持在环境温度下细胞膜流动性。适应机制主要是磷脂分子上存在空间限制, 以降低膜酰基链紧密结合的程度, 这种空间限制使膜不稳定且粘度降低。一个典型的例子是存在顺式不饱和双键使脂肪酸碳链出现 $30^\circ$  弯曲, 这就使膜磷脂中出现空穴, 干扰了紧密结合的程度。反式不饱和双键也有类似效果但作用明显不如顺式[111]。多不饱和脂肪酸对于维持低温下膜的流动性意义最大, 研究也最多[114, 115]。低温微生物的膜磷脂酰基链中有含量较高的短链脂肪酸, 它能减少相邻链间的接触并增加膜流动性[111]; 还有含量较高的分支(anteiso-甲基较多, iso-甲基较少[116])的脂肪酸, 其侧链干扰相邻磷脂主链之间紧密性。

#### 1.2.1.2 tRNA、蛋白质合成与分解

对两种南极古菌的基因组研究表明: 低温下 tRNA 的灵活性主要通过转录后修饰来实现, 而不是 GC 含量的变化[117]。嗜冷菌 tRNA 转录后被修饰的程度较低, 而这些修饰仅是维持 tRNA 的基本结构。与之相比, 嗜热菌修饰程度高, tRNA 的稳定性也高。嗜冷菌 tRNA 转录后修饰过程中增加了二氢尿嘧啶数目, 这有助于 tRNA 局部构象有较好的柔性以及动力学上较好的流动性[118]。低温生物中涉及蛋白质合成的酶尚未深入研究。低温增强 DNA 双螺旋和超螺旋结构的稳定性, 妨碍解螺旋和 RNA 聚合酶结合;

低温还使可能干扰翻译过程的 RNA 二级结构更易形成。因此，推断能消除这些不利因素的核酸结合蛋白在低温适应方面起重要作用[111]。

#### 1.2.1.3 冷激蛋白、抗冻蛋白与冷适应蛋白

温度突然降低时微生物会发生冷激反应 (cold-shock response)，诱导冷激蛋白 (cold-shock protein, Csp) 合成，它们是一类小分子量 (7.8kD) 的酸性核酸结合蛋白，能调节细胞蛋白合成，特别是转录水平调节[119]。低温微生物持家基因 (housekeeping gene) 产物的合成不受冷激反应的抑制[120]。冷适应蛋白 (cold-acclimation proteins, CAPs) 普遍存在于低温微生物中。当低温菌低温下稳定生长时，CAPs 不断被合成。有人提出 CAPs 对于低温下微生物生长及细胞周期的维持是必不可少的，但人们对 CAPs 的功能仍知之甚少[121]。许多低温微生物中存在抗冻蛋白。它们是大小不等的多肽(有的有糖基)，它们结合到正在形成的冰晶上，阻止冰晶继续生长，从而降低细胞内水的凝固点。所有抗冻分子 (antifreeze molecule) 的关键特征在于冰晶和冰结合蛋白 (ice-binding protein) 表面之间的互补性[111]。

#### 1.2.1.4 细胞质与胞外多糖

在低温下，单细胞生物的细胞内外温度相差很小。如没有其他化合物进一步降低其冰点，则可能严重影响正常生命活动，甚至导致细胞质处于冰冻状态。除了上述的抗冻蛋白，细胞内可溶性糖和多元醇（如海藻糖、甘油和甘露醇）是常见的保护性溶质。它们一方面可降低细胞质的冰点，另一方面能减少冷冻时因维持渗透压平衡而造成的细胞脱水，从而减轻冷冻对细胞的伤害[121]。分泌胞外多糖对于微生物在结冰的环境中生存也很重要。低温海洋细菌分泌的胞外多糖以可溶或与细胞结合两种方式存在，常由三到四种单糖组成，富含糖醛酸。这些多糖凝胶含水量达 99%，构成了细胞的物理和化学环境，也是细胞的冷冻保护剂，游离形式的多糖能降低海水的冰点。多糖为分泌到胞外的低温酶提供了保护层，使之不受冷变性的影响[122]。

#### 1.2.2 低温酶 (cold-adapted enzyme, psychrophilic enzyme)

低温极大地降低化学反应速率，低温微生物如何维持重要生化反应正常进行？在低温下保持正常活性的酶是确保低温微生物正常代谢的关键。催化重要反应的低温酶

是低温微生物适应低温机理研究的重要内容。因此将低温酶作为一节单独论述。Feller 等 (1996) 提出低温酶具有三个特征: 1. 酶活性的最适温度低于同源的中温酶; 2. 在 0 至 30 °C 范围内酶的转换数 ( $k_{cat}$ ) 或催化效率 ( $k_{cat} / K_m$ ) 高于同源的中温酶; 3. 在室温条件下 (25°C) 酶的热稳定性比中温酶低 [123]。近年来的低温酶方面的综述文章却都没有明确地给出低温酶的定义, 只是对低温酶的许多特征进行概括 [111, 120, 122, 124, 125]。这可能是由于近年来随着研究深入, 研究者发现早期的定义或对低温酶特征的概括并不全面, 目前还不能从本质上对低温酶的普遍特征总结归纳。

根据阿仑尼乌斯公式  $k_{cat} = Ae^{-E_a/RT}$ , 某一酶催化反应的温度 T 和活化能  $E_a$  对酶反应速率即酶转换数  $k_{cat}$  都有很大的影响。 $E_a$  数值越低, 则指数项越接近于零, 酶反应速率受温度的影响程度就越低。所以较低的活化能是低温酶克服低温不利影响, 保持高速催化能力的主要原因。一般地, 低温酶活化能低于同源的中温酶和高温酶, 在低温下低温酶催化速率是同源中温酶和高温酶的许多倍 [126]。低温酶  $k_{cat}$  高和活化能低这两种现象也可以从热力学角度分析。低温酶催化反应的酶-底物复合物从基态到活化状态的吉布斯自由能的变化即  $\Delta G^\ddagger$  值比同源的中温酶低, 表明它在低温下活性高 ( $k_{cat}$  高); 这一过程焓的变化即  $\Delta H^\ddagger$  比同源的中温酶也低, 表明它对温度的依赖性较低 (活化能低), 这是低温酶首要的动力学适应因素 [111]。

低温酶活化能较低和  $k_{cat}$  增加的原因是, 酶空间构象上柔顺性 (flexibility) 的增加, 主要表现为低温酶活性位点构成的空腔更大且更容易让底物基团接近。就构象变化而言, 低温酶能以较低的能量消耗接纳底物, 从而减少了形成酶-底物复合物的活化能。同时大的活性位点使产物释放得更快, 这会减轻限速步骤对反应速率的影响 [127]。大的活性位点和更好的可接近性使底物与结合位点结合力不强, 酶与底物的亲和力降低,  $K_m$  较高 [127], 可以认为  $k_{cat}$  的增加是以  $K_m$  的增加为代价的。酶催化效率一般以专一性常数  $k_{cat}/K_m$  来衡量。大多数低温酶同时增加  $k_{cat}$  和  $K_m$ , 最终酶的催化效率也增加了。与中温的同源蛋白相比, 这类低温酶并没有独特的不同寻常的构象; 其总体构象与中温的同源蛋白十分接近。低温酶所有活性侧链和大多数朝向催化中心的侧链都是严格保守的, 也就是说低温酶的总的催化机制和反应途径与中温同源蛋白相同 [127]。

少数酶和上述低温酶的适应低温的机理不同，它们催化反应活化能接近零（不论低温酶还是同源的中温酶）， $e^{-E_a/RT}$  数值接近 1，反应速率几乎不受温度影响，催化的反应称为非温度依赖型 (temperature-independent) 反应，如小亚基单功能过氧化氢酶 [120]。

大多数低温酶牺牲稳定性，换取低温下的高活性 [124, 128]，但突变实验和化学修饰研究也发现许多酶能在保持稳定性的同时提高低温催化速率，或是在保持低温催化能力的同时提高热稳定性。低温酶的催化结构域表现出柔顺性而非催化结构域保持和中温同源蛋白相似的稳定性。低温酶热稳定差的原因是活性位点要求有高柔顺性，而不是缺少要求稳定的选择压力。 [124]

低温酶柔顺性提高在空间结构上的表现，除上述的活性位点的可及性增加之外，还包括 [124, 128]：离子对、氢键、二硫键和疏水作用数目的减少；亚基间相互作用减少；酶与溶剂相互作用增加；蛋白核心疏水性减少；更多的非极性残基与溶剂接触（表面疏水性增加）；辅因子结合力减弱；金属结合位点减少或结合力减弱；更多或更长的环 (loop)；环内脯氨酸减少而  $\alpha$  螺旋中脯氨酸增加；甲硫氨酸、组氨酸和甘氨酸（簇）增加；异亮氨酸减少；总带电残基减少；精氨酸与赖氨酸比例降低；酸性氨基酸（谷氨酸和天冬氨酸）与碱性氨基酸（赖氨酸和精氨酸）比例提高。但是没有哪一种结构特征存在于所有的低温酶中，也没有哪一种特征总与低温适应性相关 [129]。

### 1.2.3 研究意义与应用潜力

低温微生物是重要的微生物和基因资源。了解低温酶的耐低温机制不仅丰富和加深了人们对酶作用机理的认识，也为蛋白质工程改造天然酶提供理论依据。低温微生物学和星际生物学 (astrobiology, exobiology) 研究关系密切，对低温微生物的逐步深入的研究将为探索星际生命开辟道路 [111, 116]。低温微生物研究是生物多样性研究的重要内容，也具有生物技术应用潜力。低温酶在洗涤剂、食品、有机合成、分子生物学、制药、纺织、生物传感器和环境技术领域有广阔的应用前景 [111, 116]。在农业领域低温微生物可以增加寒冷地区豆类产量、控制植物病害和保护植物免受霜冻损伤。低温微生物可以降解石油污染物，处理工业废水和参与生物浸出 (bioleaching) [116]。

### 1.2.4 低温过氧化氢酶

低温过氧化氢酶是好氧低温生物代谢必需的抗氧化酶。海洋中广泛存在低温环境，低温过氧化氢酶研究对于认识海洋微生物在低温下有氧代谢活动规律有重要意义。低温条件下氧气溶解度增大，氧浓度提高使低温微生物更容易受到活性氧的影响。低温生物要保护自身免受活性氧损伤，就要有低温过氧化氢酶[116, 128]。在完成基因组测序的两株低温细菌 *Desulfotalea psychrophila* 和 *Colwellia psychrerythraea* 中都有过氧化氢酶基因[128]。已经有来自两种弧菌的低温过氧化氢酶被纯化并完成了性质研究，它们表现出了过氧化氢酶的一般性质[21, 22]，但还表现出较高的低温下的  $K_m$  和较高的高温反应速率，这都不符合低温酶的一般规律。国内尚无低温过氧化氢酶报道。

### 1.3 海洋细菌分类系统学及多样性研究进展

细菌分类(bacterial taxonomy)包括分类(classification)，命名(nomenclature)和鉴定(identification)，并且反映出系统进化关系[129]。海洋细菌与非海洋细菌的分类学与系统学研究遵循的原理和使用的方法都完全一致，都是多相分类(polyphasic taxonomy)，即综合运用不同层次的生物学信息（从分子水平到生态水平）确定细菌的分类学位置。比如芽孢菌纲(Class Bacilli)细菌分类鉴定主要需要以下三类实验：

形态和生理生化常规检测：革兰氏染色与KOH检测；菌体形态；芽孢形态以及生成条件；鞭毛与运动性；菌落形态；温度、盐度和pH的生长范围与最适范围；唯一碳源与氮源利用；有机分子的同化能力；利用糖醇产酸产气；氧需求；抗生素抗性；水解酶。

DNA水平上的分类鉴定：16S rDNA全序列测序（1400 bp以上），从公共核酸数据库中获得高相似的模式菌株的16S rDNA序列，以不同算法构建系统发育树。也可以使用 *gyrB*基因按上述方法构建进化树。HPLC法测DNA碱基组成（G+C含量）。待测菌和其关系最近（16S rDNA相似性大于97%）的标准菌株DNA杂交。基因组大小(genome size)。

化学分类：全细胞蛋白 SDS-PAGE。气相色谱测定细胞脂肪酸甲酯即脂肪酸类型。微晶纤维素薄层层析测定细胞壁肽聚糖氨基酸种类和糖的种类。HPLC 测定细胞膜甲基萘醌种类。硅胶双向薄层层析测定磷脂的种类。化学分类法也可以用质谱完成。

估计海洋中原核细胞总数为  $4.4 \times 10^{28}$ ，其中细菌占 70%以上[130]。2007 年 1 月到 2008 年 4 月在 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 上发表

的细菌的新种,约 28%来自海洋。其中绝大多数属于变形细菌门(Proteobacteria)、放线杆菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。它们是传统上物种最多,研究最清楚的类群,也是海洋细菌的主要门类(暂不包括蓝细菌)。其余 21 个“可培养”的门中半数以上的门含有海洋种,其中来自海底热液喷口(hydrothermal vent)附近的细菌包括产液菌门(Aquificae)[131]、热袍菌门(Thermotogae)[132]、热脱硫杆菌门(Thermodesulfobacteria)[133]、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)[134]和脱铁杆菌门(Deferribacteres)[135]等。其他如支原体门(Tenericutes)[136]、粘球菌门(Lentisphaerae)[137]、浮霉状菌门(Planctomycetes)[138]和疣微菌门(Verrucomicrobia)[139]也有报道来自海洋的新种。运用非培养方法研究细菌多样性可以发现海洋中还有许多门类的细菌,如绿屈挠菌门(Chloroflexi)、出芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、硝化螺菌门(Nitrospira)和螺旋体门(Spirochaetes)[140, 141];还有尚无可培养物种的候选门(candidate phylum),如 Marine Group A, Poribacteria, ABY1, Guaymas1, NKB19 等[139, 140]。所以今后仍会有众多海洋细菌新种新类群被发现。南极动植物种类较少,但却有大量的原核生物,低温微生物资源丰富[142]。对南极海水细菌的研究表明南极海洋浮游细菌多样性可以和其他海区相比,细菌类群主要包括变形细菌、拟杆菌、放线菌、厚壁菌和疣微菌等,其中  $\gamma$  变形细菌、 $\alpha$  变形细菌和拟杆菌是种类和数量占优势的类群[143]。

#### 1.4 本论文总体思路、解决的问题和意义

本论文以寻找低温过氧化氢酶为最初目的,从南极海水中寻找过氧化氢酶活性较高的菌株并筛选到活性最高的 N2a 菌株。经鉴定, N2a 为芽孢杆菌 (*Bacillus*)。同时探讨了过氧化氢酶对南极表层海水细菌的生理意义。研究中发现 *Bacillus* 属及相关属的系统学存在许多问题。因此构建了 180 多种细菌的 16S rRNA 基因的系统发生树,以此阐明 *Bacillus* 属及相关细菌的进化关系并将其划分为 9 个类群。在对细菌研究的基础上,纯化了 N2a 的低温过氧化氢酶 BNC,研究其酶学性质并同其他过氧化氢酶广泛比较,揭示了低温过氧化氢酶的特殊性。这些理论研究为应用研究奠定了基础。

## 2 南极海水中高过氧化氢酶活性菌株的筛选与鉴定

南极大气层中的臭氧层“空洞”使南极地区海水表层受到强烈的紫外线辐射，这导致表层海水中  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度可达  $1.45 \mu\text{mol/L}$  [144]。生活在含高过氧化氢的表层海水中的细菌面临氧化胁迫，可以推测这些细菌只有具备较高活性的过氧化氢酶才能维持代谢活动正常进行。Hernandez 报道南极海水细菌在  $50 \mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的条件下仍能正常生长[145]，说明南极海水中存在高过氧化氢酶活性的菌种，但目前尚无高过氧化氢酶活性菌株的直接报道。本章的实验是从南极海水中分离出高过氧化氢酶活性的菌株并对其分类鉴定。

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 细菌分离

样品：南极中山站附近表层海水样品 ( $65^\circ 30.0' \text{ S}$ ,  $71^\circ 45.7' \text{ E}$ )。基础海水培养基：5 g 蛋白胨和 1 g 酵母膏溶于 1L 海水，调 pH 7.5， $121^\circ \text{C}$  灭菌 20 min。倒平板之前加入过氧化氢使终浓度为  $1.45 \mu\text{mol/L}$ 。取  $4^\circ \text{C}$  保存的海水样品直接涂布到海水平板上，每个平板加入 200  $\mu\text{L}$  海水，共涂布 10 个平板。 $15^\circ \text{C}$  培养 10 天。长出的单菌落划斜面保藏。

#### 2.1.2 高过氧化氢酶活性菌株筛选

初筛使用硫代硫酸钠滴定法[146]：斜面菌株接入 250 mL 摇瓶（含 20 mL 基础海水培养基）。200 rpm， $20^\circ \text{C}$  培养 24 h。取 15 mL 发酵液，微波炉高火 2 min，灭活作空白对照。两个小烧杯中各加 5 mL 20 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ （10 mL 10 mmol/L pH 6.8 磷酸盐缓冲液中加入 25  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ）， $25^\circ \text{C}$  水浴 3 min，再分别加入待测和失活发酵液各 1 mL， $25^\circ \text{C}$  保温 30 s 后立即加入 2 mL 1 mol/L 硫酸中止反应，再各加入 0.5 mL 10% 碘化钾、1 滴 1% 钼酸铵，放置 3 min 后，用 0.010 mol/L 硫代硫酸钠滴定至无色。记录两个烧杯各用去硫代硫酸钠的体积 ( $V_{\text{空}}$ 、 $V_{\text{样}}$ )。将  $25^\circ \text{C}$  每分钟消耗  $1 \mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的酶量定义为一个活力单位。反应方程式： $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{I}^- \rightarrow \text{I}_2 + 2\text{OH}^-$ ， $\text{I}_2 + 2\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow 2\text{I}^- + \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ，总反应： $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{S}_4\text{O}_6^{2-} + 2\text{OH}^-$ ，每 mL 发酵液所含活力单位数 ( $\text{U/mL}$ ) =  $2 \times 0.5 \times 0.01 \times (V_{\text{空}} - V_{\text{样}}) \times 10^{-3} \times 10^6 = 10 \times (V_{\text{空}} - V_{\text{样}})$ 。以

*Micrococcus lentus* (购自 Sigma) 为参照, 筛选活力与 *M. luteus* 相近或更高的菌株。

复筛时使用紫外分光光度法(上海精科 752N 紫外可见分光光度计)测定过氧化氢酶活性[147]。摇瓶培养的发酵液离心收菌体, 以 pH 7.5, 50 mmol/L Tris-Cl 缓冲液重悬菌体并在冰浴中超声破碎(Sonics VCF1500 超声破碎仪), 离心后取上清。测无菌体的发酵液和破碎后上清的活性和蛋白。每个样品测活 3 至 4 次。酶活性以  $H_2O_2$  在 240 nm 处分解速率, 即  $A_{240nm}$  下降速率计算。反应体系为 50 mmol/L pH 7 磷酸盐的钾盐缓冲液,  $H_2O_2$  浓度 20 mmol/L。取一定量样品(一般不超过 200  $\mu$ L) 加到 1 mL 磷酸盐缓冲液中, 在比色杯中混匀, 再迅速加入以磷酸盐缓冲液配制的 40 mmol/L 的  $H_2O_2$  1 mL 起始反应。每次测活时, 隔 3 s 记录一次  $A_{240nm}$  数据, 以时间(x)对吸光度(y)作图, 直线回归计算出斜率即反应速率, 取前 30 s 之内线性关系好的反应速率。 $H_2O_2$  摩尔吸光系数为  $43.6 (\text{mol/L})^{-1}\text{cm}^{-1}$ [21]。酶活力单位定义同初筛。每 mL 发酵液所含活力单位数 (U/mL) =  $\Delta OD / \Delta t \div 43.6 \times 10^6 \times \text{反应体系的体积 (L)} \times 60 \div \text{待测样品体积 (mL)}$ 。以 *M. lentus* 和 *E. coli* 为对照筛选高活性菌株。

蛋白含量测定采用 Bradford 法 [148]。染色液配制方法: 向 0.02g 考马斯亮蓝 G250 (购自 USB 公司) 中加入 10 mL 无水乙醇, 溶解后再加 20 mL 磷酸, 再用蒸馏水定容至 200 mL, 滤纸过滤, 低温避光保存。配制 0, 25, 50, 75, 100, 125 和 150  $\mu$ g/mL 共 7 种浓度的牛血清白蛋白(BSA)水溶液。7 种浓度的 BSA 各取 200  $\mu$ L, 分别加入 2 mL 考马斯亮蓝染液, 混匀后静置 5min, 以 200  $\mu$ L 蒸馏水与 2 mL 染液的混合物为空白参照, 测定不同浓度 BSA 的  $A_{595nm}$  数据。制成标准曲线。同样方法测出样品的  $A_{595nm}$ , 通过查标准曲线计算蛋白浓度。

## 2. 1. 3 菌种鉴定

### 2. 1. 3. 1 细菌形态与生理生化特征

主要根据《普通细菌学方法手册》[149]和《常见细菌系统鉴定手册》[106]的方法。如无说明, 细菌培养温度为 25  $^{\circ}$ C, 所有实验均设空白对照。

人工海水[149]:  $NH_4NO_3$  0.002 g,  $H_3BO_3$  0.027 g,  $CaCl_2$  1.14 g,  $FePO_4$  0.001 g,  $MgCl_2$  5.143 g, KBr 0.1 g, KCl 0.69 g,  $NaHCO_3$  0.2 g, NaCl 24.32 g, NaF 0.003 g,  $Na_2SiO_3$

0.002 g,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  4.06 g,  $\text{SrCl}_2$  0.026 g, 蒸馏水 1000 mL。

糖醇氧化发酵使用 Leifson MOF 培养基 (有改动) [149]: 蛋白胨 1 g, 酵母膏 0.1 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g, Tris 0.5 g, 酚红 0.01 g, 琼脂 3 g, 人工海水 500 mL, 蒸馏水 500 mL。以蒸馏水溶解各成分, 调 pH 7.5, 高压灭菌。人工海水单独高压灭菌。冷却至 50 °C, 无菌操作混合两种溶液, 再以过滤灭菌方式加入 20% (w/v) 糖或醇溶液, 使终浓度达 1%。无菌操作分装 2.5 mL 体积到试管。将半固体培养基沸水浴几分钟后迅速冷却, 立即直针穿刺接种。其中一支试管接种后加入无菌凡士林石蜡油 (体积比 2: 1) 覆盖至 1 cm 高度。穿刺线上有生长且沿穿刺线变黄说明细菌利用糖或醇产酸, 培养基中出现气泡说明细菌产气。

Hutner 无机盐基础培养基 (有改动) [149]: 无机盐溶液:  $\text{MgCl}_2$  14.45 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.335 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.099 g,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.00925 g, 贮备盐溶液 (见下) 50 mL, 蒸馏水 950 mL, 调 pH 6.8。贮备盐溶液: EDTA 2.5 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10.95 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.54 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.392 g,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.177 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.203 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.01364 g, 蒸馏水 1000 mL, 几滴浓硫酸。

唯一碳源试验使用无机物基础琼脂培养基 [149]: 40 mL 1 mol/L pH6.8  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液, 20 mL Hutner 无机盐基础培养基, 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 g 琼脂, 940 mL 蒸馏水, 碳源 2 g, 倒平板。以 pH 7 的磷酸盐缓冲液重悬的菌体接种涂布, 培养 10 天, 有生长为阳性。

甲基红与 V-P 试验 [149]: MRVP 肉汤: 7 g 蛋白胨, 5 g 葡萄糖, 5 g NaCl, 1000 mL 蒸馏水。调 pH 7, 分装 5 mL 试管, 121 °C 灭菌 15 min。接菌后 30 °C 培养 7 天以上。甲基红试验: 加 6 滴 0.02% 甲基红的 60% 乙醇溶液, 显亮红色为阳性 (pH 4.2 以下), 黄色或橙色为阴性, 橘红色为弱阳性。V-P 反应: 取 1 mL 培养物, 加入 0.6 mL 5%  $\alpha$ -萘酚的乙醇溶液, 混匀后加 0.2 mL 40% NaOH, 混匀后倾斜放置 60 min。阳性: 从培养基表面开始出现深红色。

柠檬酸盐利用 [149]: Christensen 柠檬酸盐琼脂: 柠檬酸钠 3 g, 柠檬酸铁铵 0.4 g, 葡萄糖 0.2 g, 酵母膏 0.5 g, 半胱氨酸 0.1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g, NaCl 5 g, 硫代硫酸钠 0.08

g, 酚红 0.012 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL。调 pH 6.7。接菌后培养 7 天以上, 阳性: 红色。

碱性磷酸酯酶[149]: 以 40 mmol/L pH 10.5 甘氨酸-NaOH 缓冲液配 10 mmol/L 对硝基苯磷酸二钠 (p-NPP) 溶液。用 0.9% NaCl 溶液配浓菌悬液, 再将菌悬液与 p-NPP 溶液 1: 1 混匀置 37°C 6 h。阳性: 黄色。

RNA 酶[149]: 将 RNA 溶于水中, 加 1 mol/L NaOH 促溶, 但 pH 不超过 5。再将 RNA 溶液加入海水琼脂使 RNA 浓度达 0.2%, 121 °C 灭菌 15 min, 倒平板。划线培养后用 1 mol/L HCl 淹没平板菌落。阳性: 菌落周围出现透明圈。

硫化氢生成试验[149]: 培养基 0.25 g 柠檬酸铁铵, 0.3 g 硫代硫酸钠, 10 g 蛋白胨, 5 g NaCl, 15 g 琼脂, 1000 mL 蒸馏水, 调 pH 7, 分装试管。112 °C 灭菌 20 min。穿刺接种培养。阳性: 培养基变黑。

革兰氏染色使用 24 h 的人工海水平板菌落[106], 以 *Staphylococcus aureus* 为阳性对照, 以 *E. coli* 为阴性对照; 运动性和芽孢采用直接镜检[106]。生长温度、盐度和 pH 的测定使用基础人工海水培养基。氧化酶测定使用专用试纸。

酒石酸盐利用[106]: 培养基: 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 0.2% (w/v) 溴百里酚蓝 12.5 mL, 酒石酸钾钠 10 g, 蒸馏水 1000 mL, 调 pH 7.4, 分装试管, 115 °C 灭菌 20 min。接种后培养 14 天, 加入等体积饱和醋酸铅。阳性: 绿黄色, 少量沉淀; 阴性: 蓝色或绿色, 大量沉淀。

肉汁胨培养基[106]: 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 牛肉膏 3 g, 自来水 1000 mL。调 pH 7.6。淀粉水解[106]: 可溶性淀粉加入肉汁胨琼脂培养基达 0.2%, 灭菌后倒平板接种后培养 5 天, 加入碘液 (0.33% I<sub>2</sub>-0.67% KI)。阳性: 菌落周围有不变色的透明圈。

纤维素分解[106]: 蛋白胨 5 g, NaCl 5 g, 自来水 1000 mL。调 pH 7。分装 3 mL 到试管, 放入 0.8 cm×6 cm 滤纸, 121 °C 灭菌 15 min, 接菌培养 4 周。阳性: 滤纸折断、变薄或变成一团纤维。

3-酮基乳糖[106]: 培养基: 乳糖 10 g, 酵母膏 1 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, 调 pH 7 至 7.2, 115 °C 灭菌 20 min, 倒平板。接种后培养 2 天, 加入 Benedict 试剂 (1.73%

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -17.3%柠檬酸钠-10%无水  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 室温放置 1 h。阳性: 菌落周围出现褐色沉淀。

硝酸盐还原[106]: Griess A 试剂: 0.5 g 对氨基苯磺酸溶于 150 mL 10%稀醋酸。Griess B 试剂: 0.1 g  $\alpha$ -萘胺溶于 20 mL 蒸馏水和 150 mL 10%稀醋酸。二苯胺试剂: 0.5 g 二苯胺溶于 100 mL 浓硫酸, 再用 20 mL 蒸馏水稀释。含 0.1%  $\text{KNO}_3$  的肉汁胨培养基调 pH 7 至 7.6, 分装 5 mL 到试管, 121 °C 灭菌 15 min, 接菌培养 1 周。取少许培养液依次加 1 滴 Griess A 和 Griess B 试剂, 如不显色再滴加二苯胺试剂。阳性: 加 Griess A 和 B 之后显红、橙或棕色, 或加二苯胺后仍无色。阴性: 加 Griess A 和 B 之后不变色, 加二苯胺后显蓝色。

亚硝酸还原[106]: 培养基: 10 g 牛肉膏, 5 g 蛋白胨, 1 g  $\text{NaNO}_2$ , 1000 mL 蒸馏水, 调 pH 7.4。培养 1 周后加 Griess A 和 Griess B 各 1 滴。阳性: 红色消失并产氨。阴性: 显红色。

反硝化[106]: 含 0.1%  $\text{KNO}_3$  的肉汁胨培养基调 pH 7.2 至 7.4, 分装 5 mL 到试管, 121 °C 灭菌 30 min, 接菌后用灭菌凡士林封管。培养 7 天。阳性: 有气泡。

脲酶[106]: 蛋白胨 1 g,  $\text{NaCl}$  5 g, 葡萄糖 1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g, 0.2% 酚红水溶液 6 mL, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL。调 pH 6.8。115 °C 灭菌 30 min。冷却至 50 °C, 以过滤灭菌方式加入 20% (w/v) 尿素溶液, 使终浓度达 2%, 摆斜面。接种后培养 5 天。阳性: 培养基呈桃红色。

吲哚[106]: 蛋白胨 10 g,  $\text{NaCl}$  5 g, 自来水 1000 mL。调 pH 7.6。分装 4 mL 到试管, 115 °C 灭菌 15 min, 接菌培养 1 周。加 5 滴乙醚振荡后静置, 加几滴吲哚试剂 (0.8 g 对二甲基氨基苯甲醛溶于 76 mL 95%乙醇和 16 mL 浓  $\text{HCl}$ )。阳性: 乙醚中显红色。

苯丙氨酸脱羧酶[106]: 酵母膏 3 g,  $\text{NaCl}$  5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 g, L-苯丙氨酸 1 g, 琼脂 12 g, 蒸馏水 1000 mL, 分装试管, 121 °C 灭菌 10 min, 接菌后培养 7 天。滴加 5 滴 10% (w/v)  $\text{FeCl}_3$ 。阳性: 显绿色。阴性: 不变色。

精氨酸双水解酶[106]: Thornley 培养基: 蛋白胨 1 g,  $\text{NaCl}$  5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3 g,

酚红 0.01 g, 琼脂 6 g, L-精氨酸 10 g, 蒸馏水 1000 mL。调 pH 7.2。121 °C 灭菌 15 min。直针穿刺接种。无菌凡士林封管, 培养 14 天。阳性: 显红色。

水解马尿酸[106]: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, 酵母膏 1 g, 葡萄糖 1 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 g, 马尿酸钠 10 g, 蒸馏水 1000 mL。分装试管, 121°C 灭菌 30 min, 接菌后培养 4 周。向 1 mL 培养物中加入 50% 硫酸 1.5 mL。阳性: 有结晶出现。阴性: 无结晶出现。

明胶液化[106]: 蛋白胨 5 g, 明胶 150 g, 水 1000 mL。调 pH 7.4, 分装试管, 115°C 灭菌 15 min。穿刺接种, 在 20°C 培养 14 天。阳性: 菌落周围明胶变为液体。

脂肪酶 (Tween 80) [106]: 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g, 琼脂 9 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.4, 121°C 灭菌 20 min; Tween 80 也于 121°C 灭菌 20 min。冷却至 50°C 加入 Tween 80 至 1% 浓度, 倒平板。划线接种培养 7 天。阳性: 菌落周围有模糊的晕圈。阴性: 无晕圈。可以用 Tween 20 替代 Tween 80。

石蕊牛奶[106]: 2.5% (w/v) 石蕊水溶液 4 mL, 脱脂牛奶 100 mL (脱脂奶粉 10 g 溶于 100 mL 水)。以 5 mL 分装试管, 112 °C 灭菌 20 min。接菌培养 30 天, 观察有如下现象: 还原—石蕊退色变白; 胨化—牛奶变清; 产酸—石蕊变红; 产碱—石蕊变蓝; 酸凝—变红并凝固; 酶凝—牛奶结块凝固, 不变色或蓝色。

酪素平板: 1.9 g/L 硼砂与 0.2 mol/L NaOH 各 2.5 mL 混匀后稀释至 100 mL, 加干酪素 2 g, 加热溶解, 115 °C 灭菌。4% 琼脂水溶液 100 mL 在 121 °C 灭菌。趁热混匀干酪素和琼脂, 倒平板。接菌培养。阳性: 菌落周围有透明圈。

乙酸氧化[106]: 培养基: 酵母膏 10 g, 乙酸钙 10 g, 琼脂 20 g, 自来水 1000 mL, pH 7.2, 倒平板, 接菌培养 5 天。阳性: 菌落周围出现白色晕圈。

KOH 检测[150]: 2-mm 接种环挑取 24 h 的海水平板菌落, 放在 1 滴 3% KOH 溶液 (置于载玻片上) 中搅动, 不时抬起接种环 1 至 2 cm, 如果在 30 s 内能从菌落裂解物中拉出细丝, 则为 KOH 检测阳性; 如不能则为阴性。

### 2.1.3.2 脂肪酸组分分析

采用 MIDI 公司推荐的标准操作程序制备 (有改动) 细菌脂肪酸甲酯[151], 再用气相色谱分析。

### 2.1.3.2.1 培养收集细菌

TSBA 平板: 蛋白胨 2 g; NaCl 0.5 g;  $K_2HPO_4$  0.25 g; 葡萄糖 0.25 g; 琼脂 1.5 g, 蒸馏水 100 mL。煮沸溶解, 调 pH 7.3。121 °C 灭菌 15 min。水浴冷却至 60 °C。倒入直径 9 cm 的平板 (高 15 mm), 分装 20 至 25 mL。细菌四级划线培养。28 ± 1 °C。24 ± 2 h。用直径 4 mm 接种环在第三级划线处刮取约 40 mg 菌体置于 13 mm × 100 mm 螺口试管底部。

### 2.1.3.2.2 皂化

试剂 1: 45 g NaOH, 150 mL 甲醇, 150 mL 蒸馏水。先将甲醇与水混匀, 加入 NaOH 搅拌混匀。取 1.0 ± 0.1 mL 试剂 1, 以特氟龙塑料管帽密封螺口试管。振荡 5 至 10 s。100 °C 水浴 5 min。取出振荡 5 至 10 s。放回 100 °C 水浴 25 min。要求密封的管中不能产生气泡。取出试管, 用自来水冷却。(不用冰水。)

### 2.1.3.2.3 甲酯化

试剂 2: 6 mol/L HCl 325 mL, 加入到 275 mL 甲醇中, 混匀。向样品中加入 2.0 mL ± 0.1 mL 试剂 2, 旋紧管帽振荡 5 至 10s。80 °C ± 1 °C 水浴 10 ± 1 min。取出试管, 用自来水冷却。振荡加快冷却。(不用冰水。)

### 2.1.3.2.4 提取与洗涤

向试管样品中加入 1.25 ± 0.1 mL 己烷-乙醚 (1: 1 体积比), 颠倒混匀 10 min, 吸取下层水相, 丢弃。向试管样品中加入 3.0 ± 0.1 mL 试剂 3 (10.8 g NaOH 加入 900 mL 蒸馏水)。旋紧管帽颠倒混匀 5 min。3 min 200 rpm 离心。取出上相 (有机相) 的 2/3 置于气相色谱上样瓶, 可以冷冻保存几天。

### 2.1.3.2.5 气相色谱分析脂肪酸甲酯

岛津 GC-17A 气相色谱仪, 安捷伦 DB-FFAP (长 30 m, 内径 0.32 mm, 膜厚 0.25 μm) 毛细管柱。上样 1 μL, 起始柱温 150 °C, 以 3 °C/min 升温至 220 °C 维持 25 min。检测器 (氢火焰检测器 FID) 和进样口温度均为 250 °C。载气为氮气, 流速 60 mL/min。脂肪酸甲酯标准品为 Supelco™ 37 Component FAME Mix (Sigma)。用三次回归求得标准品中饱和直链脂肪酸碳原子数 (x) 与保留时间 (y) 的对应关系, 再用待测样品各峰的

保留时间解三次方程求得  $x$  即样品峰的等价链长 (equivalent chain length, ECL)。同时也求出标准品中的不饱和脂肪酸甲酯的 ECL 以校正样品的 ECL。将 ECL 数值与文献数据 [152, 153] 比较判断各峰是何种脂肪酸甲酯。

### 2.1.3.3 细菌 16S rDNA 测序与系统发育学分析

细菌基因组 DNA 的小量制备 [154]: 培养 5 mL 细菌培养物至饱和状态, 取 1.5 mL 的培养物离心 2 min。沉淀物加入 567  $\mu$ L pH 8 的 TE (10 mmol/L Tris·Cl-1 mmol/L EDTA) 缓冲液, 用吸管吹打重悬。加入 30  $\mu$ L 10% (w/v) 的 SDS 和 3  $\mu$ L 20 mg/mL 的蛋白酶 K, 混匀, 37  $^{\circ}$ C 温育 1 h。加入 100  $\mu$ L 5 mol/L NaCl 混匀再加入 80  $\mu$ L 10% (w/v) CTAB/0.7 mol/L NaCl 溶液, 混匀后于 65  $^{\circ}$ C 温育 10 min。加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1) 混匀后离心 5 min。将上清转入新离心管后加入等体积苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 混匀后离心 5 min, 将上清转入新离心管后加入 0.6 倍体积异丙醇。离心, 弃上清, 用 1 mL 70% 乙醇洗涤沉淀, 离心 5 min 弃上清, 待上清稍干燥后加 TE 缓冲液 100  $\mu$ L 重溶 DNA。

使用 Stratagene 公司 RoboCycler Gradient 96 PCR 仪扩增 16S rDNA [106]: 正向引物 5' -AGAGTTTGATCCTGGTCAG-3'; 反向引物 5' -CGGCTACCTGTTACGAC-3'。PCR 反应体系: 基因组 DNA 0.5  $\mu$ L, 两种引物各 1  $\mu$ L, 10 $\times$  缓冲液 (含  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L, dNTP 2  $\mu$ L, ExTaq DNA 聚合酶 (购自大连宝生物公司) 0.125  $\mu$ L (5 U/mL), 去离子水 18  $\mu$ L。PCR 条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min 预变性; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 55  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 90 s 共 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 8 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (Tris-乙酸-EDTA 缓冲体系) 检测确定为单一条带后直接送上海生工测序。测两个反应, 测通。除去测序原始结果中序列两端不可靠的部分, 测序结果递交到 GenBank, 序列号 DQ508485。

在 EzTaxon [155] 网站 (<http://www.eztaxon.org/>) 搜索与 DQ508485 相似性最高的模式菌株的 16S rDNA 序列, 并从 GenBank 中下载这些序列。序列比对用 ClustalX1.83 软件 [156], 系统发育树用 CIPRES 网络计算服务 ([http://www.phylo.org/sub\\_sections/portal](http://www.phylo.org/sub_sections/portal)) 中的 RAxML 软件 (RAxML with bootstrapping) 构建, 以 *Paenibacillus polymyxa* 为外群细菌, 以 MEGA4 软件 [157] 编辑系统发育树。

## 2.2 结果

### 2.2.1 菌株筛选

分离平板细菌生长缓慢, 7 天后出现肉眼可见的菌落。共分离出 49 株细菌, 对其形态与生理生化性质研究后发现所有菌株都有相似的特征, 可能它们属于同一种。49 株细菌的过氧化氢酶活性差异明显, 但初筛和复筛的所有菌株过氧化氢酶活性都高于 *E. coli* 的过氧化氢酶。15 株细菌在初筛和复筛时活性高于 *M. lentus*, 初筛与复筛时活性最高的菌株都是 N2a, 其菌体超声破碎液过氧化氢酶活性达 1200 U/mg, 而 *M. lentus* 和 *E. coli* 的菌体超声破碎液中酶活性分别为 900 U/mg 和 70 U/mg。同绝大多数报道一样 [8, 15, 18, 21, 158], N2a 的过氧化氢酶也是胞内酶, 用两种方法都测不出除去细胞的发酵液上清中过氧化氢酶活性。

### 2.2.2 菌株形态与生理生化特征

从海水中分离的培养物具有杆菌形态和产芽孢能力这两种芽孢杆菌属的重要特征。49 株细菌为杆菌, 2.5-5  $\mu\text{m}$  长, 0.5-1  $\mu\text{m}$  宽。卵圆形芽孢端生。基础海水培养基中在 4~35  $^{\circ}\text{C}$  生长, 其最适生长温度范围为 20~28  $^{\circ}\text{C}$ , 其生长 pH 范围为 pH 6~11。最适生长的 NaCl 浓度为 0~7% (w/v), 当 NaCl 浓度大于 8% 时生长被抑制。基础海水培养基培养 24h 的菌落圆形、全缘、扁平, 直径 0.9 至 1.2 mm, 光滑有光泽, 粘液状外观, 质地似奶油, 白色半透明。以下实验为阴性: KOH、氧化酶、甲基红、V-P、吲哚、 $\text{H}_2\text{S}$  产生、纤维素酶、3-酮基乳糖产生、Tween 20 水解、Tween 80 水解、亚硝酸盐还原、反硝化、乙酸氧化、L-苯丙氨酸脱氨酶、精氨酸双水解酶、水解马尿酸、利用酒石酸盐、利用糖或醇产气。以下实验为阳性: RNA 酶、碱性磷酸酯酶、明胶液化、酪素分解、牛奶胨化并产酸。利用葡萄糖、淀粉、甘油、麦芽糖、蔗糖、海藻糖、甘露糖产酸。不能从木糖、乳糖、甘露醇、山梨醇、乙二醇、甲醇、乙醇产酸。其它性质见表 2-1。49 株细菌以 N2a 为代表, 进一步测定其 16S rDNA 序列和脂肪酸组成。

表 2-1 N2a 与系统发育相关菌种的表型特征差异

Table 2-1 Phenotypic characteristics that differentiate N2a from related *Bacillus* species

Character	1	2	3	4	5
Gram-stain	V	+	+	+	V
Long chain morphology	-	-	-	+	+
Growth at/in					
4°C	+	-	-	-	ND
47°C	-	-	-	-	+
PH 9.5	+	+	-	+	+
5% NaCl	+	-	-	-	+
Anaerobic growth	-	+	-	+	-
Motility	+	-	+	ND	W
Nitrate reduction	+	-	-	ND	-

Species: 1, N2a; 2, *Bacillus barbaricus* [159]; 3, *Bacillus arsenicus* [160]; 4, *Bacillus macauensis* [161]; 5, *Bacillus gelatini* [162]. +, Positive; -, negative; ND, not determined; v, variable; w, weak.

### 2. 2. 3 细菌 16S rDNA 系统发育分析

和 N2a 的 16S rDNA 序列 (1434 bp) 相似性最高的菌株分别为 [155]: *Bacillus barbaricus* DSM 14730<sup>T</sup> (99.4%), *Bacillus arsenicus* DSM 15822<sup>T</sup> (97.9%), *Bacillus macauensis* DSM 17262<sup>T</sup> (96.1%), *Bacillus gelatini* LMG 21880<sup>T</sup> (95.3%)。可以确定 N2a 是芽孢杆菌属的细菌。图 2-1 也证明了 N2a 的系统学位置。

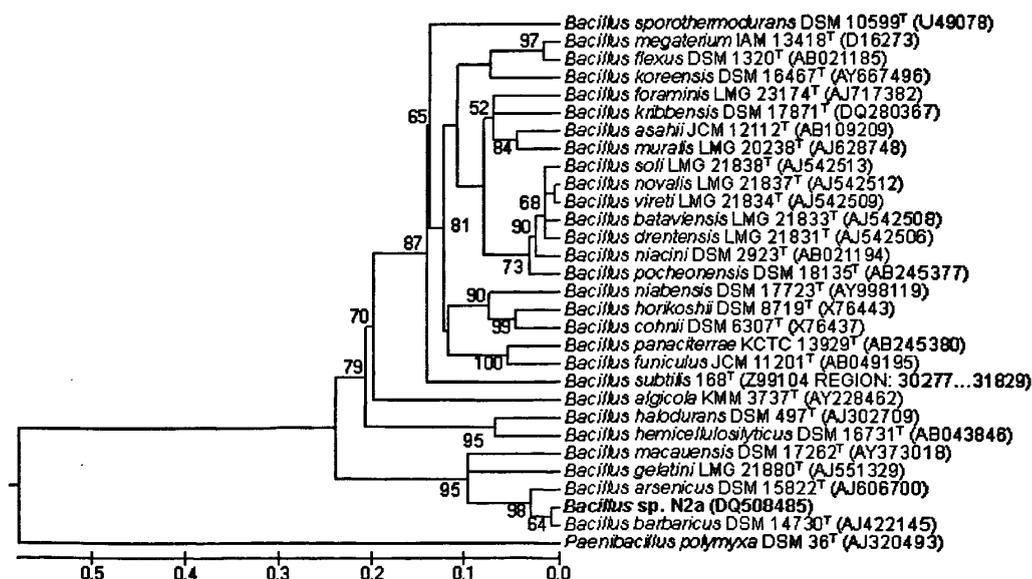


图 2-1 N2a 和相关菌株的 16S rDNA 系统发育树

Fig.2-1. Maximum likelihood tree based on 16S rDNA (1434 bases) gene sequences showing the phylogenetic relationships between *Bacillus* sp. N2a and the nearest neighbours of the genus *Bacillus*. Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) greater than 50% are given at the nodes. *Paenibacillus polymyxa* DSM 36<sup>T</sup> was the out-group species. Bar, 1% nucleotide substitution.

## 2.2.4 细菌脂肪酸组成

由表 2-2 可见 N2a 的支链脂肪酸占优势 (大于 80%), 这完全符合芽孢杆菌属细菌的特征。但 N2a 的 C14、C15 和 C16 三类主要脂肪酸含量相差不大 (20% 至 30%), 这明显不同于系统发育学相关菌株 (其 C15 或 C16 一种脂肪酸占优势)。

表 2-2 N2a 与系统发育相关菌种的脂肪酸含量 (%)

Table 2-2 Fatty acid compositions (%) of N2a and related type strains

脂肪酸	1	2	3	4	5
C13:0	0	0	5.8	0	0
iso-C13:0	4.7	0	0	0	0
iso-C14:0	13.3	9.4	3.4	4.6	0
C14:0	0	0.9	1.1	2.2	0
iso-C14:1	17.6	0	0	0	0
iso-C15:0	14.2	19	10.6	21.7	60.7
anteiso-C15:0	14.2	42.8	10.5	67.2	9
C15:0	0	0.9	1.6	0	0
iso-C15:1	2.4	0.7	4.2	0	0
iso-C16:1	11.2	0	0	0	0
C16:1 $\omega$ 7cis	6	4.9	25.3	0	0
C16:1 $\omega$ 11cis	1	2.8	4.2	0	0
iso-C16:0	2	6	19	1.6	4.6
anteiso-C16:0	1	0	0	0	0
C16:0	0	2	9.6	0	2.2
iso-C17:0	0	0	1.1	2.7	12.8
anteiso-C17:0	0	2.6	0	0	9.7
anteiso-C18:1	2	0	0	0	0
C18:1 $\omega$ 11cis	5.7	0	0	0	0
合计					
C14	30.9	10.3	4.5	6.8	0
C15	30.8	63.4	26.9	88.9	69.7
C16	21.2	15.7	58.1	1.6	6.8
支链脂肪酸	82.6	80.5	48.8	97.8	96.8
不饱和脂肪酸	45.9	8.4	33.7	0	0

Species: 1, N2a; 2, *Bacillus barbaricus* [159]; 3, *Bacillus arsenicus* [160]; 4, *Bacillus macauensis* [161]; 5, *Bacillus gelatini* [162]

## 2.3 讨论

### 2.3.1 细菌培养与过氧化氢酶

考虑到南极表层海水中容易在实验室培养的细菌种类与生物量可能不多, 所以用常规培养基一般不会培养出大量菌株; 培养出的菌株可以逐一筛选, 因此确定选用常规培养基。基础海水培养基即稍作改动的经典的 Zobell 培养基, 它广泛地用于海洋异养好氧细菌的培养。但这种培养基的蛋白与糖类等营养成分浓度比天然海水高几个数量级, 因此它不能培养海水中的“寡营养”细菌。虽然它培养出的细菌不能很好地反映天然海水中的细菌种类和生物量, 但它培养出的细菌都能利用高浓度的碳源和氮源 (相对

于天然海水) 快速生长, 所以有利于实验室研究和实际应用。这也是本研究选用这种培养基的原因。结果同预期相符, 得到高过氧化氢酶活性菌株, 证明培养基的选择是成功的。基础海水培养基培养出的 49 株细菌可能属于同一种细菌, 说明采样海水中能适应高浓度营养物质并快速生长的细菌种类并不多。由表 2-3 可见 N2a 的过氧化氢酶活性高于除 *Vibrio rumoiensis* (分离自含  $H_2O_2$  的废水) 以外的其它几种微生物。这样高的活性保证了环境中  $H_2O_2$  被迅速分解。

表 2-3 N2a 与其它微生物的细胞破碎液中过氧化氢酶活性比较

Table 2-3 Catalase activity in cell-free crude extract from microorganisms

Microorganism	Catalase activity	
	(U/mg)	Reference
Antarctic marine isolate N2a	1200	this work
<i>Halomonas</i> sp. SK1	360	[15]
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	88	[18]
<i>Frankia</i> strain R43	74	[158]
<i>Halobacterium halobium</i>	60.6	[8]
<i>Vibrio rumoiensis</i>	7300	[21]

Catalase activity was measured in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) at 25 °C

a. Catalase activity was measured at 20 °C.

南极海洋细菌以光激活反应和 SOS 反应修复紫外线辐射直接引发的 DNA 损伤 [163]。然而紫外线辐射的间接作用, 如在海水中和细胞内溶质中产生  $H_2O_2$  的光化学反应, 对细菌的生存也有不利影响 [163]。高过氧化氢酶活性是 N2a 不受表层海水中  $H_2O_2$  的有害影响而正常生长代谢的主要原因, 这一结果同 Hernandez 报道 [145] 一致。还可以推测整个表层海水中的微生物都有足够高效的过氧化氢酶, 以快速分解环境中的  $H_2O_2$ , 使其不危害有机体的正常生命活动。这样看来, 南极表层海水中的微生物生存不受  $H_2O_2$  浓度的影响, 过氧化氢酶可能是维系南极表层海水生态系统的重要因素。

### 2.3.2 筛选方法与测活方法的选择

筛选菌株时, 平板培养有利于高通量筛选, 而摇瓶培养比平板培养产酶量更高, 更有利于与酶的后续研究保持一致, 如分离纯化和大规模生产。本研究曾用过平板法 ( $H_2O_2$  梯度平板) [16] 筛选 49 个菌株, 但效果不理想, 所以过氧化氢酶测活方法的要求是采用摇瓶培养筛选的决定因素。与高锰酸钾滴定法 [146] 相比, 文献中使用硫代硫酸钠滴定法的报道更多, 所以将其定为初筛方法。实验证明硫代硫酸钠滴定法和紫外分光光度法是筛选的有效方法。用滴定法初筛可以不处理样品, 能比较快捷地测定含菌体的发酵液中过氧化氢酶的活性, 因此国内研究人员多次使用此方法

[44, 47, 164]。但这种方法测活时间较长,产生误差的因素很多,不如紫外分光光度法更准确。紫外分光光度法是国内外研究的常规方法[8, 15, 18, 21, 29, 42, 45, 158],虽然离心和细胞破碎等前处理不利于高通量筛选,但对于少数菌株活性筛选,其测活过程快速准确,能与后来的分离纯化研究使用同样方法,保持前后处理方式和数据一致。所以紫外分光光度法无疑是理想方法。初筛时酶活单位是 U/mL,而复筛时单位是 U/mg,所以两者不能直接比较,但两种方法的一致性比较好。初筛获得的 15 株菌在复筛时活性仍高于 *M. lentus*,而且活性相对高低的关系基本不变。本研究还使用过可见光分光光度计法(铬酸钾法)[165]测活,但使用后认为不可行,可能是因为酸性测活条件下酶活性丧失。*M. lentus* 的过氧化氢酶活性高[7, 21],用作筛选的阳性对照是合适的。

### 2.3.3 菌种鉴定

49 株细菌除过氧化氢酶活性有差别以外,其胞外水解酶活性差别也很明显。大多数菌株生长温度不超过 30 °C,仅 5 株能在 35 °C 生长。但这些差别远少于它们的共同特征,因此将它们归于同一种是合理的。

长期以来一直没有来自海水的芽孢杆菌属新种的报道,直到 Yoon 等从韩国的海水中分离出 *B. marisflavi*, *B. aquimaris* 和 *B. hwajinpoensis*[166, 167]。目前也仅有这三种芽孢杆菌分离自海水。在北极和南极地区的多年冻土中,芽孢杆菌属是常见属[168],但近年来分离自南极海水的新菌种几乎都属于拟杆菌门[169]和变形细菌门[170]。Logan 等曾报道来自南极南桑威奇群岛火山土壤的 *Bacillus* 新种 *B. fumarioli*[171], *B. luciferensis*[172]和 *B. shackletonii*[173],但一直没有来自南极海水的新的低 G+C%含量革兰氏阳性菌的报道。

N2a 与 *B. barbaricus* 的 16S rDNA 相似性很高,但许多 *Bacillus* 菌种之间 16S rDNA 相似性更高(如 *B. pumilus* 和 *B. safensis* 达 99.9%),因此不能仅凭 16S rDNA 相似性就断定 N2a 为 *B. barbaricus*。相反地,N2a 和 *B. barbaricus* 表型特征差别很大,从表 2-1 可见 N2a 在低温生长、耐盐性等方面明显有别于 16S rDNA 系统发育学相关菌株。生长温度范围与耐盐性表明 N2a 为低温海洋菌;N2a 的不饱和脂肪酸含量超过 40%,明显高于 16S rDNA 系统发育学相关菌株,这也是低温菌的重要特征。*B. barbaricus*, *B.*

*arsenicus* , *B. macauensis*, *B. gelatini* 分别分离自壁画、砷矿石、饮用水和受污染的明胶, 生态环境都与 N2a 不同。因此 N2a 很可能是 *Bacillus* 的新种, 不过仍需补充基因组 G+C% 含量和 DNA 杂交实验才能最终确认。

Yumoto 等 [21] 和 Lorentzen 等 [22] 分别报道了来自 *Vibrio rumoiensis* 和 *V. salmonicida* 的高活性低温过氧化氢酶, 但来自自然环境自由生活的高活性低温过氧化氢酶的微生物尚无报道, 高过氧化氢酶活性的海洋革兰氏阳性菌也无报道。N2a 细胞破碎液中过氧化氢酶活性高达 1200 U/mg, 有利于进一步的低温过氧化氢酶的理论与应用研究, 也可以成为低温氧化胁迫反应研究的模型生物。

### 3 芽孢杆菌属及相关属细菌的系统进化关系

近年来报道了大量 *Bacillus* 属的新种, 同时在 Bacillaceae 中也建立了许多与 *Bacillus* 属相关的新属。根据 List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)网站(2008) [174]的记录, 目前 *Bacillus* 属的 140 多个种中, 在 2000 年之前报道仅 54 种; 在 Bacillaceae 科的 30 多个属中, 在 2000 年之前建立的仅 6 个属。

长期以来人们就认为 *Bacillus* 属不是单系群(monophyletic group) [175], 而近年来报道的新属与新种的系统发生学尚未进行过全面的研究, 所以 *Bacillus* 属内菌种及相近属的系统发生学关系仍是悬而未决的问题。Priest 等曾用数值分类法将 368 株好氧产芽孢的细菌分成 79 类[176]。1990 年以后, rRNA 基因作为细菌系统发生学的“分子标尺”应用于好氧或兼性厌氧且产芽孢的细菌的系统学研究, 建立了众多新的科和属 [177]。16S rDNA 序列相似性成为产芽孢的杆菌分类的主要依据之一。Goto 等[178]和 Xu 等[179]使用部分 16S rDNA 序列及 16S—23S 转录间隔区部分序列研究了 *Bacillus* 属及相近属的系统发生学。但是研究使用的序列数目少(分别为 69 条与 40 条), 而且序列短(分别为 1057bp 和 220bp), 所以结果并不一致。

近年来报道的大多数新种的 16S rDNA 序列都接近全长(大于 1300bp), 并且模糊信息少, 这为系统发生学分析提供了理想的原始数据; 个人计算机计算能力不断提高也为处理大量数据创造了必要条件; 特别是系统发生树构建算法的进步和新软件 [180, 181]的出现, 使最大似然性法和贝叶斯推断这两种比传统方法(邻位连接法、最小进化法和简约法)更理想的算法在系统学研究中广泛使用[182]。

本章对 181 种 *Bacillus* 属及相近属的模式菌株近全长的 16S rDNA 序列, 用多种算法进行系统发生学研究, 旨在建立 *Bacillus* 内各菌种及与 *Bacillus* 相近属之间的系统发生学关系。

#### 3.1 方法

模式菌株的 16S rDNA 来自 GenBank (附件 1)。选用 *Bacillus* 属所有菌, 芽孢杆菌科各个属的代表种以及芽孢杆菌目其它科的代表种(截至 2007 年 9 月)。当一个菌种有多条 16S rDNA 序列时, 选最长且非 AGTC 字符最少的序列。选中的序列中如果有非

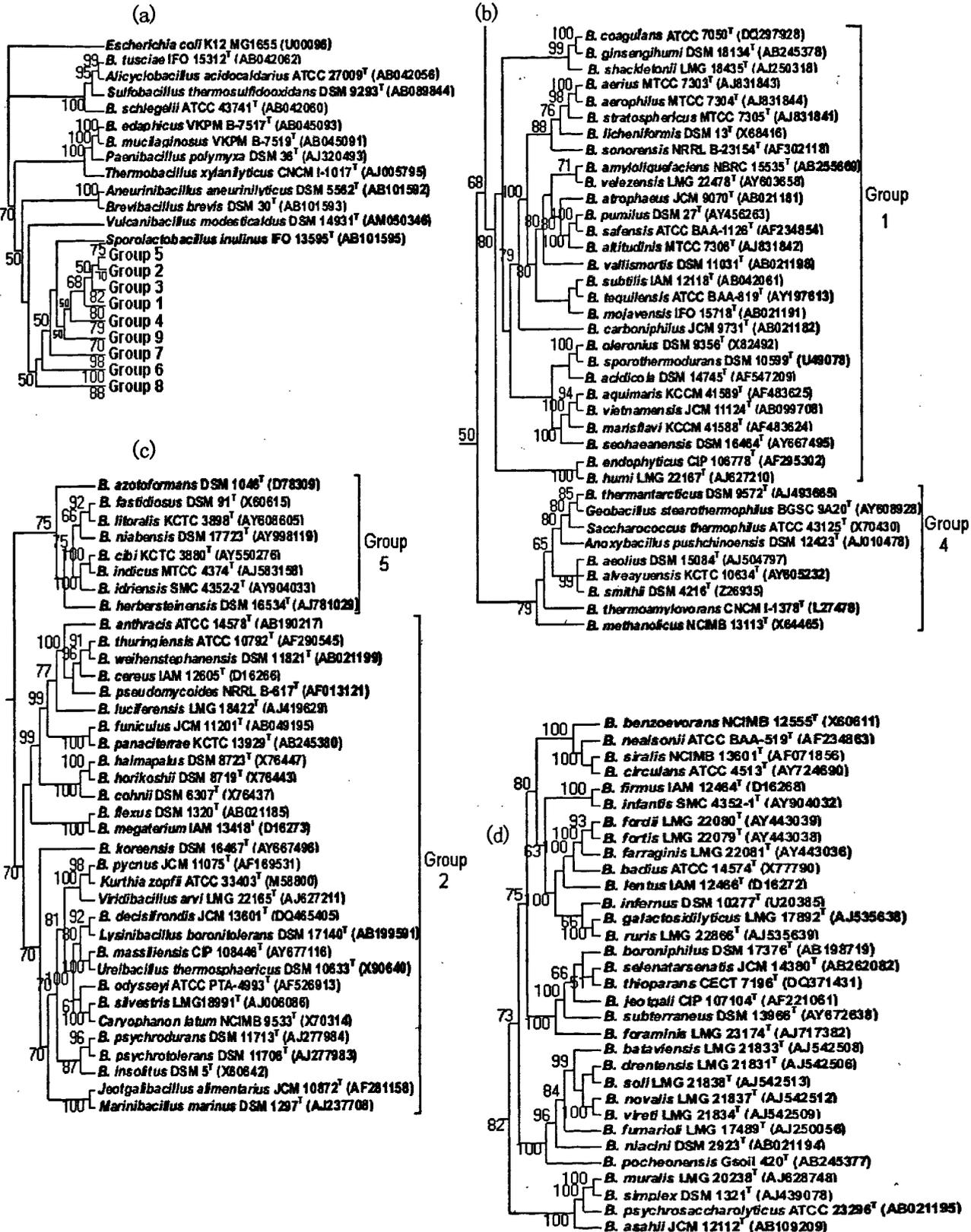
AGTC 字符, 则参照 BLAST 搜索得到的同源性最高的序列以及模式菌株其它 16S rDNA 序列, 尽可能修正模糊信息。以 ClustalX1.83 软件[156]进行序列比对, 再以 TuneClustalX 软件(Hall, 2004, <http://homepage.mac.com/barryghall/TuneClustalX.html>) 优化 ClustalX 参数设置, 最后用 Bioedit7 软件[183]手动编辑多序列比对结果, 使 ClustalX 计算出的 quality scores 平均值最大化。16S rDNA 序列成对比较相似性使用 EzTaxon 网站计算服务[155]。选择大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为外群菌种。

以 Modeltest 3.7 软件[184]的 Hierarchical likelihood ratio tests (hLRTs) 和 Akaike information criterion (AIC)标准选择核苷酸替代模型。选用邻位连接法(NJ)、简约法(MP)、最小进化法(ME)、最大似然法(ML)和贝叶斯推断(BI)五种算法构建系统发生树。前三种算法使用 MEGA4 软件[157], bootstrap=1000, NJ 和 ME 树构建采用 Maximum Composite Likelihood 方法。ML 树使用 RaxML-VI-HPC4 软件的网络计算(<http://phylobench.vital-it.ch/raxml-bb/>) 构建, 使用默认参数, bootstrap=100。用 MrBayes3.1 软件[181]进行贝叶斯推断, 根据软件使用说明设置参数。nst = 6, rates = invgamma, covarion=yes, Ngen = 4300000, Nruns = 2, Nchains = 4, Temp = 0.2, Samplefreq = 100, Printfreq = 1000, Burnin = 30000。

### 3.2 结果与讨论

*B. mycoides* AB021192 (1513bp) 和 *B. weihenstephanensis* AB021199 (19 至 1531bp) 完全相同, 所以只选 *B. weihenstephanensis*。181 条 16S rDNA 的序列比对结果用 modeltest 软件的 hLRTs 得到 TN+I+G 为最佳模型[185],  $\gamma$  分布的形状参数为 0.5854, 将此结果用于 MEGA4 软件计算 NJ 和 ME 树。Akaike information criterion (AIC)标准确定 GTR+I+G 为最佳模型[186], 将此模型用于贝叶斯推断。

NJ、ME、MP 和 ML 算法得到的进化树见附件 2。虽然个别菌的系统学地位在各种算法的进化树中有差别, 但大部分菌的系统学地位在各种进化树中都是一致的, 可以将 181 种细菌划分为 9 个组 (Group) (图 3-1a)。



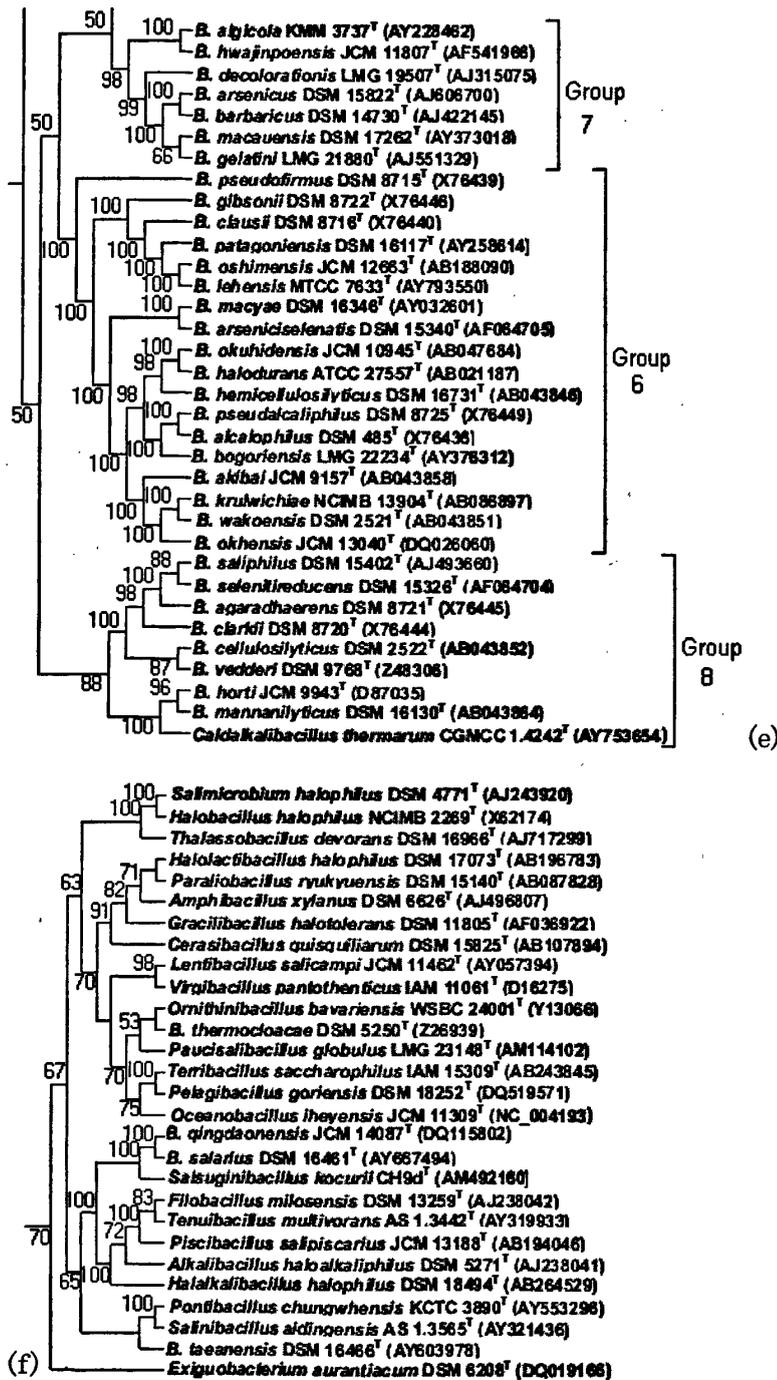


图 3-1 *Bacillus* 属及相近属的模式菌株 16S rDNA 进化树, 使用 MrBayes3. 1. 2 软件构建。

Fig. 3-1. Bayesian cladistic tree was constructed with the 16S rDNA sequences of the type strains of *Bacillus* species and related genera (181 taxa, 1603 sites; GTR+I+G plus covarion model) demonstrating 9 groups (a), and the species in every group were illustrated as (b) Group 1 and 4, (c) Group 2 and 5, (d) Group3, (e) Group 6, 7 and 8, and (f) Group 9. Bootstrap confidence levels greater than 50% were indicated at the internodes.

Holder 与 Lewis[182]认为最大似然法和贝叶斯推断是比 NJ、ME 或 MP 更理想的建树方法。比较 5 种系统树的结果支持这一主张: 贝叶斯推断法分析 181 条基因序列 1622 个核苷酸位点得到的系统进化树的支持度最高, 所有组的后验概率都大于 0.5; 其次是最大似然法, 它得到的系统树的节点支持度普遍大于 NJ 树、ME 树或 MP 树。贝叶斯树和 ML 树的拓扑结构很相似。除了组 6 和组 8, 其它组只有在贝叶斯树中才有大于 50% 的支持度。贝叶斯系统进化树中任何一个节点的支持度都大于其它进化树相应的节点支持度, 这与 Moreira 等[187]结果一致。

图 3-1 是贝叶斯推断得到的系统树, 它进一步证明了 *Bacillus* 不是单系群。芽孢杆菌属 16S rDNA 系统树的组 4、组 6 和组 9 的菌种在表型上有相似性, 但大多数组中的菌种在表型上并无明显的一致性, 这与 Goto 等和 Xu 等的结果相似[178, 179]。在图 1 的 9 个组中, *Bacillus* 的模式种 *B. subtilis* 位于组 1 (28 种) (图 3-1b), 它在所有算法的系统树中都成立。

组 2 在所有系统树中都成立, 并且明显分为两个 cluster (图 3-1c)。 *B. cereus* cluster 包括 14 个 *Bacillus* 属的细菌 (未标明 *B. mycoides* 的位置), 而 *B. insolitus* cluster 包括 16 个异源种。 *B. insolitus* cluster 包括 *Bacillus* 的 9 个种, 产芽孢的 *Viridibacillus*、*Lysinibacillus*、*Ureibacillus*、*Marinibacillus* 和 *Jeotgalibacillus* 五个属以及不产芽孢的 *Kurthia* 和 *Caryophanon*。这个复杂的异源 cluster 与 Zhang 等, La Duc 等和 Rheims 等的报道一致[188-190]。这种异源性暗示, *B. insolitus* cluster 的 9 个 *Bacillus* 属的种可能属于几个待成立的新属。

组 3 包括菌种最多, 含 5 个 cluster 共 32 种 (图 3-1d)。它在 NJ 和 ME 树中的支持度小于 10%。组 5 是较小的类群 (8 种), 它在 NJ 和 MP 树中位于组 1 内; 在 ME 树与组 1 最接近; 而在 BI 和 ML 树中它与组 2 最接近。比较各种系统树后, 认为不能将它并入组 1 或 2, 只能将它独立出来。

组 4 是由嗜热菌组成的异源群 (9 种, 图 3-1b), 它在所有系统树中都成立。其中 *B. thermantarcticus* 与 *Geobacillus thermoglucosidasius* ATCC 43742<sup>T</sup> (X60641) 的 16S rDNA 相似性为 98.3%。根据 Nicolaus 等[191], 应考虑将 *B. thermantarcticus* 转入嗜

热的 *Geobacillus*。而 *Bacillus* 属的另外 4 个嗜热菌与 *Geobacillus* 的 16S rDNA 相似性约 92%，与 *Geobacillus* 明显不同。

组 6 就是 Nielsen 等建立的 rRNA group6[192]，它在 5 种系统树中仍都成立。除 *B. macyae* 外[193]，组 6 由嗜盐菌或耐盐菌组成，这与 Ghosh 等[194]报道一致。组 7 是由近年来新发表的种组成，其中的两个耐盐菌 *B. hwajinpoensis* 和 *B. decolorationis* 曾划入组 6[167]；MP、ME 和 NJ 树也表明了组 7 和组 6 的系统学关系密切。但 BI 和 ML 树都将组 7 和组 6 明显分开（图 3-1e）。又由于组 7 中大多数芽孢杆菌不耐盐，所以不宜将组 7 并入组 6，这与 Nowlan 等[195]报道一致。南极海水细菌 N2a 同组 7 中的菌株的 16S rDNA 相似性最高（见第二章）。图 2-1 清楚地表明 N2a 同 *Bacillus barbaricus* DSM 14730<sup>T</sup> 以及 *Bacillus arsenicus* DSM 15822<sup>T</sup> 聚在一起，所以 N2a 也属于组 7。

组 8 和组 9 在 5 种算法的系统树中都得到支持，它们的 16S rDNA 序列在 89 bp 与 90 bp (*B. subtilis* IAM 12118<sup>T</sup> AB042061) 之间有一段插入序列，这使它们与其它组明显不同。组 8 由嗜碱耐盐菌组成 (*B. mannanilyticus* 不耐盐[196])。 *Caldalkalibacillus* 的 16S rDNA 序列和其它菌的序列相似性小于 92%，其嗜热性质和组 8 的其它芽孢杆菌明显不同，所以它是组 8 中的特殊成员（图 3-1e）。组 9 主要由芽孢杆菌科除芽孢杆菌属之外的其它的属组成（图 3-1f），但组 9 中还包括 4 个 *Bacillus* 属的种：*B. taeanensis*、*B. salarius*、*B. qingdaonensis* 和 *B. thermcloacae*。从进化树上可以认为这 4 个种可能不属于 *Bacillus*。前 3 种芽孢杆菌在原始发表的文献中[197-199]被归入组 8（NJ 算法系统树），这可能是由于作者们没有用足够多的组 9 细菌的序列。后三种菌和芽孢杆菌属内的，它们各自的系统学关系最近的菌株的 16S rDNA 序列相似性小于 92.5%，这三种菌应考虑重新分类。

有 4 个 *Bacillus* 属的细菌位于进化树的外围（图 3-1a）。其中 *B. schlegelii* 和 *B. tusciae* 都是高 G+C 含量的兼性化能自养的嗜热菌[200]，它们的 16S rDNA 序列与其它 180 株细菌的序列相似性小于 90%，可以考虑各自成立新的属。而 *B. edaphicus* 和 *B. mucilaginosus* 总同 *Paenibacillus polymyxa* 聚在一个 cluster 中；它们的 16S rDNA 序列和最接近的模式菌株的序列相似性高达 96%至 97% (*P. elgii* 和 *P. chinjuensis*)，所以这两个

菌可以考虑转入 *Paenibacillus*。

在 NJ 和 ME 树中, *Ureibacillus*、*B. thermcloacae* 和 *Exiguobacterium* 以小于 50% 的支持度聚在一起, 且不属于任何一个组; 但在 BI、ML 和 MP 三种进化树中, *Ureibacillus* 位于组 2, 后两个菌位于组 9, 这样的安排在 BI 树中有大于 50% 的支持度。还有五个细菌的系统学地位在不同算法的进化树中相差较大 (表 3-1)。其中 4 个 *Bacillus* 属的细菌在 BI 树中所在分支的支持度超过 50%, 而其它算法的系统树中 5 个菌所在分支的 Bootstrap 支持均小于 50%。*Sporolactobacillus inulinus* 的 16S rDNA 序列与其它菌的序列相似性均小于 93%。它不嗜热, 所以不宜归入组 4; 它在有氧条件下生长差, 过氧化氢酶阴性[201], 这又不同于组 7 的 *Bacillus*。BI 和 ML 树将其置于组 7 和组 9 之间, 但支持度都不超过 50%。三个嗜热菌 *B. infernus*、*B. thermoamylovorans* 和 *B. coagulans* 被归入组 4 时, 分支支持度都不超过 35%。Boone 等将 *B. infernus* 与 *B. methanolicus* 聚在一起[202]; Combet-Blanc 等将 *B. thermoamylovorans* 与 *Geobacillus* 和 *Saccharococcus* 聚在一起[203], 但这两个结果都没有重抽样支持。

表 3-1 系统学地位有争议的细菌在各种算法得到的进化树中所处的位置

Table 3-1 Disputable positions of 5 species in 5 phylogenetic trees

	BI	ML	ME	NJ	MP
<i>B. infernos</i>	Group3	Group3	Group4	Group3	Group4
<i>B. thermoamylovorans</i>	Group4	Group1	Group4	Group4	Group1
<i>B. coagulans</i>	Group1	Group1	Group4	Group4	Group1
<i>B. azotoformans</i>	Group5	Group2	Group3	Group3	Group3
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	*	*	Group7	Group4	Group7

\*不属于任何组

以上分析表明, 大部分芽孢杆菌的系统学地位是明确的, 但至少 9 种细菌可能不是真正的芽孢杆菌, 它们的分类学位置有待进一步的多相分类研究确认。

9 个组之间相互的系统学关系在各种算法的系统树中差别很大。但组 8 总位于最外 (图 3-1a), 其次是组 6 (ML 与 BI 树) 或组 9 (ME 与 NJ 树)。由于 BI 树的节点支持率均大于 0.5, BI 树和 ML 树表明的各组之间系统关系似乎更可信。芽孢杆菌目中的各个属的系统学位置同当前的分类系统[177]不完全一致。除芽孢杆菌属以外, 芽孢杆菌

科的属主要位于组 9、组 2 和组 4，但 *Vulcanibacillus* 却位于 9 个组之外。根据进化树应考虑将 *Vulcanibacillus* 移出芽孢杆菌科。Caryophanaceae 和 Planococcaceae (以 *Kurthia* 为代表) 在组 2 中，这与 Yoon 等报道一致[204]，说明其在系统学上与 *Bacillus* 关系密切，所以可以考虑将它们划到芽孢杆菌科。

## 4 南极海洋芽孢杆菌低温过氧化氢酶分离纯化与性质

缩略语: BNC: *Bacillus* sp. N2a 过氧化氢酶; VRC: *Vibrio rumoiensis* 过氧化氢酶; VSC: *Vibrio salmonicida* 过氧化氢酶; PMC: *Proteus mirabilis* 过氧化氢酶; Rz: Reinheitszahl index

低温过氧化氢酶研究不仅对认识好氧低温微生物生命活动规律有重要意义,而且此酶在纺织、造纸、食品和半导体工业水处理以及奶制品工业有潜在的应用价值[205]。Yumoto 等[21]首先报道了兼性嗜冷菌 *Vibrio rumoiensis* 的低温过氧化氢酶 (VRC) 的性质, Lorentzen 等[22]研究了来自鱼类病原菌 *Vibrio salmonicida* 的低温过氧化氢酶 (VSC)。这使人们初步了解了低温过氧化氢酶。这两种低温酶和通常低温酶的性质有许多差异: VRC 的活性从 10°C 到 70°C 都远远高于牛肝过氧化氢酶等中温酶; VSC 的  $K_m$  在低温和中温条件都低于 *Proteus mirabilis* 的过氧化氢酶 (PMC)。已知的两种弧菌低温过氧化氢酶的性质是否能代表所有低温过氧化氢酶的普遍性质? 同一类的过氧化氢酶可能在比活、 $k_{cat}$  和  $K_m$ 、抑制剂敏感性和温度稳定性等方面有很大不同[7]。本章来自南极海水的 *Bacillus* sp. N2a 菌株中分离纯化出一种低温过氧化氢酶 (BNC), 研究了其性质并在活化能、催化效率和热稳定性等方面和同源中温酶进行比较, 探讨其适应低温的机理, 以此更全面地认识低温过氧化氢酶。这也是首次报道来自革兰氏阳性菌的低温过氧化氢酶。

### 4.1 材料与方 法

#### 4.1.1 培养条件

生长和发酵培养基: 每 1L 蒸馏水含 8g 蛋白胨, 5g NaCl 和 3g 酵母浸膏, pH 7.2。1L 摇瓶含 200 mL 培养基, 20 °C, 200 rpm 摇床培养 24h 至指数生长期晚期。4 °C, 5000 g 离心收集菌体。

#### 4.1.2 纯化过程

离心条件均为 10000g (Hitachi 20PR-520), 如无特别说明, 纯化时环境温度为 4°C。约 23g 菌体重悬于 365mL pH7.5 50mmol/L Tris-Cl (缓冲液 A), 以 75W 功率超声破碎 10 次 (Vibra cell VCF1500, Sonics), 每次 1 min, 间隔 2 min。离心取上清, 加入硫酸

铵粉末至 40%饱和度，离心收上清再加硫酸铵至 70%饱和度，离心收沉淀。沉淀对缓冲液 A 透析过夜，离心后上 DEAE-Sephadex A25 阴离子交换柱 (3cm×10cm)，室温下用安玛西亚 ÄKTA FPLC 装置，以流速 1 mL/min 的缓冲液 A 平衡柱，0-0.3 mol/L NaCl 梯度洗脱 40 min 收集活性组分。聚乙二醇 2000 浓缩后上 Sephacryl S 200HR (安玛西亚 XK16/70 柱)，含 0.15 mol/L NaCl 缓冲液 A 平衡洗脱，流速 0.17 mL/min，收集活性组分，聚乙二醇 2000 浓缩。

#### 4.1.3 酶活性与蛋白测定

过氧化氢酶活性测定采用紫外分光光度法，方法与酶活力单位定义同菌种鉴定部分。过氧化物酶活性使用两种测活方法：4-氨基安替比林法(worthington 法) (<http://www.worthington-biochem.com/HPO/>): 比色杯中加入 1.4 mL 2.5 mmol/L 4-氨基安替比林和 0.17 mol/L 苯酚的混合溶液 (现用现配)，再加入 1.5 mL 的 1.7 mmol/L 过氧化氢 (现用现配，以 0.2 mol/L pH7.0 的磷酸盐的钾盐缓冲液配制)，25 °C 温浴 3 至 4 min 后加入 0.1 mL 待测样品或蒸馏水 (比色空白)，在分光光度计 510 nm 处测定吸光度 4 至 5 min 之内的增加值。调整酶浓度使吸光度每分钟变化 0.02 至 0.04 之间。活性计算公式为  $U/mL = \Delta A_{510nm} \times 3 \text{ mL} / (6.58 \times 0.1 \text{ mL})$ 。焦性没食子酸 (邻苯三酚) 法 ([http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/17540/HRP\\_Assay\\_pyro.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/17540/HRP_Assay_pyro.pdf)): 2.1 mL 蒸馏水，0.32 mL 0.1 mol/L pH6.0 的磷酸盐的钾盐缓冲液，0.16 mL 0.5%(w/w)过氧化氢和 0.32 mL 5%(w/v) 焦性没食子酸四种试剂 (后两种试剂现用现配) 加入比色杯后混匀，20 °C 温浴 5 min 后加入 0.1 mL 待测样品或蒸馏水 (对照)，以 3 mL 蒸馏水为比色空白，在分光光度计 420 nm 处测定吸光度 5 min 之内的增加值，每 10 s 记录一次数据。调整酶浓度使吸光度每 20 s 的变化在 0.16 至 0.28 之间。20 °C，每 20 s 从邻苯三酚生成 1 mg 红紫精 (purpurogallin) 定义为 1 个活力单位。活性计算公式为  $U/mL = (\Delta A_{酶} - \Delta A_{水}) \times 3 \text{ mL} / (12 \times 0.1 \text{ mL})$ 。蛋白质浓度测定方法同菌种鉴定部分。

#### 4.1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

SDS-PAGE (Mini-PROTEAN II, Bio-Rad) 根据 Laemmli 法[206]。5×上样缓冲液: 25 μg 溴酚蓝, 77.5 mg 二硫苏糖醇, 0.1g SDS, 0.5 mL 甘油, 312.5 μL 1mol/L pH6.8 Tris-Cl,

300  $\mu$  L 蒸馏水, 混匀。电泳缓冲液: 3.02 g Tris, 14.4 g 甘氨酸和 1 g SDS 用蒸馏水定容至 1L。5 mL 12% 分离胶: 蒸馏水 1.665 mL, 1.5 mol/L pH8.8 Tris-Cl 1.25 mL, 10% SDS 50  $\mu$  L, 30% 丙烯酰胺/ $N,N,N'$ -甲叉双丙烯酰胺 2 mL, 10% 过硫酸铵 25  $\mu$  L,  $N,N,N',N'$ -四甲基乙二胺 10  $\mu$  L。2 mL 4% 浓缩胶: 蒸馏水 1.428 mL, 1 mol/L pH6.8 Tris-Cl 0.25 mL, 10% SDS 20  $\mu$  L, 30% 丙烯酰胺/ $N,N,N'$ -甲叉双丙烯酰胺 266.7  $\mu$  L, 10% 过硫酸铵 25  $\mu$  L,  $N,N,N',N'$ -四甲基乙二胺 10  $\mu$  L。样品与上样缓冲液混匀后在沸水中煮 5 min, 离心后上样。电泳条件为恒压 200 V。溴酚蓝前沿将要离开凝胶时结束电泳。以 0.25% 考马斯亮蓝 R250 (45% 甲醇和 10% 乙酸) 染色, 蒸馏水脱色。非变性电泳用 4% 浓缩胶 2 mL, 7.5% 分离胶 5 mL: 蒸馏水 2.415 mL, 1.5 mol/L pH8.8 Tris-Cl 1.25 mL, 30% 丙烯酰胺/ $N,N,N'$ -甲叉双丙烯酰胺 1.25 mL, 10% 过硫酸铵 25  $\mu$  L,  $N,N,N',N'$ -四甲基乙二胺 10  $\mu$  L; 非变性电泳使用的各种溶液和试剂都不加 SDS 和二硫苏糖醇, 上样前不煮样品。非变性电泳前加样孔中对称加样, 电泳条件为恒流 10 mA, 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中电泳。电泳结束后将凝胶等分, 一半使用常规的考马斯亮蓝 R250 染色, 另一半活性染色。染色方法: 冷蒸馏水洗凝胶 3 次, 滤纸吸干。加 0.03% 过氧化氢溶液 50 mL, 轻摇 10 min 后倒过氧化氢溶液, 再用冷蒸馏水洗凝胶 3 次, 滤纸吸干后加入 2% 三氯化铁 (w/v) - 2% 铁氰化钾 (w/v) 染色液 [207]。两种溶液都现用现配, 再按体积比 1: 7 混合 (约 5 mL: 35 mL)。凝胶浸在染色液中, 轻摇 5 min 后倒染液, 蒸馏水洗。凝胶背景为绿色, 如果存在过氧化氢酶活性, 则出现黄色条带。

#### 4.1.5 物理化学性质

12% SDS-PAGE 测样品亚基分子量, 蛋白分子量标准 (Fermentas): 大肠杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶 (116 kD), 牛血清蛋白 (66.2 kD), 鸡卵清蛋白 (45 kD), 猪肌肉乳酸脱氢酶 (35 kD), 大肠杆菌限制性内切酶 Bsp981 (25 kD)。Superdex 200 10/300 GL 预装柱测样品分子量, 蛋白分子量标准 (Sigma): 牛肝过氧化氢酶 (247 kD), 牛血清白蛋白 (68 kD), 猪胰脂肪酶 (48 kD), 牛血红蛋白 (15.5 kD)。Bio-Rad Rotofor Cell 等电聚焦电泳测样品等电点, 两性电解质使用 Bio-Lyte 3/10 Ampholyte。德国耶拿 Specord 100 分光光度计全波长扫描测样品的 Soret 带。

## 4.2 结果

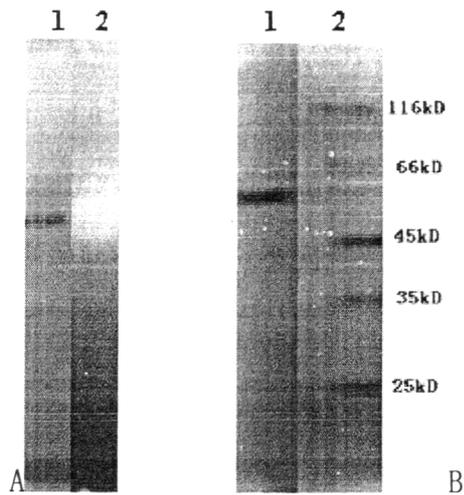


图 4-1 纯化的过氧化氢酶 (BNC) 聚丙烯酰胺凝胶电泳: A 非变性 PAGE, 4%浓缩胶, 7.5%分离胶。

第一泳道是考马斯亮蓝 R250 染色, 第二泳道是酶的活性染色。B SDS-PAGE, 4%浓缩胶, 12%分离胶。

第一泳道是过氧化氢酶, 第二泳道是分子量标准。

**Fig. 4-1** native PAGE (a) and SDS-PAGE (b) analysis of purified BNC.

(A) 1  $\mu\text{g}$  of native BNC was stained by Coomassie blue in lane 1 and  $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  in lane 2. (B) Lane 1, 2  $\mu\text{g}$  of BNC was loaded. Lane 2, molecular mass standards.

表 4-1 *Bacillus* sp. N2a 过氧化氢酶 (BNC) 纯化表

Table 4-1 Purification of *Bacillus* sp. N2a catalase (BNC)

Step	Catalase activity					Purification	
	Volume (mL)	Total protein (mg)	Activity (U/mL)	Total (U)	Specific (U/mg)	(fold)	yield (%)
Cell extract							
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	22	110	13000	286000	2600	2.2	77
Ion exchange	11.1	2	10000	111000	59000	49	30
Gel filtration	9	0.8	11000	99000	80000	67	27

### 4.2.1 酶的纯化

经过硫酸铵沉淀、阴离子交换层析和凝胶过滤三步纯化 (表 4-1), 得到电泳纯的 BNC。

纯化只用两次柱层析, 比 VSC 和 VRC 以及其它许多过氧化氢酶的纯化工艺都简单 [21, 22]。这主要因为阴离子层析时, 在 NaCl 浓度 0.13mol/L 时收集到酶活性峰。而此时蛋白浓度 (紫外吸收值) 很低, 所以这一步除去大部分杂蛋白, 有很好的纯化效果。下分子筛后浓缩的 BNC 在两种电泳后染色均为单一条带 (图 4-1), 证明纯化的蛋白达到电泳纯。

#### 4.2.2 分子量、等电点与光谱学性质

SDSPAGE 测得 BNC 亚基分子量为 56kD (图 4-1B)。分子筛测得 BNC 分子量为 230kD, 说明 BNC 和大多数过氧化氢酶一样, 为同源四聚体。等电聚焦电泳测得 BNC 的  $pI=4.2$ , 这与报道的其它过氧化氢酶  $pI$  小于 7 完全一致 [8,19-22]。纯化的 BNC 的 Soret 带位于 405nm。 $R_z=OD_{405}/OD_{280}=0.67$ , 小于许多已知的过氧化氢酶 [19-22], 说明可能 BNC 的血红素分子与蛋白结合力较弱, 在纯化过程中损失了部分血红素基团。在 1 mmol/L 连二亚硫酸钠中酶的光吸收几乎不变, 说明 BNC 不被连二亚硫酸钠还原。

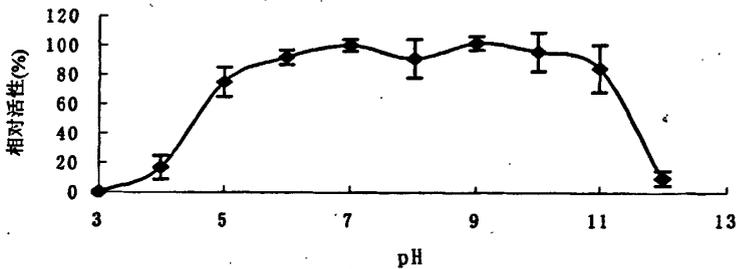


图 4-2 pH 对 BNC 活性的影响。在不同 pH 的 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液中测活, 将 pH7 时活性定为 100%。

Fig. 4-2 Effects of pH on activity of BNC. Catalase assays were done in a buffer of the potassium phosphate, pH 3 to 12.

#### 4.2.3 最适 pH、最适温度与热稳定性

BNC 的最适 pH 在 pH6 到 pH11 (图 4-2), 这种较宽的, 偏碱性的最适 pH 范围是大多数单功能过氧化氢酶的特征 [8,11,19-21]。

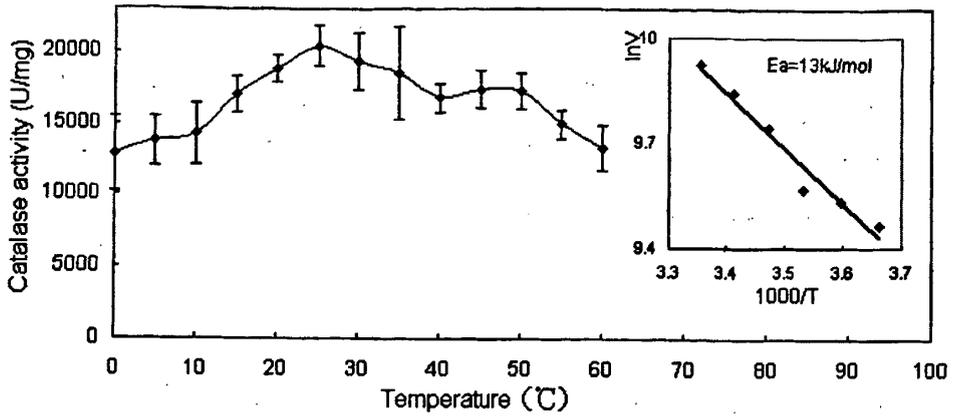


图 4-3 不同温度下 BNC 的活性。内图：以比活的自然对数对热力学温度的倒数的 1000 倍作图，根

据阿伦尼乌斯公式，由直线的斜率计算 BNC 活化能 ( $E_a$ ) 为  $13 \text{ kJ/mol}$

Fig. 4-3 Effects of temperature on activity of BNC. Inset: The logarithm of the specific activity (V) was plotted against the reciprocal ( $\times 1000$ ) of absolute temperature (T). Activation energy ( $E_a$ ) was calculated from the slope of the plot (0 °C to 25 °C).

由图 4-3 可见 BNC 最适温度为 25 °C。酶活性从 0 °C 至 25 °C 的递增及从 25 °C 至 60 °C 的递减并不十分显著，说明 BNC 受温度变化的影响较小。根据阿伦尼乌斯公式  $\ln V = \ln A - E_a/RT$ ，由 0 °C 至 25 °C 酶活数据计算 BNC 活化能  $E_a = 13 \text{ kJ/mol}$

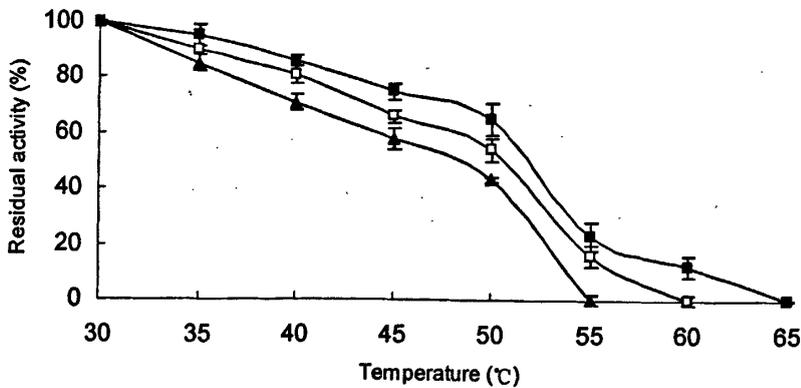


图 4-4 BNC 的热稳定性。酶在不同温度下分别静置 15 min (■)，30 min (□) 和 40 min (▲)，立即在 25 °C 测活。

Fig. 4-4 Effects of temperature on the stability of BNC. BNC was pre-incubated in the buffer containing 50 mM pH 7.5 Tris-Cl for 15 min (■), 30 min (□) or 40 min (▲) at indicated temperatures prior to the reaction in 50 mM potassium phosphate at 25 °C. The heat inactivation of the enzyme is completely irreversible.

图 4-4 说明 BNC 在 60 °C 15 min 仍有 12% 的活性, 但 BNC 在 65 °C 10 min 已无活性。

#### 4.2.4 酶的催化性质

用 4-氨基安替比林法和焦性没食子酸法测活, BNC 无过氧化物酶活性。BNC 与抑制剂混匀 1min 后测活, 在 50% 抑制分数时抑制剂浓度分别为:  $\text{NaN}_3$  1.7  $\mu\text{mol/L}$ , 盐酸羟胺 0.3  $\mu\text{mol/L}$ , 2-巯基乙醇 2mmol/L。分别在 4°C 和 25°C 的不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  条件下测活, 求得 BNC 催化反应动力学参数 (表 4-2), 在室温和低温条件下, 各项参数无明显差异。

表 4-2 常温和低温下 BNC 反应动力学参数

Table 4-2 Kinetic parameters of BNC at 4 °C and 25 °C					
温度	测量值		计算值 <sup>a</sup>		
	$V_{\max}$	$[\text{H}_2\text{O}_2]@V_{\max}/2$	$k_{\text{cat}}$	$K_m$	$k_{\text{cat}}/K_m$
		mM		mM	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
4°C	72200	13.6	149000	41.5	$3.6 \times 10^6$
25°C	77000	15	175000	43.6	$4 \times 10^6$

<sup>a</sup>The calculated parameters (apparent  $K_m$  and  $k_{\text{cat}}$ ) were obtained by fitting the Michaelis-Menten equation to a plot of reaction velocity versus substrate concentration using CurveExpert 1.38 software. Units of  $V_{\max}$  and  $k_{\text{cat}}$  are  $\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mol heme}^{-1} \text{ s}^{-1}$

### 4.3 讨论

过氧化氢酶分为三大类: 单功能过氧化氢酶、过氧化氢—过氧化物酶和锰过氧化氢酶[4,208]。前两类酶的活性中心为血红素, 锰过氧化氢酶活性中心为锰复合物[4]。BNC 的活性受 NaCN 和盐酸羟胺抑制, 说明其活性中心含血红素和三价铁; BNC 的 Soret 带也说明其含有血红素。BNC 是同源四聚体, 无过氧化物酶活性, 不易被连二亚硫酸钠还原, 有较宽的最适 pH 范围。这些都说明 BNC 不是过氧化氢—过氧化物酶, 而是单功能过氧化氢酶[8,11,19-21]。

单功能过氧化氢酶从生化角度根据酶亚基分子大小可分为两类[4]: 含大亚基 (分子量 75-84kD) 的酶与含小亚基 (分子量 55-69kD) 的酶。大亚基酶稳定性高于小亚基酶 (表 4-3)。BNC 属于小亚基单功能过氧化氢酶, 其热稳定性差, 对抑制剂敏感, 这与多数小亚基单功能过氧化氢酶性质一致[7]。

表 4-3 微生物大亚基单功能过氧化氢酶的稳定性

Table 4-3 The stability of microbial large-subunit monofunctional catalases

酶的来源	编号	亚基分子量 (kD)	糖链分子量 (kD)	催化效率 (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	失活处理	参考文献
<i>Aspergillus fumigatus</i>		90	7	未测	80 °C 15 min; 8% SDS 室温 30 min; 40 mM DTT 4 °C 过夜; 8 M 尿素变性电泳; 乙醇氯仿水 (5:3:10) 30 min 处理后仍有活性	[209]
<i>Aspergillus nidulans</i>		92	11.9	未测	不受 9 M 尿素或 2% SDS 抑制; 40 mM 3-氨基三唑 1 h 保持活性 38%	[210]
<i>Aspergillus niger</i>		95	11.8	$0.6 \times 10^6$	0.24 mg/mL 胰蛋白酶 37 °C 1 h 无损失; 65 °C 25 min 保持活性 88%	[7, 211]
<i>Neurospora crassa</i>	酶 I	88	未测	$4.11 \times 10^8$	85 °C 15 min 或 4 M KCl 处理无活性损失; 93 °C 70 min 或 3.5 M 盐酸胍 48h 损失一半; 9 M 尿素 48 h 损失 27%; 11.5% SDS 处理仍有活性	[24]
<i>Escherichia coli</i>	HP II	84	未测	$1.09 \times 10^6$	74 °C 2 h 损失 10%; 4 M 盐酸胍 20 °C 24 h 仍有活性; 7 M 尿素 20 °C 42 h 损失 25%	[7, 212]

前四种酶来自真菌，最后一种酶来自细菌。

大亚基单功能过氧化氢酶常含有糖链，有良好的稳定性。大亚基单功能过氧化氢酶通常在胁迫环境下表达[4]，而 *Bacillus* sp. N2a 生活在环境相对稳定的海水中，不会受温度、盐度等环境胁迫。所以 N2a 不同于 *Bacillus* 的许多种类[1]（如 *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. firmus*, *B. haloduran*, *B. subtilis*），它只有小亚基单功能过氧化氢酶，无大亚基单功能过氧化氢酶。在低温下过氧化氢酶的催化效率是最有利于生物生存的因素，因此高稳定性的大亚基单功能过氧化氢酶对 N2a 生命活动意义不大。可以推测 N2a 在缺少稳定性选择压力的情况下，在低温海水中长期进化失去了大亚基酶。

低温酶活化能一般低于同源的中温酶，更低于同源的高温酶[126,213]。根据阿仑尼乌斯公式  $\ln V = \ln A - E_a/RT$ ，低温酶催化反应速率受温度影响相对较小。虽然小亚基单功能过氧化氢酶的活化能不是在最大反应速率的条件下测定的，测定活化能的条件和方法不完全相同，但这类过氧化氢酶和其它酶相比，其活化能普遍较低。由表 4-4 可见，即使是来自嗜热菌 *Thermus brockianus* 的小亚基单功能过氧化氢酶，其活化能也小于低温生物的蛋白酶、淀粉酶和木聚糖酶。小亚基单功能过氧化氢酶的活化能已经低到可以忽略低温酶与中温酶的活化能差异的程度，可以称为“非温度依赖的酶”[120]。虽然 BNC 比许多中温小亚基单功能过氧化氢酶的活化能还高，但其在 0°C 催化效率和在 25°C 差别不大（表 4-2），表明 BNC 活化能稍高并不影响其在低温下的高催化反应速率。

表 4-4 酶的活化能比较

Table 4-4 Activation energies ( $E_a$ ) of the enzymes

酶	来源	$E_a$ (kJ/mol)	参考文献
小亚基单功能过氧化氢酶	<i>Micrococcus luteus</i>	3.31	[21]
	bovine liver	3.68	[21]
	<i>Vibrio ranoiensis</i>	4.39	[21]
	<i>Halobacterium halobium</i>	6.81	[8]
	<i>Proteus mirabilis</i>	8.12	[22]
	chicken erythrocyte	10.8	[214]
	<i>Bacillus</i> sp. N2a	13	本研究
	<i>Vibrio salmonicida</i>	14.56	[22]b
	<i>Thermus brockianus</i>	29	[20]c
大亚基单功能过氧化氢酶	<i>Neurospora crassa</i>	30.1	[215]
	<i>Penicillium vitale</i>	6.2	[216]
低温胰蛋白酶	Greenland cod	35.3	[126]
低温芽孢杆菌蛋白酶	<i>Bacillus</i> TA41	38.4	[126]
低温 $\alpha$ -淀粉酶	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	37.2	[213]
低温木聚糖酶	<i>Cryptococcus adeliae</i>	47.7	[126]

Activation energies were calculated from Arrhenius plots. <sup>a</sup>Calculated according to the activity from 0 °C to 20 °C. <sup>b</sup>Calculated according to the activity from 4 °C to 12 °C. <sup>c</sup>Calculated according to the activity from 30 °C to 90 °C.

图 4-4 可见 BNC 活性在 60 °C 15 min 损失 88%；而 BNC 在 65 °C 10 min 或在 60 °C 30 min 则完全失活。它比来自两种中温 *Bacillus* 的小亚基过氧化氢酶的热稳定性低 [217, 218]。虽然 BNC 的热稳定性高于 VRC 和 VSC [21, 22]，但根据 BNC 的来源及其较低的最适酶活温度 (25 °C) 和较低的热稳定性，可以将 BNC 归为低温酶。表 4-5 中 VRC 和 VSC 的热稳定性好于许多中温小亚基过氧化氢酶，如来自 *Xanthomonas campestris* 和 *Halobacterium halobium* 的过氧化氢酶，这不符合低温酶热稳定性一般较低的规律。中温小亚基过氧化氢酶热稳定性差别很大，PMC 在 65 °C 的酶活半衰期是 *Pseudomonas aeruginosa* 过氧化氢酶的 280 倍 [7]，而表 4-5 中鸡红细胞过氧化氢酶在 65 °C 酶活半衰期是人红细胞过氧化氢酶的 300 倍；低温酶 BNC、VRC 和 VSC 的热稳定性也有差异。所以低温与中温过氧化氢酶的热稳定性之间的差别并不大于两者内部的热稳定性差别 (表 4-5)。

单功能过氧化氢酶仅在低浓度过氧化氢时才遵循米氏方程的反应动力学 [4, 7]，因此没有底物饱和状态下的最大反应速率。小亚基过氧化氢酶受高浓度过氧化氢的抑制 [7]，所以计算得出的  $k_{cat}$  和  $K_m$  又称表观值，是由低浓度过氧化氢时的酶活推算出的。

小亚基过氧化氢酶表现  $k_{cat}$  和  $K_m$  常大于实际测得的  $V_{max}$  和最大反应速率一半时的过氧化氢浓度。对于 BNC 这种胞内过氧化氢酶而言, 生理条件下其不会达到表观或实测的  $V_{max}$  和  $K_m$  [219], 所以它们不是最重要的参数。最有意义的参数是催化效率, 酶的催化效率  $k_{cat}/K_m$  更好地反映出其降解过氧化氢的能力。小亚基过氧化氢酶催化效率非常高, 酶以接近扩散控制的速率 (diffusion-controlled rate) 催化 [22]。在低温下, BNC 的  $k_{cat}/K_m$  和大多数单功能过氧化氢酶在室温的催化效率一样。这种低温高效催化的能力是 *Bacillus* sp. N2a 在低温生存的保障。虽然小亚基单功能过氧化氢酶低温催化效率研究不多, 但由于过氧化氢酶是催化效率最高的酶之一, 又由于其活化能较低, 所以可以推测大多数中温小亚基过氧化氢酶在低温仍能保持很高的催化效率。如中温酶 PMC 在 4°C 催化效率仍达到  $10^6$  数量级, 和 VSC 与 BNC 这两种低温酶相似 (表 4-5)。表 4-2 和表 4-5 还说明低温酶 BNC、VSC 和 VRC 在室温的催化效率和许多中温酶相当甚至更高。从表 4-5 中可以发现, 在 21 种小亚基单功能过氧化氢酶中, 低温酶 VRC 的催化效率竟是最高的, 低温酶 VSC 催化效率居第四位; 低温酶 BNC 的催化效率比 6 种中温同源蛋白低, 又比其它 11 种中温同源蛋白高。

BNC 和已报道的低温过氧化氢酶 VRC 与 VSC 都是小亚基单功能过氧化氢酶。低温酶 VRC 的比活极高, 主要原因是 *V. rumoiensis* 来自含  $H_2O_2$  的废水 [21], VRC 是 *V. rumoiensis* 在强氧化环境进化的结果。而来自鱼类病原菌 *V. salmonicida* 的 VSC [220], 必须能抵御宿主免疫系统氧化爆发的杀伤, 所以 VSC 有对  $H_2O_2$  的高亲和力 [22]。和 VRC 及 VSC 相比, 来自在南极海水自由生活的细菌的 BNC 更能代表一般的低温过氧化氢酶。

小亚基过氧化氢酶的特殊性使其低温酶与中温酶的界限模糊。低活化能高催化效率的特征使中温过氧化氢酶也有天然的适应低温催化的能力。相对地, 以 BNC 为代表的来自普通低温环境的单功能过氧化氢酶适应低温的性状并不明显, 属于低温酶的特例。

表 4-5 小亚基单功能过氧化氢酶性质比较

Table 4-5 Characters of small-subunit monofunctional catalases

酶的来源	亚基分子量 (kD)	催化效率 <sup>a</sup> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	温度稳定性	参考文献
<i>Vibrio salmonicida</i>	57	6.68×10 <sup>6</sup> (4°C) 7×10 <sup>6</sup> (37°C)	50°C34min 损失 50%, 60°C5min 无活性	[22]
<i>Vibrio rumoiensis</i>	57.3	1.6×10 <sup>7</sup> (20°C)	50°C15min 损失 30%, 55°C15min 损失 65%, 60°C15min 无活性	[21] <sup>b</sup>
<i>Bacillus</i> sp. N2a	56	3.6×10 <sup>6</sup> (4°C)	50°C15min 损失 35%, 55°C15min 损失 77%, 60°C15min 损失 88%	本研究
<i>Bacillus firmus</i>	60	4.58×10 <sup>6</sup> (25°C)	未测	[11] <sup>c</sup>
<i>Bacillus</i> sp. TE124	55	未测	55°C30min 无损失	[218]
<i>Bacteroides fragilis</i>	60	1.36×10 <sup>6</sup> (37°C)	65°C5min 损失 50%	[7]
<i>Bordetella pertussis</i>	54	3.86×10 <sup>6</sup> (37°C)	65°C10min 损失 50%	[7]
<i>Brucella abortus</i>	56	3.23×10 <sup>6</sup> (37°C)	65°C4min 损失 50%	[7]
<i>Halobacterium halobium</i>	62	4.3×10 <sup>6</sup> (25°C)	50°C5min 损失 44%	[8] <sup>c</sup>
<i>Helicobacter pylori</i>	58.5	2.14×10 <sup>6</sup> (37°C)	65°C1min 损失 50%	[7]
<i>Listeria seeligeri</i>	55.9	1.93×10 <sup>6</sup> (37°C)	65°C1min 损失 50%	[7]
<i>Micrococcus luteus</i>	56.9	2.06×10 <sup>6</sup> (37°C)	65°C6min 损失 50%	[7]
<i>Proteus mirabilis</i>	59.4	3.25×10 <sup>6</sup> (4°C)	70°C15min 损失 50%	[22]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57	1.06×10 <sup>6</sup> (37°C)	65°C0.05min 损失 50%	[7]
<i>Pseudomonas syringae</i>	53.5	3.05×10 <sup>6</sup> (37°C)	65°C0.2min 损失 50%	[7]
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	75, 68	8.9×10 <sup>6</sup> (30°C)	30°C30min 损失 50%	[17]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58.4	2.84×10 <sup>6</sup> (37°C)	65°C0.1min 损失 50%	[7]
<i>Xanthomonas campestris</i>	56	3.62×10 <sup>6</sup> (37°C)	30°C10min 损失 20%, 50°C10min 损失 40%	[7, 23]
<i>Thermus brockianus</i>	42.5	4×10 <sup>6</sup> (70°C)	90°C2h 活性不变	[20] <sup>c</sup>
Chicken erythrocyte	57.5	3.9×10 <sup>6</sup> (25°C)	65°C60min 损失 50%	[214] <sup>c</sup>
Bovine liver	59.8	2.28×10 <sup>6</sup> (37°C)	65°C0.3min 损失 50%	[7]
Human erythrocyte	59.8	7.34×10 <sup>6</sup> (37°C)	65°C0.2min 损失 50%	[7]

The first three enzymes are from psychrophilic microorganisms, while the others are from mesophiles except a thermophile *Thermus brockianus*. All enzyme assays were done in a buffer of the potassium phosphate, pH7.0, except the catalase of *B. firmus* in 50 mM Mes-NaOH (pH6.5) and the catalase of *T. brockianus* in 20 mM Tris buffer (pH8). The thermostability of VSC and PMC was determined in 10 mM diethanolamine, pH 9.0.

<sup>a</sup>The experimental  $k_{cat}$  values were corrected to obtain the results for an ideal tetrameric molecule fully saturated in heme. Unit of  $k_{cat}$  is mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mol heme<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> $K_m$ ,  $k_{cat}$  and  $k_{cat} / K_m$  are calculated according to data in this reference.

<sup>c</sup> $k_{cat}$  and  $k_{cat} / K_m$  are calculated according to data in this reference.

## 参考文献

- [1] Klotz M G, Loewen P C. The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from Bacteria into Eukaryota. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(7): 1098~1112
- [2] Salvi M, Battaglia V, Brunati A M, et al. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J Biol Chem*, 2007, 282(33): 24407~24415
- [3] Schriener S E, Linford N J, Martin G M, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*, 2005, 308(5730): 1909~1911
- [4] Chelikani P, Fita I, Loewen P C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(2): 192~208
- [5] Loewen P C, Carpena X, Rovira C, et al. Structure of *Helicobacter pylori* catalase, with and without formic acid bound, at 1.6 Å resolution. *Biochemistry*, 2004, 43(11): 3089~3103
- [6] Kirkman H N, Rolfo M, Ferraris A M, et al. Mechanisms of protection of catalase by NADPH-kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem*, 1999, 274(20): 13908~13914
- [7] Switala J, Loewen P C. Diversity of properties among catalases. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 401(2): 145~154
- [8] Brown-Peterson N J, Salin M L. Purification and characterization of a mesohalic catalase from the halophilic bacterium *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol*, 1995, 177(2): 378~384
- [9] Shima S, Sordel-Klippert M, Brioukhanov A, et al. Characterization of a heme-dependent catalase from *Methanobrevibacter arboriphilus*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7): 3041~3045
- [10] Shima S, Netrusov A, Sordel M, et al. Purification, characterization, and primary structure of a monofunctional catalase from *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol*, 1999, 171(5): 317~323
- [11] Hicks D B. Purification of three catalase isozymes from facultatively alkaliphilic from *Bacillus firmus* OF4. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1229: 347~355
- [12] Zámocký M, Godočínková J, Gašperik J, et al. Expression, purification, and sequence analysis of catalase-1 from the soil bacterium *Comamonas terrigena* N3H. *Protein Express Purif*, 2004, 36(1): 115~123
- [13] Kobayashi I, Tamura T, Sghaier H, et al. Characterization of monofunctional catalase KatA from radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101(4): 315~321
- [14] Dos Santos W G, Pacheco I, Liu M Y, et al. Purification and characterization of an iron superoxide dismutase and a catalase from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *J Bacteriol*, 2000, 182(3): 796~804
- [15] Phucharoen K, Hoshino K, Takenaka Y, et al. Purification, characterization, and gene sequencing of a catalase from an alkali- and halo-tolerant bacterium, *Halomonas* sp. SK1. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(5): 955~962
- [16] Brown S M, Howell M L, Vasil M L, et al. Cloning and characterization of the katB gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase: Purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen. *J Bacteriol*, 1995, 177(22): 6536~6544
- [17] Terzenbach D P, Blaut M. Purification and characterization of a catalase from the nonsulfur phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1 and its role in the oxidative stress response. *Arch Microbiol*, 1998, 169(6): 503~508
- [18] 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 Microbiol*, 2006, 44(2): 185~191
- [19] Ardissonne S, Frendo P, Laurenti E, et al. Purification and physical-chemical characterization of the three hydroperoxidases from the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Biochemistry*, 2004, 43(39): 12692~12699
- [20] Thompson V S, Schaller K D, Apel W A. Purification and characterization of a novel thermo-alkali-stable catalase from *Thermus brockianus*. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(4): 1292~1299
- [21] Yumoto I, Ichihashi D, Iwata H, et al. Purification and characterization of a catalase from the facultatively psychrophilic bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1<sup>T</sup> exhibiting high catalase activity. *J Bacteriol*,

- 2000, 182(7): 1903~1909
- [22] Lorentzen M S, Moe E, Jouve H M, et al. Cold adapted features of *Vibrio salmonicida* catalase: characterization and comparison to the mesophilic counterpart from *Proteus mirabilis*. *Extremophiles*, 2006, 10(5): 427~440
- [23] Chauvatcharin N, Vattanaviboon P, Switala J, et al. Cloning and characterization of *katA*, encoding the major monofunctional catalase from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and characterization of the encoded catalase KatA. *Curr Microbiol*, 2003, 46(2): 83~87
- [24] Díaz A, Rangel P, Montes de Oca Y, et al. Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(11): 1323~1333
- [25] Wang H, Tokusige Y, Shinoyama H, et al. Purification and characterization of a thermostable catalase from culture broth of *Thermoascus aurantiacus*. *J Ferment Bioeng*, 1998, 85(2): 169~173
- [26] Monti D, Baldaro E, Riva S. Separation and characterization of two catalase activities isolated from the yeast *Trigonopsis variabilis*. *Enzyme Microb Tech*, 2003, 32(5): 596~605
- [27] 刘昌玲, 王国庆. 细菌过氧化氢酶的分离、结晶及性质. *生物化学与生物物理进展*, 1990, 17(5): 380~383
- [28] 周一, 严自正, 张树正. 嗜热链霉菌过氧化氢酶的纯化及性质研究. *微生物学报*, 1990, 30(5): 336~343
- [29] 张心齐, 薛燕芬, 赵爱民, 等. 嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp F26 过氧化氢酶的分离纯化及性质研究. *生物工程学报*, 2005, 121(1): 71~77
- [30] 田荟琳, 张坤生. 猪血中过氧化氢酶提取及其性质研究. *食品科学*, 2006, 27(12): 311~314
- [31] 张尔贤, 吴丹奇, 俞丽君, 等. 猪血过氧化氢酶的纯化及其某些性质研究. *药物生物技术*, 1994, 1(2): 5~8
- [32] 邓向军, 余筱洁. 苹果过氧化氢酶的纯化及性质研究. *食品科技*, 2006, 31(11): 66~68
- [33] 肖湘, 邓瑞鹏, 陈芝兰, 等. 牡蛎和泥蚶过氧化氢酶的性质比较. *食品科学*, 2003, 24(9): 32~34
- [34] 林少琴, 兰瑞芳, 余萍, 等. 贻贝过氧化氢酶的纯化及部分性质. *食品科学*, 2000, 21(11): 22~24
- [35] 徐炜虹, 杨齐衡, 路英华, 等. 蚯蚓过氧化氢酶纯化及性质. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 1996, 4: 95~101
- [36] 耿风廷, 赵晓瑜, 高珊. 人过氧化氢酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达. *科技信息(学术研究)*, 2007, 15: 77~78
- [37] 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. *微生物学报*, 2002, 42(3): 348~353
- [38] 白杨, 张亚历, 王继德, 等. 幽门螺杆菌过氧化氢酶基因的克隆、高效表达及活性评价. *中华消化杂志*, 2002, 22(4): 203~205
- [39] 华兆哲, 燕国梁, 堵国成, 等. 枯草杆菌 *Bacillus* sp F26 产过氧化氢酶的发酵条件. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(1): 77~83
- [40] 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. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(2): 74~78
- [41] 曹翔宇, 华兆哲, 燕国梁, 等. 过氧化氢酶发酵生产条件优化及在染整清洁生产中的应用研究. *工业微生物*, 2006, 36(4): 7~12
- [42] 方芳, 李寅, 堵国成, 等. 一株嗜热子囊菌产生的碱性耐热过氧化氢酶及其应用潜力. *生物工程学报*, 2004, 20(3): 423~428
- [43] 洪海军, 许赣荣. 产过氧化氢酶菌株培养条件的优化. *无锡轻工大学学报*, 2004, 23(6): 85~89
- [44] 陆挺, 汪成富, 戴英, 等. 过氧化氢酶发酵性能的研究. *苏州大学学报(自然科学版)*, 2001, 17(3): 95~97
- [45] 刘建忠, 翁丽萍, 计亮年. 表面响应法优化黑曲霉过氧化氢酶的发酵工艺. *微生物学通报*, 2002, 29(5): 17~21
- [46] 王凡强, 王正祥, 邵蔚蓝, 等. 热稳定性过氧化氢酶工程菌株发酵条件的研究. *食品与发酵工业*, 2002, 28(2): 11~14
- [47] 周一, 严自正, 卢运玉, 等. 耐热过氧化氢酶产生菌的筛选和发酵条件的研究. *微生物学报*, 1990, 30(3): 223~227

- [48] Carpena X, Soriano M, Klotz M G, *et al.* Structure of the clade I catalase, CatF of *Pseudomonas syringae*, at 1.8 Å resolution. *Proteins Struct Funct Genet*, 2003, 50(3): 423-436
- [49] Hara I, Ichise N, Kojima K, *et al.* Relationship between the size of the bottleneck 15 Å from iron in the main channel and the reactivity of catalase corresponding to the molecular size of substrates. *Biochemistry*, 2007, 46(1): 11~22
- [50] Alfonso-Prieto M, Borovik A, Carpena X, *et al.* The structures and electronic configuration of compound I intermediates of *Helicobacter pylori* and *Penicillium vitale* catalases determined by X-ray crystallography and QM/MM density functional theory calculations. *J Am Chem Soc*, 2007, 129 (14): 4193~4205
- [51] Melik-Adamyany W, Bravo J, Carpena X, *et al.* Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of HP11 from *Escherichia coli*. *Proteins Struct Funct Genet*, 2001, 44(3): 270~281
- [52] Díaz A, Horjales E, Rudino-Pinera E, *et al.* Unusual Cys-Tyr covalent bond in a large catalase. *J Mol Biol*, 2004, 342(3): 971~985
- [53] Ko T-P, Day J, Malkin A J, *et al.* Structure of orthorhombic crystals of beef liver catalase. *Acta Crystallogr*, 1999, D55(8): 1383~1394
- [54] Murshudov G N, Grebenko A I, Brannigan J A, *et al.* The structures of *Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex. *Acta Crystallogr*, 2002, D58(12): 1972~1982
- [55] Andreoletti P, Pernoud A, Sainz G, *et al.* Structural studies of *Proteus mirabilis* catalase in its ground state, oxidized state and in complex with formic acid. *Acta Crystallogr*, 2003, D59(12): 2163~2168
- [56] Maté M J, Zamocky M, Nykyri L M, *et al.* Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, 1999, 286(1): 135~149
- [57] Putnam C D, Arvai A S, Bourne Y, *et al.* Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol*, 2000, 296(1): 295~309
- [58] Håkansson K O, Brugna M, Tasse L. The three-dimensional structure of catalase from *Enterococcus faecalis*. *Acta Crystallogr*, 2004, D60(8): 1374~1380
- [59] Riise E K, Lorentzen M S, Helland R, *et al.* The first structure of a cold-active catalase from *Vibrio salmonicida* at 1.96 Å reveals structural aspects of cold adaptation. *Acta Crystallogr*, 2007, D63(2): 135~148
- [60] Yamada Y, Fujiwara T, Sato T, *et al.* The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Halocarcularia marismortui*. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(9): 691~695
- [61] Carpena X, Loprasert S, Mongkolsuk S, *et al.* Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol*, 2003, 327(2): 475~489
- [62] Bertrand T, Eady N A J, Jones J N, *et al.* Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. *J Biol Chem*, 2004, 279(37): 38991~38999
- [63] Wada K., Tada T, Nakamura Y, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of catalase-peroxidase from *Synechococcus* PCC 7492. *Acta Cryst*, 2002, D58(1): 157~159
- [64] Barynin V V, Whittaker M M, Antonyuk S V, *et al.* Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. *Structure* 2001, 9(8): 725~738
- [65] Antonyuk S V, Melik-Adamyany V R, Popov A N, *et al.* Three-dimensional structure of the enzyme dimanganese catalase from *Thermus thermophilus* at 1 angstrom resolution. *Crystallogr Rep*, 2000, 45(1): 105~116
- [66] Bravo J, Maté M J, Schneider T, *et al.* Structure of catalase HP11 from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. *Proteins Struct Funct Genet*, 1999, 34(2): 155~166
- [67] Ueda M, Kinoshita H, Maeda S I, *et al.* Structure-function study of the amino-terminal stretch of the catalase subunit molecule in oligomerization, heme binding and activity expression. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(5-6): 488~494
- [68] Chelikani P, Donald L J, Duckworth H W, *et al.* Hydroperoxidase II of *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to proteolytic cleavage compared to other catalases. *Biochemistry*, 2003, 42(19): 5729~5735
- [69] Chelikani P, Carpena X, Perez-Luque R, *et al.* Characterization of a large subunit catalase truncated by proteolytic cleavage. *Biochemistry*, 2005, 44(15): 5597~5605
- [70] Loewen P C, Switala J, von Ossowski I, *et al.* Catalase HP11 of *Escherichia coli* catalyzes the conversion of protoheme to cis-heme d. *Biochemistry*, 1993, 32(38): 10159~10164
- [71] Andreoletti P, Sainz G, Jaquinod M, *et al.* High resolution structure and biochemical properties of a recombinant *Proteus mirabilis* catalase depleted in iron. *Proteins*, 2003, 50(2): 261~271

- [72] Hillar A, Nicholls P, Switala J, et al. NADPH binding and control of catalase compound II formation: comparison of bovine, yeast, and *Escherichia coli* enzymes. *Biochem J*, 1994, 300(2): 531~539
- [73] Kirkman H N, Gaetani G F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(1): 44~50
- [74] Heck D E, Vetrano A M, Mariano T M, et al. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: Unexpected role for catalase. *J Biol Chem*, 2003, 278(25): 22432~22436
- [75] Vetrano A M, Heck D E, Mariano T M, et al. Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *J Biol Chem*, 2005, 280(42): 35372~35381
- [76] Kalko S G, Gelpi J L, Fita I, et al. Theoretical study of the mechanisms of substrate recognition by catalase. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(39): 9665~9672
- [77] Chelikani P, Carpena X, Fita I, et al. An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. *J Biol Chem*, 2003, 278(33): 31290~31296
- [78] Chelikani P, Ramana T, Radhakrishnan T M. Catalase: a repertoire of unusual features. *Indian J Clin Biochem*, 2005, 20(2): 131~135
- [79] Huang X, Holden H M, Raushel F M. Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 149~180
- [80] Smulevich G, Jakopitsch C, Droghetti E, et al. Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *J Inorg Biochem*, 2006, 100 (4): 568~585
- [81] Passardi F, Zamocky M, Favet J, et al. Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: Are there patches of order in chaos? *Gene*, 2007, 397(1-2): 101~113
- [82] Baker R D, Cook C O, Goodwin D C. Properties of catalase-peroxidase lacking its C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(3): 833~839
- [83] 陈祥勤, 袁人星. 生物酶除氧剂在棉针织物精练氧漂一浴工艺中的应用探讨. *针织工业*, 1997, 3: 43~46
- [84] 范梅, 王学福. 脱氧酶在棉针织物前处理工艺中的应用. *针织工业*, 2000, 6: 61
- [85] 张瑞萍. 过氧化氢酶在棉针织物漂染工艺中的应用研究. *印染*, 2000, 26 (8): 12~14
- [86] 何照兴, 袁军. 过氧化氢酶的应用与实践. *印染*, 2001, 27 (5): 29~30
- [87] 王天森. 棉针织物漂染清洁生产工艺措施探讨. *针织工业*, 2001, 6: 46~48
- [88] 吴学君, 程志斌, 王宜田. 特白棉针织物生产工艺研究. *印染助剂*, 2002, 19 (5): 43~45
- [89] 冷晒祥, 钱国砥, 华兆哲, 等. 过氧化氢酶的棉针织物漂染工艺研究. *印染*, 2006, 32 (19): 1~3
- [90] 徐刚. 过氧化氢酶在染纱生产中的应用. *纺织科技进展*, 2005, 2: 29~30
- [91] 董硕, 张利英, 何鹰. 除氧酶 G 在棉纱线染整中的应用. *印染*, 2006, 32 (15): 33~35
- [92] Amorim A M, Gasques M D G, Andreus J, et al. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics. *An Acad Bras Cienc*, 2002, 74(3): 433~436
- [93] Aehle W 主编, 工业酶——制备与应用 (林章凜, 李爽译). 北京: 化学工业出版社, 2005. 209~210
- [94] 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 Biotechnol*, 2001, 89(2-3): 147~153
- [95] Fruhwirth G O, Paar A, Gudelj M, et al. An immobilised catalase peroxidase from the alkalothermophilic *Bacillus* SF for the treatment of textile-bleaching effluents. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(3): 313~319
- [96] Costa S A, Tzanov T, Paar A, et al. Immobilization of catalases from *Bacillus* SF on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme Microbial Technol*, 2001, 28(9-10): 815~819
- [97] Paar A, Raninger A, de Sousa F, et al. Production of catalase-peroxidase and continuous degradation of hydrogen peroxide by an immobilised alkalothermophilic *Bacillus* sp.. *Food Technol Biotechnol*, 2003, 41(2): 101~104
- [98] Oh S-H, Yu H-J, Kim M-S, et al. Biodegradation of hydrogen peroxide in semiconductor industrial wastewater with catalase from *Micrococcus* sp. *J Food Sci Nutr*, 2002, 7(1): 33~36
- [99] Yoon D S, Won K, Kim Y H, et al. Continuous removal of hydrogen peroxide with immobilised catalase for wastewater reuse. *Water Sci Technol*, 2007, 55(1-2): 27~33
- [100] 王璋主编. 食品酶学. 北京: 中国轻工业出版社, 1990. 17
- [101] 何国庆, 丁立孝主编. 食品酶学. 北京: 化学工业出版社, 2006. 218~272
- [102] Tarhan L. Use of immobilized catalase to remove H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> used in the sterilization of milk. *Process*

- Biochem, 1995, 30(7): 623-628
- [103] 范孝用, 戴平. 葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶体系在牛奶保鲜中的应用. 中国食品工业, 1999, 2:24-27
- [104] 相沢孝亮, 小野正之, 手塚隆久, 等. 酶应用手册 (黄文涛, 胡学智译). 上海: 上海科学技术出版社, 1989. 385-387
- [105] 薛细平, 陈荣, 赵一兵, 等. 过氧化氢酶的荧光法测定及其在海洋环境污染评估中的应用. 厦门大学学报: 自然科学版, 2003, 42(1): 83-86
- [106] 东秀珠, 蔡妙英, 等编. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 353-388
- [107] Fukui M, Kanoh M, Takamatsu Y, et al. Analysis of serum catalase activities in pancreatic diseases. J Gastroenterol, 2004, 39(5): 469-474
- [108] Alaçam A, Tulunoğlu Ö, Oygür T, et al. Effects of topical catalase application on dental pulp tissue: a histopathological evaluation. J Dent, 2000, 28(5): 333-339
- [109] Gu J S, Wang Y X, Jiao Q. Effect of catalase on biocatalytic synthesis of pyruvate by enzymes from *Pseudomonas* sp. Chinese Chem Lett, 2004, 15(11): 1299-1302
- [110] Shi X, Feng M, Zhao Y, et al. Overexpression, purification and characterization of a recombinant secretory catalase from *Bacillus subtilis*. Biotechnol Lett, 2008, 30(1): 181-186
- [111] Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. Nat Rev Microbiol, 2003, 1(12): 200-208
- [112] Auman A J, Breezee J L, Gosink J J, et al. *Psychromonas ingrahamii* sp. nov., a novel gas vacuolate, psychrophilic bacterium isolated from Arctic polar sea ice. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56(5): 1001-1007
- [113] Morita R Y. Psychrophilic bacteria. Bacteriol Rev, 1975, 39(2): 144-167
- [114] Cavicchioli R. Cold-adapted archaea. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(5): 331-343
- [115] Morgan-Kiss R M, Priscu J C, T Pockock, et al. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(1): 222-252
- [116] Margesin R, Neuner G, Storey K. B. Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects. Naturwissenschaften, 2007, 94(2): 77-99
- [117] Saunders N F, Thomas T, Curmi P M, et al. Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii*. Genome Res, 2003, 13(7): 1580-1588
- [118] Noon K R, Guymon R, Crain P F, et al. Influence of temperature on tRNA modification in Archaea: *Methanococcoides burtonii* (optimum growth temperature [Topt], 23°C) and *Stetteria hydrogenophila* (Topt, 95°C). J Bacteriol, 2003, 185(18): 5483-5490
- [119] Giaquinto L, Curmi P M, Siddiqui K S, et al. Structure and function of cold shock proteins in archaea. J Bacteriol, 2007, 189(15): 5738-5748
- [120] Georlette D, Blaise V, Collins T, et al. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. FEMS Microbiol Rev, 2004, 28(1): 25-42
- [121] Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, et al. Fungi in Antarctica. Rev Environ Sci Biotechnol, 2007, 6(1-3): 127-141
- [122] Marx J C, Collins T, D'Amico S, et al. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms. Mar Biotechnol, 2007, 9(3): 293-304
- [123] Feller G, Narinx E, Arpigny J L, et al. Enzymes from psychrophilic organisms. FEMS Microbiol Rev, 1996, 18(2-3): 189-202
- [124] Siddiqui K S, Cavicchioli R. Cold-adapted enzymes. Annu Rev Biochem, 2006, 75: 403-433
- [125] Hoyoux A, Blaise V, Collins T, et al. Extreme catalysts from low-temperature environments. J Biosci Bioeng, 2004, 98(5): 317-330
- [126] Lonhienne T, Gerday C, Feller G. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. Biochim Biophys Acta, 2000, 1543(1): 1-10
- [127] Feller G. Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. Cell Mol Life Sci, 2003, 60(4): 648-662
- [128] D'Amico S, Collins T, Marx J-C, et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. EMBO reports, 2006, 7(4): 385-389
- [129] Gillis M, Vandamme P, De Vos P, et al. Polyphasic Taxonomy. In: Brenner D J, Krieg N R, Staley J T, eds. Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, 2nd ed. Vol. 2. The Proteobacteria, Part A Introductory Essays. New York: Springer Science Business Media, Inc., 2005. 43-48
- [130] Keller M, Zengler K. Tapping into microbial diversity. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(2): 141-150

- [131] L'Haridon S, Reysenbach A-L, Tindall B J, et al. *Desulfurobacterium atlanticum* sp. nov., *Desulfurobacterium pacificum* sp. nov. and *Thermovibrio guaymasensis* sp. nov., three thermophilic members of the Desulfurobacteriaceae fam. nov., a deep branching lineage within the Bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006, 56(12): 2843-2852
- [132] Nunoura T, Oida H, Miyazaki M, et al. *Marinitoga okinawensis* sp. nov., a novel thermophilic and anaerobic heterotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field, Southern Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(3): 467-471
- [133] Moussard H, L'Haridon S, Tindall B J, et al. *Thermodesulfatator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(1): 227-233
- [134] Mori K, Kakegawa T, Higashi Y, et al. *Oceanithermus desulfurans* sp. nov., a novel thermophilic, sulfur-reducing bacterium isolated from a sulfide chimney in Suiyo Seamount. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(5): 1561-1566
- [135] Miroshnichenko M L, Slobodkin A I, Kostrikin N A, et al. *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53(5): 1637-1641
- [136] Nunan L M, Lightner D V, Oduori M A, et al. *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55(6): 2317-2322
- [137] Cho J C, Vergin K L, Morris R M, et al. *Lentisphaera araneosa* gen. nov., sp. nov., a transparent exopolymer producing marine bacterium, and the description of a novel bacterial phylum, *Lentisphaerae*. *Environ Microbiol*, 2004, 6(6): 611-621
- [138] Schlesner H, Rensmann C, Tindall B J, et al. Taxonomic heterogeneity within the Planctomycetales as derived by DNA-DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. and emended description of the genus *Pirellula*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(5): 1567-1580
- [139] Yoon J, Oku N, Matsuda S, et al. *Pelagicoccus croceus* sp. nov., a novel marine member of the family Puniceococcaceae within the phylum 'Verrucomicrobia' isolated from seagrass. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(12): 2874-2880
- [140] Rappe M S, Giovannoni S J. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol*, 2003, 57: 369-394
- [141] Taylor M W, Radax R, Steger D, et al. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71(2): 295-347
- [142] Tindall B J. Prokaryotic diversity in the Antarctic: The tip of the iceberg. *Microb Ecol*, 2004, 47(3): 271-283
- [143] Murray A E, Grzymalski J J. Diversity and genomics of Antarctic marine micro-organisms. *Phil Trans R Soc B*, 2007, 362(1488): 2259-2271
- [144] Abele D, Ferreyra G A, Schloss I. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation from photochemical production and atmospheric wet deposition in Antarctic coastal and off-shore waters of Potter Cove, King George Island, South Shetland Islands. *Antarct Sci*, 1999, 11(2): 131-139
- [145] Hernandez E, Ferreyra G A, MacCormack W P. Effect of solar radiation on two Antarctic marine bacterial strains. *Polar Biol*, 2002, 25(6): 453-459
- [146] 施特尔特马赫 B. 酶的测定方法(钱嘉渊译). 北京: 中国轻工业出版社, 1992. 186-193
- [147] Beers R F Jr., Sizerl W. A spectrophotometric method for measuring the break down of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*, 1952, 195 (1): 276-287
- [148] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal Biochem*, 1976, 72 (1-2): 248-254
- [149] Gerhardt P 主编. 普通细菌学方法手册(厦门大学生物系微生物学教研室译). 厦门: 厦门大学出版社, 1989. 511-545
- [150] Halebian S, Harris B, Finegold S M, et al. Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *J Clinical Microbiol*, 1981, 13(3): 444-448
- [151] Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note 101. Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA. 2006.
- [152] Stránský K, Jursík T, Vitek A. Standard equivalent chain length values of monoenic and polyenic (methylene interrupted) fatty acids. *J High Resol Chromatogr*, 1997, 20(3): 143-158
- [153] Stránský K, Jursík T, Vitek A, et al. An improved method of characterizing fatty acids by equivalent chain length values. *J High Resol Chromatogr*, 1992, 15(11): 730-740
- [154] 奥斯伯 F M, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南(颜子颖, 王海林译). 北

- 京: 科学出版社, 1998. 39~42
- [155] Chun J, Lee J-H, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(10): 2259~2261
- [156] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(24): 4876~4882
- [157] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596~1599
- [158] Tavares F, Bernardo L, Sellstedt A. Identification and expression studies of a catalase and a bifunctional catalase-peroxidase in *Frankia* strain R43. *Plant Soil*, 2003, 254(1): 75~81
- [159] Täubel M, Kämpfer P, Buczolits S, et al. *Bacillus barbaricus* sp. nov., isolated from an experimental wall painting. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53(3): 725~730
- [160] Shivaji S, Suresh K, Chaturvedi P, et al. *Bacillus arsenicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from a siderite concretion in West Bengal, India. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55(3): 1123~1127
- [161] Zhang T, Fan X, Hanada S, et al. *Bacillus macauensis* sp. nov., a long-chain bacterium isolated from a drinking water supply. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56(2): 349~353
- [162] De Clerck E, Rodriguez-Díaz M, Vanhoutte T, et al. *Anoxybacillus contaminans* sp. nov. and *Bacillus gelatini* sp. nov., isolated from contaminated gelatin batches. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(3): 941~946
- [163] Karentz D, Bosch I. Influence of ozone-related increases in ultraviolet radiation on Antarctic marine organisms. *Am Zool*, 2001, 41(1): 3~16
- [164] 唐丹玲, 唐文胜. 产过氧化氢酶的乳酸菌的筛选和产酶条件的研究. *食品与发酵工业*, 1992, 6: 30~33
- [165] Knauf H J, Vogel R F, Hammes W P. Cloning, sequence, and phenotypic expression of katA, which encodes the catalase of *Lactobacillus sake* LTH677. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(3): 832~839
- [166] Yoon J H, Kim I G, Kang K H, et al. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53(5): 1297~1303
- [167] Yoon J H, Kim I G, Kang K H, et al. *Bacillus hwajinpoensis* sp. nov. and an unnamed *Bacillus* genomospecies, novel members of *Bacillus* rRNA group 6 isolated from sea water of the East Sea and the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(3): 803~808
- [168] Rodrigues D F, Tiedje J M. Coping with our cold planet. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(6): 1677~1686
- [169] Nedashkovskaya O I, Vancanney M, Dawyndt P, et al. Reclassification of [Cytophaga] *marinoflava* Reichenbach 1989 as *Leeuwenhoekella marinoflava* gen. nov., comb. nov. and description of *Leeuwenhoekella aequorea* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55 (3): 1033~1038
- [170] Van Trappen S, Tan T-L, Yang J, et al. *Alteromonas stellipolaris* sp. nov., a novel, budding, prosthecate bacterium from Antarctic seas, and emended description of the genus *Alteromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54 (4): 1157~1163
- [171] Logan N A, Lebbe L, Hoste B, et al. Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(5): 1741~1753
- [172] Logan N A, Lebbe L, Verhelst A, et al. *Bacillus luciferensis* sp. nov., from volcanic soil on Candlemas Island, South Sandwich archipelago. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52(6): 1985~1989
- [173] Logan N A, Lebbe L, Verhelst A, et al. *Bacillus shackletonii* sp. nov., from volcanic soil on Candlemas Island, South Sandwich archipelago. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(2): 373~376
- [174] Euzéby J P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47(2): 590~592 (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Full update September 04, 2007. URL: <http://www.bacterio.net>)
- [175] Ash C, Farrow J A E, Wallbanks S, et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* as revealed by comparative analysis of small-subunit ribosomal-RNA sequences. *Lett Appl Microbiol*, 1991, 13(4): 202~206
- [176] Priest F G, Goodfellow M, Todd G. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J Gen Microbiol*,

- 1988, 134(7): 1847~1882
- [177] Garrity G M, Lilburn T G, Cole J R, et al. Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea, release 7.7. Michigan State University Board of Trustees, 2007. 333~398
- [178] Goto K, Omura T, Hara Y, et al. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J Gen Appl Microbiol*, 2000, 46(1): 1~8
- [179] Xu D, Côté J-C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53(3): 695~704
- [180] Stamatakis A. RAxML-VI-HPC maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 2006, 22(21): 2688~2690
- [181] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572~1574
- [182] Holder M, Lewis P O. Phylogeny estimation, traditional and bayesian approaches. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(4): 275~284
- [183] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95~98
- [184] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817~818
- [185] Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 1993, 10(3): 512~526
- [186] Tavaré S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lec Math Life Sci*, 1986, 17: 57~86
- [187] Moreira D, von der Heyden S, Bass D, et al. Global eukaryote phylogeny: Combined small- and large-subunit ribosomal DNA trees support monophyly of Rhizaria, Retaria and Excavata. *Mol Phylogenet Evol*, 2007, 44(1): 255~266
- [188] Zhang L, Xu Z, Patel B K C. *Bacillus decisifrondis* sp. nov., isolated from soil underlying decaying leaf foliage. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(5): 974~978
- [189] La Duc M T, Satomi M, Venkateswaran K. *Bacillus odysseyi* sp. nov., a round-spore-forming bacillus isolated from the Mars Odyssey spacecraft. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(1): 195~201
- [190] Rheims H, Fruhling A, Schumann P, et al. *Bacillus silvestris* sp. nov., a new member of the genus *Bacillus* that contains lysine in its cell wall. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49(2): 795~802
- [191] Nicolaus B, Lama L, Esposi E, et al. "*Bacillus thermocantarcticus*" sp. nov., from Mount Melbourn, Antarctica: a novel thermophilic species. *Polar Biol*, 1996, 16(2): 101~104
- [192] Nielsen P, Rainey F A, Ottrup H, et al. Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, 117(1): 61~65
- [193] Santini J M, Streimann I C A, vanden Hoven R N. *Bacillus macyae* sp. nov., an arsenate-respiring bacterium isolated from an Australian gold mine. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(6): 2241~2244
- [194] Ghosh A, Bhardwaj M, Satyanarayana T, et al. *Bacillus lehensis* sp. nov., an alkalitolerant bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(2): 238~242
- [195] Nowlan B, Dodia M S, Singh S P, et al. *Bacillus okhensis* sp. nov., a halotolerant and alkalitolerant bacterium from an Indian saltpan. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56(5): 1073~1077
- [196] Nogi Y, Takami H, Horikoshi K. Characterization of alkaliphilic *Bacillus* strains used in industry: proposal of five novel species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55(6): 2309~2315
- [197] Lim J-M, Jeon C O, Kim C-J. *Bacillus taeanensis* sp. nov., a halophilic Gram-positive bacterium from a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56(12): 2903~2908
- [198] Lim J-M, Jeon C O, Lee S-M, et al. *Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, spore-forming bacterium isolated from a salt lake in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56(2): 373~377
- [199] Wang Q, Li W, Liu Y, et al. *Bacillus qingdaonensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic bacterium isolated from a crude sea-salt sample collected near Qingdao in eastern China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(5): 1143~1147
- [200] Bonjour F, Aragno M. *Bacillus tusciae*, a new species of thermoacidophilic, facultatively

- chemolithoautotrophic, hydrogen oxidizing sporeformer from a geothermal area. *Arch Microbiol*, 1984, 139(4): 397~401
- [201] Kitahara K, Suzuki J. *Sporolactobacillus* nov. subgen. *J Gen Appl Microbiol*, 1963, 9(1): 59~71
- [202] Boone D R, Liu Y, Zhao Z-J, et al. *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45(3): 441~448
- [203] Combet-Blanc Y, Ollivier B, Streicher C, et al. *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amylolytic bacterium. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45(1): 9~16
- [204] Yoon J-H, Kang S S, Lee K C, et al. *Planomicrobium koreense* gen. nov., sp. nov., a bacterium isolated from the Korean traditional fermented seafood jeotgal, and transfer of *Planococcus okeanokoites* (Nakagawa *et al.* 1996) and *Planococcus mcmeekinii* (Junge *et al.* 1998) to the genus *Planomicrobium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51(4): 1511~1520
- [205] Cavicchioli R, Siddiqui K S, Andrews D, et al. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(3): 253~261
- [206] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259): 680~685
- [207] Woodbury W, Spencer A K, Stahman M A. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem*, 1971, 44 (1): 301~305
- [208] Klassen G R, Loewen P C, Klotz M G. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol Biol Evol*, 1997, 14 (9): 951~958
- [209] Lopez-Medrano R, Ovejero M C, Calera J A, et al. An immunodominant 90-kilodalton *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase. *Infect Immun*, 1995, 63(12): 4774~4780
- [210] Calera J A, Sanchez-Weatherby J, Lopez-Medrano R, et al. Distinctive properties of the catalase B of *Aspergillus nidulans*. *FEBS Lett*, 2000, 475(2): 117~120
- [211] Wasserman B P, Hultin H O. Effect of deglycosylation on the stability of *Aspergillus niger* catalase. *Arch Biochem Biophys*, 1981, 212(2): 385~392
- [212] Switala J, O'Neil J O, Loewen P C. Catalase HPII from *Escherichia coli* exhibits enhanced resistance to denaturation. *Biochemistry*, 1999, 38(13): 3895~3901
- [213] D'Amico S, Marx J C, Gerday C, et al. Activity stability relationships in extremophilic enzymes. *J Biol Chem*, 2003, 278(10): 7891~7896
- [214] Aydemir T, Kuru K. Purification and partial characterization of catalase from chicken erythrocytes and the effect of various inhibitors on enzyme activity. *Turk J Chem*, 2003, 27(1): 85~97
- [215] Jacob G S, Orme-Johnson W H. Catalase of *Neurospora crassa*. 1. Induction, purification, and physical properties. *Biochemistry*, 1979, 18(14): 2967~2975
- [216] Latyshko N V, Gudkova L V. The kinetic and catalytic properties of *Penicillium vitale* catalase. *Ukr Biokhim Zh*, 1996, 68(2): 69~73
- [217] Fusho Y, Yajima Y. Catalase from *Bacillus subtilis* IAM 1026 (Ferm BP-4844). US Patent 5486467, 1996
- [218] Ni J, Tokuyama S, Sogabe A, et al. Cloning and high expression of catalase gene from *bacillus* sp. TE124. *J Biosci Bioeng*, 2001, 91(4): 422~424
- [219] Seaver L C, Imlay J A. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001, 183(24): 7182~7189
- [220] Egidius E, Wiik R, Andersen K, et al. *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol*, 1986, 36(4): 518~520

附录 1 GenBank accession numbers for 16S rDNA sequences of Bacillaceae species used in this study

Species	Strain	GenBank Accession No.	Correction Note
<i>B. acidicola</i>	DSM 14745T	AF547209 1548 bp	1*
<i>B. aeolus</i>	DSM 15084T	AJ504797 1403 bp	3*
<i>B. aerius</i>	MTCC 7303T	AJ831843 1494 bp	5*
<i>B. aerophilus</i>	MTCC 7304T	AJ831844 1488 bp	4*
<i>B. agaradhaerens</i>	DSM 8721T	X76445 1521 bp	2 bases, according to AY553093 and AB211544
<i>B. akibei</i>	JCM 9157T	AB043858 1546 bp	11*
<i>B. alkalophilus</i>	DSM 485T	X76436 1505 bp	3 bases, according to X60603
<i>B. algicola</i>	KMM 3737T	AY228462 1545 bp	2 bases, according to DQ001307 and DQ001308
<i>B. altitudinis</i>	MTCC 7306T	AJ831842 1506 bp	
<i>B. alveayuensis</i>	KCTC 10634T	AY605232 1532 bp	2*
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NBRC 15535T	AB255669 1472 bp	
<i>B. anthracis</i>	ATCC 14578T	AB190217 1306bp + X55059 2nd-77th	Append sequences according to AE017225 Region9336-10845
<i>B. aquimaris</i>	KCCM41589T	AF483625 1507 bp	
<i>B. arseniciselenatis</i>	DSM 15340T	AF064705 1533 bp	2 bases, according to AJ865469
<i>B. arsenicus</i>	DSM 15822T	AJ606700 1515 bp	2*
<i>Viridibacillus arvi</i>	LMG 22165T	AJ627211 1505 bp	
<i>B. asahii</i>	JCM 12112T	AB109209 1504 bp	5*
<i>B. atrophaeus</i>	JCM 9070T	AB021181 1515 bp	
<i>B. azotoformans</i>	DSM 1046T	D78309 1432 bp	35 bases, according to ATCC 29788T (X60609)
<i>B. bacillus</i>	ATCC 14574T	X77790 1442 bp	
<i>B. barbaricus</i>	DSM 14730T	AJ422145 1421 bp	4*
<i>B. bataviensis</i>	LMG 21833T	AJ542508 1502 bp	1 base, according to AJ542507
<i>B. berzoevorans</i>	NCIMB 12555T	X60611 1430 bp	7 bases, according to DSM 5391T (D78311)
<i>B. bogoriensis</i>	LMG 22234T	AY376312 1434 bp	4*
<i>B. boroniphilus</i>	DSM 17376T	AB198719 1500 bp	
<i>B. carboniphilus</i>	JCM 9731T	AB021182 1504 bp	
<i>B. cellulolyticus</i>	DSM 2522T	AB043852 1505 bp	
<i>B. cereus</i>	IAM 12605T	D16266 1486 bp	
<i>B. cibi</i>	KCTC 3880T	AY550276 1493 bp	
<i>B. circulans</i>	ATCC 4513T	AY724690 1487 bp	1 base, according to NBRC 13626T (AB271747)
<i>B. clarkii</i>	DSM 8720T	X76444 1522 bp	1*
<i>B. clausii</i>	DSM 8716T	X76440 1505 bp	4*
<i>B. coagulans</i>	ATCC 7050T	DQ297928 1549 bp	1 base, according to NBRC 12583T (AB271752)
<i>B. cohnii</i>	DSM 6307T	X76437 1506 bp	1 base, according to AB023412
<i>B. decisitronidis</i>	JCM 13601T	DQ465405 1305 bp	
<i>B. decolorationis</i>	LMG 19507T	AJ315075 1503 bp	
<i>B. drentensis</i>	LMG 21831T	AJ542506 1438 bp	Added 15 bases according to AJ542506 and DQ275176
<i>B. edaphicus</i>	VKPM B-7517T	AB045093 1490 bp	15 bases, according to AF006076
<i>B. endophyticus</i>	CIP 106778T	AF295302 1470 bp	2 bases, according to DQ485415
<i>B. ferruginis</i>	LMG 22081T	AY443036 1416 bp	Added 18 bases according to AY443034 and AY443037
<i>B. fastidiosus</i>	DSM 91T	X60615 1428 bp	6*
<i>B. firmus</i>	IAM 12464T	D16268 1483 bp	3 bases, according to NBRC 15306T (AB271750)
<i>B. flexus</i>	DSM 1320T	AB021185 1529 bp	
<i>B. foraminis</i>	LMG 23174T	AJ717382 1534 bp	

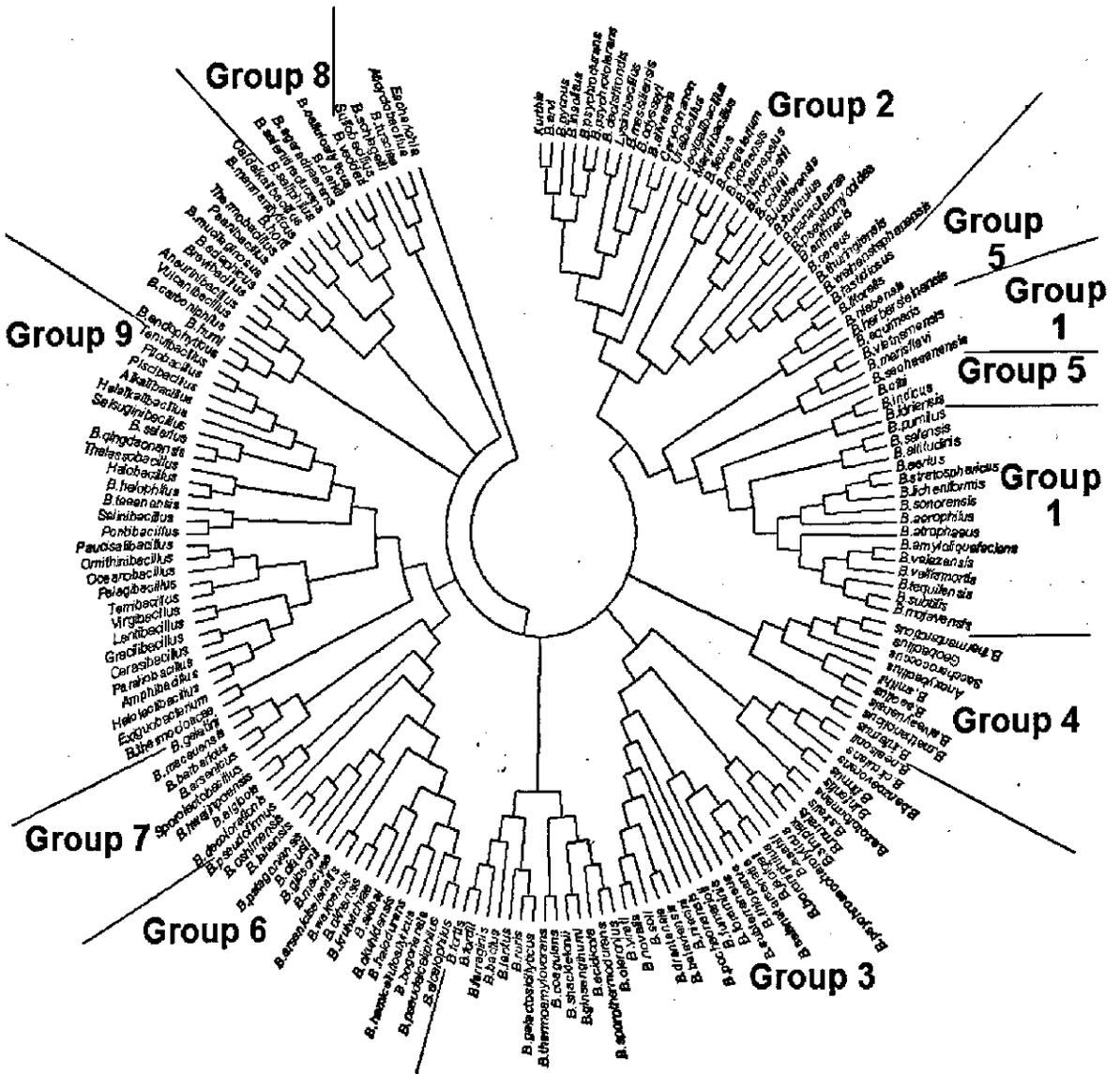
<i>B. forli</i>	LMG 22080T	AY443039 1462 bp	2*
<i>B. fortis</i>	LMG 22079T	AY443038 1541 bp	2*
<i>B. fumaroli</i>	LMG 17489T	AJ250056 1466 bp	2 bases, according to AJ250057, AJ250058 and AJ250059
<i>B. funiculus</i>	JCM 11201T	AB049195 1530 bp	
<i>B. galactosidilyticus</i>	LMG 17892T	AJ535638 1486 bp	1*
<i>B. gelatini</i>	LMG 21880T	AJ551329 1485 bp	
<i>B. ginsenghumi</i>	DSM 18134T	AB245378 1499 bp	
<i>B. gibsonii</i>	DSM 8722T	X76446 1506 bp	2 bases, according to AY37309, AJ880003 and AB111933
<i>B. halmapalus</i>	DSM 8723T	X76447 1504 bp	2 bases, according to AB111938 and AB055097
<i>B. halodurans</i>	ATCC 27557T	AB021187 1508 bp	2 bases according to NC_002570
<i>Salimicrobium halophilus</i>	DSM 4771T	AJ243920 1425 bp	1*
<i>B. hemicellulosilyticus</i>	DSM 16731T	AB043846 1535 bp	1*
<i>B. herbersteinensis</i>	DSM 16534T	AJ781029 1464 bp	2 bases, according to AJ316317 and DQ108404
<i>B. horikoshii</i>	DSM 8719T	X76443 1529 bp	2 bases, according to AB043865 and DQ333286
<i>B. horii</i>	JCM 9943T	D87035 1512 bp	7 bases, according to AB111936 and AB112007
<i>B. humi</i>	LMG 22167T	AJ627210 1504 bp	1 base, according to AJ627209
<i>B. hwajinpoensis</i>	JCM 11807T	AF541966 1507 bp	1*
<i>B. ichiensis</i>	SMC 4352-2T	AY904033 1437 bp	
<i>B. indicus</i>	MTCC 4374T	AJ583158 1505 bp	3*
<i>B. infantis</i>	SMC 4352-1T	AY904032 1367 bp	
<i>B. infernus</i>	DSM 10277T	U20385 1508 bp	5 bases, according to U20384
<i>B. insolitus</i>	DSM 5T	X60642 1431 bp	4 bases, according to AF478084 and AJ920000
<i>B. jeotgali</i>	CIP 107104T	AF221061 1505 bp	
<i>B. koreensis</i>	DSM 16467T	AY667496 1370 bp	
<i>B. krulwichiae</i>	NCIMB 13904T	AB086897 1507 bp	12 bases, according to AY347311 and AB018595
<i>B. lehensis</i>	MTCC 7633T	AY793550 1541 bp	Deleted the last 13 bases*
<i>B. lentus</i>	IAM 12466T	D16272 1486 bp	3 bases, according to JCM 2511T (D78315)
<i>B. licheniformis</i>	DSM 13T	X68416 1545 bp	
<i>B. litoralis</i>	KCTC 3898T	AY608605 1505 bp	
<i>B. luciferensis</i>	LMG 18422T	AJ419629 1502 bp	2 bases, according to DQ374637, AY514023 and DQ854980
<i>B. macauensis</i>	DSM 17262T	AY373018 1355 bp	
<i>B. macyae</i>	DSM 16346T	AY032801 1512 bp	
<i>B. mannanilyticus</i>	DSM 16130T	AB043864 1547 bp	
<i>B. marisflavi</i>	KCCM 41588T	AF483624 1506 bp	
<i>B. massiliensis</i>	CIP 108446T	AY677116 1472 bp	1 base, according to AM489493 and DQ350816
<i>B. megaterium</i>	IAM 13418T	D16273 1486 bp	
<i>B. methanolicus</i>	NCIMB 13113T	X64465 1549 bp	3*
<i>B. mojavensis</i>	IFO 15718T	AB021191 1526 bp	
<i>B. mucilaginosus</i>	VKPM B-7519T	AB045091 1484 bp	Added 12 bases according to AF006077
<i>B. muralis</i>	LMG 20238T	AJ628748 1504 bp	1*
<i>B. mycolides</i>	ATCC 6462T	AB021192 1513 bp	
<i>B. nealsonii</i>	ATCC BAA-519T	AF234863 1215 bp	6*
<i>B. niabensis</i>	DSM 17723T	AY998119 1478 bp	
<i>B. niacini</i>	DSM 2923T	AB021194 1526 bp	
<i>B. novalis</i>	LMG 21837T	AJ542512 1503 bp	2 bases, according to AJ542510 and AJ542511
<i>B. odyssseyi</i>	ATCC PTA-4993T	AF526913 1516 bp	

<i>B. okhensis</i>	JCM 13040T	DQ026060 1467 bp	
<i>B. okuhidensis</i>	JCM 10945T	AB047684 1452 bp	3*
<i>B. oleronius</i>	DSM 9356T	X82492 1519 bp	3 bases, according to ATCC 700005T (AY988598)
<i>B. oshimensis</i>	JCM 12663T	AB188090 1467 bp	11 bases, according to AB043850
<i>B. panaciterrae</i>	KCTC 13929T	AB245380 1476 bp	
<i>B. patagoniensis</i>	DSM 16117T	AY258614 1402 bp	
<i>B. pocheonensis</i>	Geol 420T	AB245377 1495 bp	
<i>B. pseudocaliphilus</i>	DSM 8725T	X76449 1518 bp	
<i>B. pseudofirmus</i>	DSM 8715T	X76439 1506 bp	
<i>B. pseudomycooides</i>	NRRL B-617T	AF013121 1520 bp	13 bases, according to DSM 12442T (AJ841871)
<i>B. psychrodurans</i>	DSM 11713T	AJ277984 1486 bp	
<i>B. psychrosaccharolyticus</i>	ATCC 23296T	AB021195 1507 bp	
<i>B. psychrotolerans</i>	DSM 11706T	AJ277983 1488 bp	
<i>B. pumilus</i>	DSM 27T	AY456263 1481 bp	2*
<i>B. pycnus</i>	JCM 11075T	AF169531 1411 bp	1 base, according to AF169534 and AF169535
<i>B. qingdaonensis</i>	JCM 14087T	DQ115802 1572 bp	
<i>B. raris</i>	LMG 22866T	AJ535639 1423 bp	
<i>B. safensis</i>	ATCC BAA-1126T	AF234854 1434 bp	
<i>B. salaries</i>	DSM 16461T	AY667494 1380 bp	2*
<i>B. saliphilus</i>	DSM 15402T	AJ493660 1524 bp	
<i>B. schlegelii</i>	ATCC 43741T	AB042060 1515 bp	1 base, according to DSM 2000T (Z26934)
<i>B. selenatarсенatis</i>	JCM 14380T	AB262082 1413 bp	
<i>B. selenitireducens</i>	DSM 15326T	AF064704 1449 bp	2 bases, according to DQ206426 and AY669375
<i>B. seohaeanensis</i>	DSM 16464T	AY667495 1401 bp	1 base, according to DQ314539
<i>B. shackletonii</i>	LMG 18435T	AJ250318 1503 bp	
<i>B. silvestris</i>	LMG18991T	AJ006086 1528 bp	
<i>B. simplex</i>	DSM 1321T	AJ439078 1522 bp	2 bases, according to LMG 11160T (AJ628743)
<i>B. siralis</i>	NCIMB 13601T	AF071856 1523 bp	
<i>B. smithii</i>	DSM 4216T	Z26935 1524 bp	2 bases, according to DSM 4216T (X60643)
<i>B. soil</i>	LMG 21838T	AJ542513 1441 bp	2 bases, according to AJ542514
<i>B. sonorensis</i>	NRRL B-23154T	AF302118 1410 bp	
<i>B. sporothermodurans</i>	DSM 10599T	U49078 1497 bp	
<i>B. stratosphericus</i>	MTCC 7305T	AJ831841 1494 bp	8*
<i>B. subterraneus</i>	DSM 13966T	AY672638 1230 bp	2*
<i>B. subtilis</i>	IAM 12118T	AB042061 1553 bp	
<i>B. taeanensis</i>	DSM 16466T	AY603978 1435 bp	
<i>B. tequilensis</i>	ATCC BAA-819T	AY197613 549 bp	1*
<i>B. thermantarcticus</i>	DSM 9572T	AJ493665 1173 bp	2 bases, according to AY608980
<i>B. thermoamylovorans</i>	CNCM I-1378T	L27478 1544 bp	2 bases, according to AB121094 and AY197333
<i>B. thermocloacae</i>	DSM 5250T	Z26939 1527 bp	1*
<i>B. thioperus</i>	BM-B-436T	DQ371431 1472 bp	
<i>B. thuringiensis</i>	ATCC 10792T	AF290545 1482 bp	
<i>B. tusciae</i>	IFO 15312T	AB042062 1512 bp	
<i>B. valismortis</i>	DSM 11031T	AB021198 1530 bp	
<i>B. vedderi</i>	DSM 9768T	Z48306 1478 bp	1*
<i>B. velezensis</i>	LMG 22478T	AY603658 1404 bp	1 base, according to AY608741

<i>B. vietnamensis</i>	JCM 11124T	AB099708 1388 bp	7 bases, according to DQ985062
<i>B. vireti</i>	LMG 21834T	AJ542509 1430 bp	2 bases, according to AJ563531
<i>B. wakoensis</i>	DSM 2521T	AB043851 1524 bp	Deleted the last 8 bases*
<i>B. weihenstephanensis</i>	DSM 11821T	AB021199 1531 bp	
<i>Amphibacillus xylanus</i>	DSM 6626T	AJ496807 1505 bp	3 bases, according to D82065, AF275708 and AB073167
<i>Alkalibacillus halobalkalophilus</i>	DSM 5271T	AJ238041 1412 bp	
<i>Anoxybacillus pushchinoensis</i>	DSM 12423T	AJ010478 1338 bp	2*
<i>Caldalkalibacillus thermanum</i>	CGMCC 1.4242T	AY753654 1485 bp	4*
<i>Cerasibacillus quisquiliarum</i>	DSM 15825T	AB107894 1484 bp	
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	DSM 6208T	DQ019166 1552 bp	
<i>Fibrobacillus mitosensis</i>	DSM 13259T	AJ238042 1491 bp	
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	BGSC 9A20T	AY608928 1562 bp	1 base, according to AY608932
<i>Gracilibacillus halotolerans</i>	DSM 11805T	AF036922 1541 bp	
<i>Halalkalibacillus halophilus</i>	DSM 18494T	AB264529 1492 bp	
<i>Halobacillus halophilus</i>	NCIMB 2269T	X62174 1491 bp	5 bases, according to AY121438
<i>Halolactobacillus halophilus</i>	DSM 17073T	AB196783 1491 bp	2*
<i>Jeotgalibacillus alimentarius</i>	JCM10872T	AF281158 1508 bp	
<i>Lentibacillus salicampi</i>	JCM 11462T	AY057394 1521 bp	2*
<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	DSM 17140T	AB199591 1484 bp	
<i>Marinibacillus marinus</i>	DSM 1297T	AJ237708 1523 bp	
<i>Oceanobacillus ihayensis</i>	JCM 11309T	NC_004193 Region:91493-93058 1566bp	
<i>Ornithinibacillus bavariensis</i>	WSBC 24001T	Y13066 1451 bp	1*
<i>Paralibacillus ryukyuensis</i>	DSM 15140T	AB067828 1500 bp	1*
<i>Paucisalibacillus globulus</i>	LMG 23148T	AM114102 1441 bp	1*
<i>Pontibacillus chungwhensis</i>	KCTC 3890T	AY553296 1427 bp	
<i>Saccharococcus thermophilus</i>	ATCC 43125T	X70430 1538 bp	3*
<i>Salinibacillus ailingensis</i>	AS 1.3565T	AY321436 1472 bp	5*
<i>Tenuibacillus multivorans</i>	AS 1.3442T	AY319933 1479 bp	1*
<i>Terribacillus saccharophilus</i>	IAM 15309T	AB243845 1515 bp	1*
<i>Thalassobacillus devorans</i>	DSM 16966T	AJ717299 1506 bp	
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	DSM 10633T	X90640 1488 bp	
<i>Virgibacillus parvithenticus</i>	IAM 11061T	D16275 1491 bp	1*
<i>Vulcanibacillus modesticaldus</i>	DSM 14931T	AM050346 1526 bp	
<i>Salsuginibacillus kocurii</i>	CH9dT	AM492160 1502 bp	
<i>Prisobacillus salpiscarius</i>	JCM 13188T	AB194046 1520 bp	
<i>Pelagibacillus goriensis</i>	DSM 18252T	DQ519571 1433 bp	
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ATCC 27009T	AB042056 1520 bp	2 bases, according to DSM 446T (AJ496806)
<i>Aneurinibacillus aneurinolyticus</i>	DSM 5562T	AB101592 1489 bp	1 base, according to X94194
<i>Brevibacillus brevis</i>	DSM 30T	AB101593 1486 bp	5 bases, according to NBRC 15304T (AB271756)
<i>Caryophanon latum</i>	NCIMB 9533T	X70314 1489 bp	7 bases, according to X70319 and AJ491302
<i>Kurtzia zopfii</i>	ATCC 33403T	M58800 1557 bp	10 bases, according to X70321
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	DSM 36T	AJ320493 1521 bp	
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	IFO 13595T	AB101595 1503 bp	3 bases, according to ATCC 15538T (M58838)
<i>Sulfobacillus thermosulfidoxidans</i>	DSM 9293T	AB089844 1500 bp	
<i>Thermobacillus xylanolyticus</i>	CNCM I-1017T	AJ005795 1554 bp	2*
<i>Escherichia coli</i>	K12 MG1655	U00096 Region:4033554-4035095 1542bp	

\* Several wrong bases were corrected according to homologous sequences by BLAST

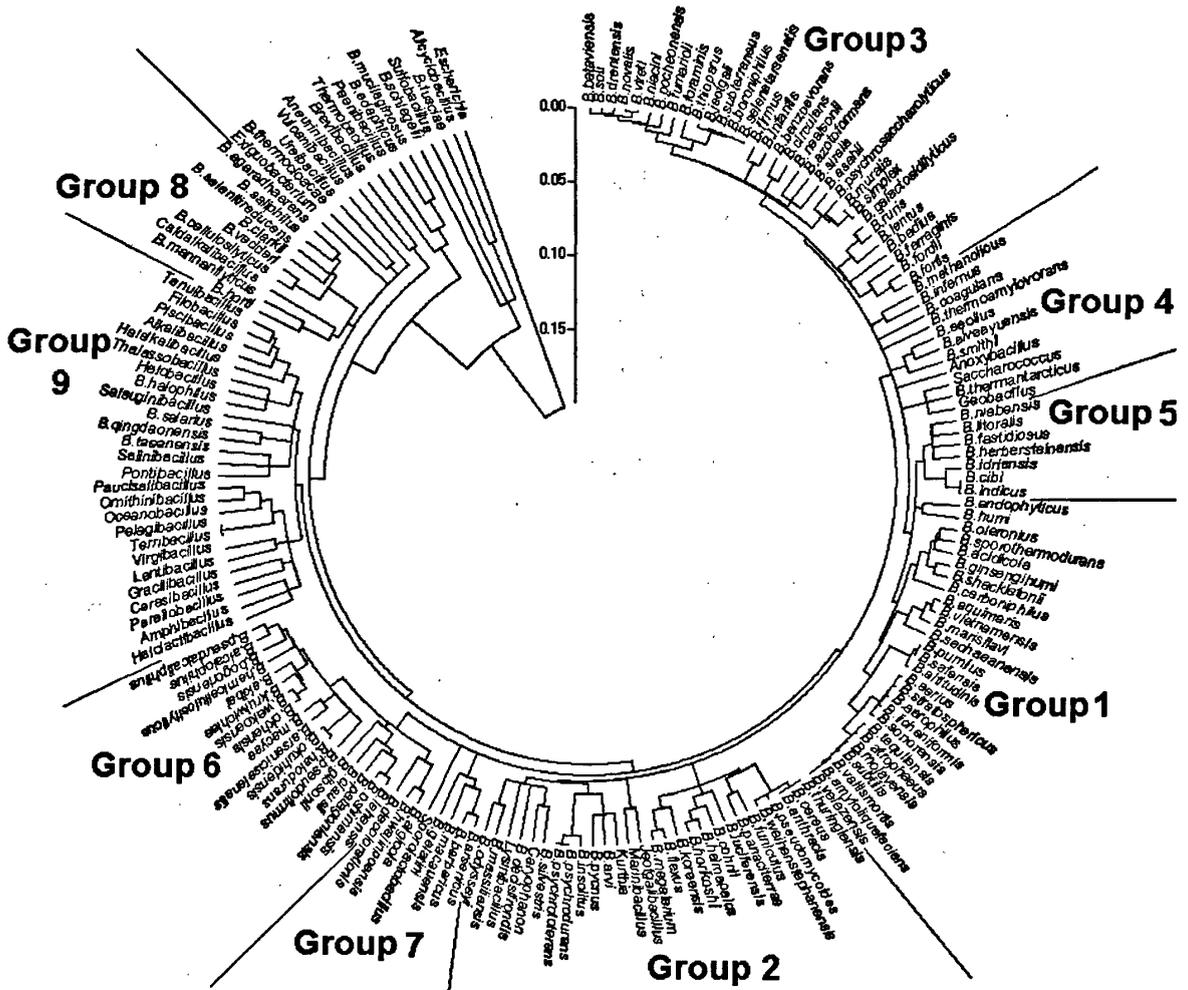
附录 2



Supplementary Fig. S1.







Supplementary Fig. S4.

**Supplementary Figure:** The phylogenetic trees were derived from 16S rRNA gene sequences. Bootstrap percentages (NJ, MP and ME trees were based on 1000 replications, ML tree was based on 100 replications) are not given at branching points. *Escherichia coli* was used as the outgroup.

**Supplementary Fig. S1.** Maximum-parsimony tree was obtained using the Close-Neighbor-Interchange algorithm with search level 3 in which the initial trees were obtained with the random addition of sequences (10 replicates). All alignment gaps were treated as missing data.

**Supplementary Fig. S2.** Neighbor-joining tree. The differences in the composition bias among sequences were considered in evolutionary comparisons. Alignment gaps and missing data were eliminated in pairwise sequence comparisons. Bar, 0.05 changes per nucleotide position.

**Supplementary Fig. S3.** Maximum likelihood tree was searched using RAxML-VI-HPC version 4.0.0 (Stamatakis, 2007). RAxML executed 100 rapid bootstrap inferences and thereafter a thorough ML search with GTR model of nucleotide substitution. All free model parameters was estimated by RAxML. Bar, 0.01 change per nucleotide position.

**Supplementary Fig. S4.** Minimum Evolution tree was searched using the Close-Neighbor-Interchange algorithm at a search level of 2. The differences in the composition bias among sequences were considered in evolutionary comparisons. Alignment gaps and missing data were eliminated in pairwise sequence comparisons. Bar, 0.05 changes per nucleotide position.

## 致谢

感谢刘万顺教授和王清印研究员分别对我博士和硕士阶段的学习研究提供重要帮助,使我能顺利完成学业。本研究在孙谡研究员指导下完成,孙老师创造了良好的研究环境,使我在专业发展乃至今后的人生道路上受益匪浅。感谢冷凯良老师和孙伟红老师协助完成气相色谱。感谢高媛媛、于晓艳和张斌协助制备过氧化氢酶样品。感谢王海英、郝建华、张琇、郑媛、阎晓玲、袁翠、朱重昊、董宏伟、杨向科、谢洪国、邹艳丽和时瀚在实验技术上的帮助。

## 个人简历、在学期间发表的学术论文与研究成果

### 个人简历

1980年12月3日出生于山东省青岛市。

1999年9月考入青岛海洋大学(现中国海洋大学)海洋生命学院生物科学专业,2003年7月本科毕业并获得理学学士学位。

2003年9月考入中国海洋大学海洋生命学院海洋生物学专业,2004年申请硕博连读。

2005年9月转入博士阶段学习,攻读博士学位至今。

### 发表的学术论文

- [1] 王伟,孙谡,刘万顺. 单功能过氧化氢酶的高级结构. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24 (2): 197-202. 中文核心期刊
- [2] Wei Wang, Mi Sun, Wanshun Liu. Isolation and characterisation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-decomposing bacteria from Antarctic seawater. *Annals of Microbiology*, 2008, 58 (1): 29-33. SCI 源刊

### 申请专利

高产低温过氧化氢酶的南极海洋微生物菌株 n2a, 孙谡、郝建华、王伟、袁翠, 200810057969.7

### 主要参与研究项目

海洋生物酶制剂规模化生产的关键技术研究, 2007AA091602, 863

海洋生物酶晶体结构功能研究, 2005DFA30830, 科技部国际重点合作项目

海洋新型酶的工程化技术研究, 2003AA625070, 863

新型海洋低温酶的产业化关键技术研究, 2003AA001028, 863 引导

# 南极海洋微生物N<sub>2</sub>a鉴定、系统学及一种低温过氧化氢酶 BNC纯化与性质研究

作者: [王伟](#)  
学位授予单位: [中国海洋大学](#)



本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis\\_Y1338333.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis_Y1338333.aspx)

授权使用: 浙江大学(wfzjdx), 授权号: 733401be-e8ce-4dce-8b36-9ea0012a0191

下载时间: 2011年3月8日