

• 工业生物技术 •

谷氨酸棒杆菌过氧化氢酶的异源表达、纯化以及酶学性质

杨弘宇^{1,2}, 张雪³, 马振平², 徐宁², 刘君²

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 天津科技大学 食品工程与生物技术学院, 天津 300457

杨弘宇, 张雪, 马振平, 等. 谷氨酸棒杆菌过氧化氢酶的异源表达、纯化以及酶学性质. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1568–1577.
Yang HY, Zhang X, Ma ZP, et al. Expression, purification and characterization of catalase from *Corynebacterium glutamicum*. Chin J Biotech, 2020, 36(8): 1568–1577.

摘要: 过氧化氢酶能催化过氧化氢分解为水和氧气, 在工业上有着较为广泛的应用。然而, 纺织和造纸工业的特殊的高碱性环境, 使得开发碱性过氧化氢酶有着重要的应用价值。利用大肠杆菌表达来自于谷氨酸棒杆菌的过氧化氢酶, 对其表达条件进行了优化, 并通过镍柱亲和层析的方法分离纯化重组蛋白, 然后表征纯酶的酶学性质。最适表达条件为: 诱导剂 IPTG 浓度 0.2 mmol/L, 诱导温度 25 °C, 诱导时间 11 h。过氧化氢酶比酶活达到 55 266 U/mg, 具有较高的催化活性。该酶具有相当宽泛的 pH 值适应范围, 在 pH 4.0–11.5 范围内均具有较高的酶活性, 并在 pH 11.0 条件下表现出最高的酶活性。将纯酶在 pH 11.0 的溶液中处理 3 h 时剩余酶活为 93%, 说明该酶在高碱条件下有良好的稳定性。该酶最适温度为 30 °C, 在 25–50 °C 热稳定性较好。其动力学参数 K_m 为 25.89 mmol/L, V_{max} 为 185.18 mmol/(min·mg)。抑制剂十二烷基硫酸钠 (SDS)、尿素、 NaN_3 、 β -巯基乙醇、EDTA 对酶活有不同程度的抑制作用。来源于谷氨酸棒杆菌的过氧化氢酶具有较高的催化效率、良好的碱耐受性, 在工业生产中有较好的应用前景。

关键词: 过氧化氢酶, 异源表达, 酶学性质, 耐碱, 谷氨酸棒杆菌

Expression, purification and characterization of catalase from *Corynebacterium glutamicum*

Hongyu Yang^{1,2}, Xue Zhang³, Zhenping Ma², Ning Xu², and Jun Liu²

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Catalase catalyzes the decomposition of H_2O_2 to H_2O and O_2 , and has a wide range of industrial applications.

Received: December 8, 2019; **Accepted:** April 3, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31801526, 31972061).

Corresponding author: Jun Liu. Tel: +86-22-24828781; E-mail: liu_jun@tib.cas.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31801526, 31972061) 资助。

However, most catalases used in the textile and paper industries are often subjected to high-alkaline challenges which makes it necessary to develop alkaline catalase. In this study, a catalase from *Corynebacterium glutamicum* was expressed in *Escherichia coli*, and the expression conditions were optimized. The recombinant catalase was purified by Ni-chelating affinity chromatography, and the recombinant enzyme was characterized. The optimal conditions of producing the recombinant catalase were: an IPTG concentration of 0.2 mmol/L, a culturing temperature of 25 °C and a culturing time of 11 h. The purified catalase had a specific activity of 55 266 U/mg, and it had a high activity in the pH range of 4.0 to 11.5, with the highest activity at pH 11.0. When treated in pH 11.0 for 3 h, the enzyme retained 93% of its activity, indicating that the enzyme was qualified with a favorable stability under high-alkaline condition. The recombinant catalase had maximal activity at 30 °C, and showed a satisfactory thermal stability at a range of 25 °C to 50 °C. The apparent K_m and V_{max} values of purified catalase were 25.89 mmol/L and 185.18 mmol/(min·mg), respectively. Besides, different inhibitors, such as sodium dodecyl sulfate (SDS), urea, NaN_3 , β -mercaptoethanol, and EDTA had different degrees of inhibition on enzyme activity. The catalase from *C. glutamicum* shows high catalytic efficiency and high alkaline stability, suggesting its potential utilization in industrial production.

Keywords: catalase, heterologous expression, enzymatic properties, alkali resistance, *Corynebacterium glutamicum*

过氧化氢酶 (Catalase, CAT, EC1.11.1.6) 广泛存在于各种细菌、真菌、植物和动物体中^[1], 是一类特异性催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 的酶^[2]. H_2O_2 作为细胞内活性氧 (ROS) 的组成部分^[3], 能通过游离 Fe^{2+} 催化的芬顿反应自发转化为高活性羟基自由基 ($\text{OH}\cdot$), 这些高活性分子会通过破坏核酸、脂质和蛋白质影响细胞存活^[4], 而过氧化氢酶作为 H_2O_2 的有效细胞清除剂^[5], 可以避免 H_2O_2 对细胞的有害作用, 所以过氧化氢酶在生物体的防御体系中占有非常重要的地位。

近年来, 在一些医疗、食品和纺织行业, 过氧化氢在杀菌或漂白过程中的应用迅速增长^[6]. 然而其中残留的 H_2O_2 对人体健康和环境有害, 因此需要进一步去除^[2]. 氯酸盐化合物通常被用来去除产品或环境中持续存在的过量 H_2O_2 , 但是氯酸盐化合物具有毒性和污染性^[6], 而具有高效^[7]、安全^[8]和环保^[9]特性的过氧化氢酶可以作为氯酸盐化合物的替代物^[6], 是去除 H_2O_2 的理想选择. 然而在某些工业中过氧化氢酶的使用环境较为特殊, 比如纺织工业. 过氧化氢酶应用于纺织工业中的热漂步骤, 而热漂过程需要较高的 pH 环境, 这就要求过氧化氢酶有良好的耐碱特性^[10]. 因此, 开发碱性过氧化氢酶有重要的工业应用价值. 目前已有关于碱性过氧化氢酶的报道, 比如 Zhang

等^[11]从嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. F26 中纯化得到一种碱性过氧化氢酶, 纯酶比活性为 14 244 U/mg, 还有来自不动杆菌属的 *Acinetobacter* sp. YS0810^[6]以及 *B. subtilis* 168^[7]的碱性过氧化氢酶纯酶比活性分别为 37 318 U/mg 和 37 081 U/mg.

谷氨酸棒杆菌是一种安全的微生物^[12], 普遍应用于氨基酸的工业生产^[13]. 本实验室在前期工作中发现谷氨酸棒杆菌的过氧化氢酶具有清除细胞内活性氧、减轻氧化胁迫的生理学功能^[4], 而且谷氨酸棒杆菌的 pH 生长条件为 6.0–10.0^[13], 说明菌株本身有一定的耐碱能力, 这就使碱性过氧化氢酶的获得成为可能. 因此, 本研究将来源于谷氨酸棒杆菌的过氧化氢酶在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中进行异源表达, 并进行表达条件优化, 采用镍柱亲和层析的方法纯化过氧化氢酶, 然后进行了酶学性质的表征. 研究表明该纯酶比酶活为 55 266 U/mg, 催化效率较高, 并且具有良好的碱耐受性, 在工业上有较好的应用前景.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

野生型谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 菌株由本实验室保存; 谷氨酸棒杆菌中过氧化氢酶的基因

名称为 *katA* (GenBank 登录号 BX927148.1); 大肠杆菌 BL21(DE3) 由本实验室保存; 含有经过密码子优化的谷氨酸棒杆菌过氧化氢酶 *katA* 基因的重组质粒 pET21b-*katA*-C 由金斯瑞公司完成; 重组菌株 *E. coli* BL21(DE3) (pET21b-*katA*-C) 由本实验构建; 含空质粒的菌株 *E. coli* BL21(DE3) (pET21b) 由本实验室保存。

1.1.2 试剂

蛋白 Marker 购自赛默飞世尔科技公司; 氨苄青霉素 (Amp)、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 购自索莱宝生物科技有限公司; Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 填料购自美国 GE Healthcare 公司; Bis-Tris propane 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 其他试剂如磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、咪唑等均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB 培养基 (L^{-1}): 氯化钠 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g (固体培养基加 2% 的琼脂粉)。

CGX II 基本培养基 (L^{-1}): $(NH_4)_2SO_4$ 20 g, 尿素 5 g, 葡萄糖 40 g, KH_2PO_4 1 g, K_2HPO_4 1 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg, $CaCl_2$ 10 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, MOPS 42 g, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02 mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 10 mg, $CuSO_4$ 0.2 mg, 原儿茶酸 0.03 mg, 生物素 0.2 mg。

1.2 酶活测定方法

采用分光光度法在室温下测定。反应总体积为 3 mL, 含 0.1 mL 酶液样品和 2.9 mL 含 10 mmol/L H_2O_2 的 50 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液 (pH 7.0), H_2O_2 的分解速率用分光光度计在 240 nm 下测定。酶活定义为: 每分钟分解 1 μ mol H_2O_2 所需的酶量是 1 $U^{[14]}$ 。

1.3 谷氨酸棒杆菌生长曲线和细胞内活性氧水平的测定

将平板上的新鲜单个菌落转移到液体 CGX II 基本培养基中, 32 $^{\circ}C$ 、200 r/min 培养 16 h 之后

收集菌体, 洗涤, 分别重悬于 pH 7.0 和 pH 5.6 的 CGX II 新鲜培养基中至起始 OD_{600} 为 0.1, 然后每隔 2 h 测定 OD_{600} 的值, 绘制生长曲线。

将菌株在 pH 7.0 和 pH 5.6 的 CGX II 培养基中培养 20 h 后, 离心收集菌体, 用新鲜培养基重悬, 并调整菌体浓度 OD_{600} 为 1.0, 随后加入终浓度为 10 μ mol/L 的 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 活性氧荧光探针, 32 $^{\circ}C$ 黑暗振荡培养 30 min。使用荧光分光光度计在激发波长和发射波长分别为 495 nm 和 525 nm 下测定样品相对荧光强度, 用于衡量胞内活性氧含量。

1.4 过氧化氢酶的诱导表达优化

将金斯瑞公司提供的重组质粒 pET21b-*katA*-C 通过热激法转化至感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3) 中, 涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}C$ 培养, 待长出菌落后, 将菌接于含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}C$ 、200 r/min 过夜培养, 将过夜培养的菌液按 2% 接种量转接于含有 100 μ g/mL Amp 的新的 LB 液体培养基中, 待菌体浓度 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时加入 IPTG 诱导, 诱导完成后, 离心收菌, 收集相同浓度的菌体, 进行超声破碎, 超声破碎应在低温下进行, 超声破碎条件为: 功率 285 W, 工作 1 s, 停 3 s, 破碎 5 min。破碎完成后, 于 4 $^{\circ}C$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 上清即为粗酶液, 按照 1.2 的方法测定粗酶液的活性。

对不同的表达条件进行优化, 包括诱导剂 IPTG 浓度 (0.1、0.2、0.4、0.6 mmol/L), 诱导温度 (16 $^{\circ}C$ 、25 $^{\circ}C$ 、30 $^{\circ}C$ 、37 $^{\circ}C$) 和诱导时间 (3、5、8、11、13 h)。以含有空质粒的菌株作为对照组。

1.5 过氧化氢酶的纯化

将离心收集的菌体, 用缓冲液 (50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , pH 7.0) 重悬, 进行超声破碎, 破碎完成后, 于 4 $^{\circ}C$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 加载到 Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 柱上, 用洗脱缓冲液 (20 mmol/L 磷酸盐缓冲液,

500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.0) 洗脱目的蛋白, 并收集洗脱液, 用 10 kDa 的超滤管浓缩纯化的蛋白质, 并用保存缓冲液 (20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0) 储存。所有纯化过程均在 4 °C 下进行。用 SDS-PAGE 检测纯化的过氧化氢酶, 并用 Bradford 方法测定蛋白质含量。

1.6 酶学性质的测定

1.6.1 最适 pH 的测定

于 pH 3.0–12.0 的范围内测定酶的活性, 不同 pH 缓冲液为: pH 3.0–6.0, Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液; pH 6.0–10.0, BTP 溶液 (Bis-Tris propane + Na₂HPO₄); pH 10.0–12.0, 甘氨酸-NaOH 缓冲液。在 30 °C 测定酶活, 探究 pH 对酶活的影响。

1.6.2 pH 稳定性的测定

将酶放在不同 pH (3.0–12.0) 的溶液里, 室温处理 3 h, 然后于 pH 11.0、室温下测定, 以未经过处理的酶的酶活作为 100%。

1.6.3 最适温度的测定

在 20–70 °C 范围内, 于 pH 11.0 条件下测定过氧化氢酶的活性, 探究温度对过氧化氢酶的影响。

1.6.4 温度稳定性的测定

将酶放在 pH 11.0 的溶液中, 置于不同温度 (25–60 °C) 处理 30 min 之后, 进行测定, 测定条件: pH 11.0, 30 °C。以未经过处理的酶的酶活作为 100%。

1.6.5 动力学参数的测定

分别以 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0、20.0 mmol/L 的过氧化氢作为底物, pH 11.0、温度 30 °C 下测定酶活力。采用双倒数作图法 (Lineweaver-Burk 法) 求该酶的 K_m 值和 V_{max} 值。

1.6.6 金属离子对酶活的影响

在体系中添加终浓度为 1 mmol/L 的 Mn²⁺、Co²⁺、Na⁺、Mg²⁺、K⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺, 25 °C 处理 30 min, pH 11.0、30 °C 下测定酶活, 以不加金属离子的酶的酶活作为 100%。

1.6.7 抑制剂和有机溶剂对酶活的影响

将酶与抑制剂 SDS、尿素、NaN₃、β-巯基乙醇、EDTA 混合, 按酶液、95% 乙醇、氯仿体积比为 10:5:3 混合, 25 °C 处理 30 min, pH 11.0、30 °C 条件下测定酶活。以未经处理的酶的酶活作为 100%。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸棒杆菌生长曲线和细胞内活性氧水平的测定结果

在酸性胁迫下, 细菌常会积累细胞内活性氧, 从而影响菌株的生长^[4]。因此, 胞内活性氧的清除可能是细胞在低酸条件下存活的一个重要策略。基于此, 我们探究了过氧化氢酶 KatA 在菌株应对低酸胁迫时的作用及对胞内活性氧水平的影响。由图 1A、1B 所示, 在 pH 7.0 中性条件下, *kata* 基因缺失后对菌株的生长并未造成明显的影响, 然而在 pH 5.6 酸性条件下, *kata* 基因缺失后会明显减弱菌株的生长能力, 在培养 24 h 时 $\Delta kata$ 缺失菌株的生物量约为野生型菌株 86%。图 1C、1D 结果显示, 与中性条件相比, 酸性条件下野生型菌株和 $\Delta kata$ 缺失菌株的胞内活性氧含量均明显增加。另外, 在低酸胁迫条件下, $\Delta kata$ 缺失菌株胞内活性氧水平约是野生型菌株胞内活性氧水平的 1.9 倍, 说明 KatA 能够有效降低菌株胞内活性氧浓度。上述结果表明, 过氧化氢酶 KatA 对于菌株抵御低酸胁迫发挥着重要作用, 为了更好地研究其功能, 本研究拟对谷氨酸棒杆菌来源的过氧化氢酶进行体外纯化, 并对其酶学性质进行测定和表征。

2.2 过氧化氢酶的诱导表达优化

2.2.1 过氧化氢酶的诱导表达

重组菌株 *E. coli* BL21(DE3) (pET21b-*kata*-C) 经过 IPTG 诱导表达, 离心收菌, 超声破碎, 离心取上清得到粗酶液, 并对粗酶液进行 SDS-PAGE 检测, 以含有空质粒的菌株 *E. coli* BL21(DE3) (pET21b) 作为对照, 检测结果如图 2A 所示。与

含有空质粒的菌株相比, 重组菌株在大约 58 kDa 处有一条明显较粗的条带, 与经过预测的蛋白分子量 58.71 kDa 基本一致, 表明过氧化氢酶成功表达。

2.2.2 表达条件优化

首先, 探究诱导剂 IPTG 浓度对于表达的影响。在 0.1–0.6 mmol/L 的 IPTG 浓度范围内进行诱导, 结果如图 2B 所示, 0.2 mmol/L 时过氧化氢酶活性最高, 表明最适 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L。诱导温度也会对过氧化氢酶的表达产生影响, 结果如图 2C 所示, 16 °C 和 37 °C 时的酶活都偏低, 可能是因为低温条件下大肠杆菌细胞生长缓慢, 使目的蛋白的表达量偏低, 而温度较高时也不利于重组蛋白的表达, 最终确定最适诱导温度为 25 °C。研究诱导时间对酶表达的影响, 结果如

图 2D 所示, 当诱导时间从 3 h 增加到 11 h, 过氧化氢酶的酶活逐渐升高, 而继续诱导酶活开始下降, 表明最适诱导时间为 11 h。以上结果表明, *E. coli* BL21(DE3) (pET21b-*kata*-C) 的最适表达条件为: IPTG 浓度 0.2 mmol/L, 诱导温度 25 °C, 诱导时间 11 h。

2.3 过氧化氢酶的纯化

采用镍柱亲和层析的方法对加入 His 标签的过氧化氢酶进行纯化, 并对粗酶液和纯化之后的酶进行 SDS-PAGE 检测, 检测结果如图 3 所示, 纯化之后的过氧化氢酶蛋白条带较为单一, 蛋白大小约为 58 kDa, 与经过预测的蛋白分子量 58.71 kDa 基本一致, 所以目的蛋白成功纯化, 可继续进行酶学性质的研究。

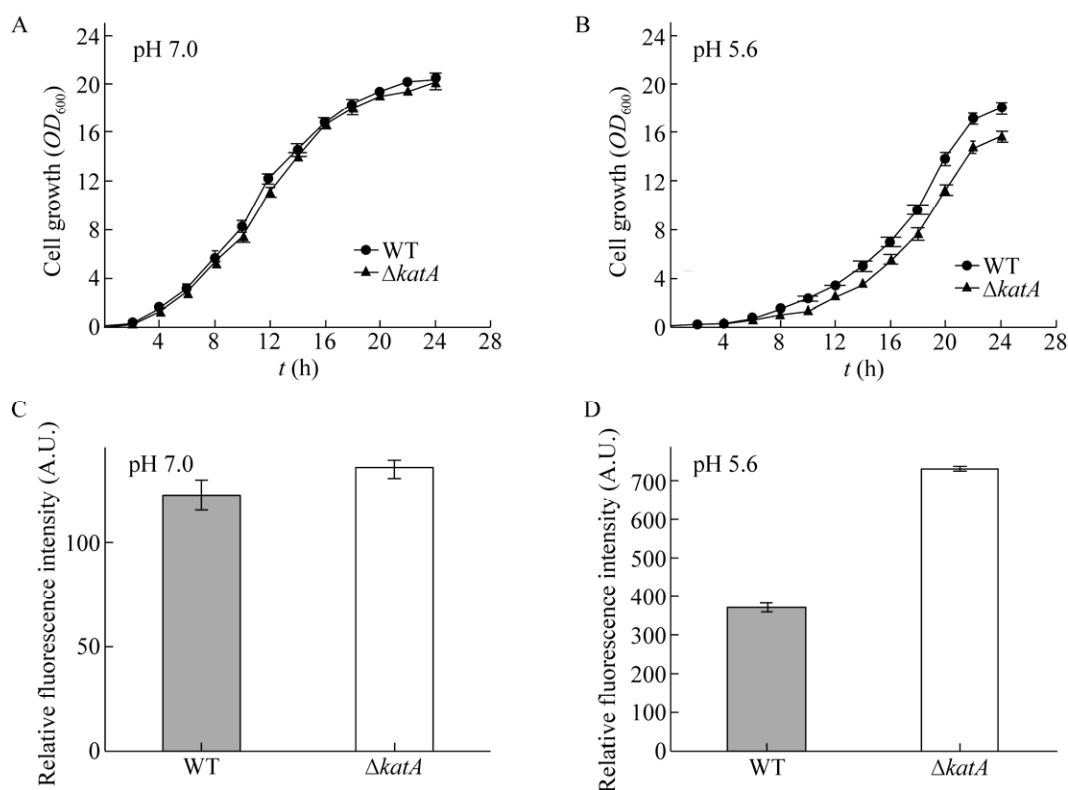


图 1 谷氨酸棒杆菌生长曲线和细胞内活性氧水平的测定

Fig. 1 Determination of growth curves and intracellular reactive oxygen species of *C. glutamicum*. (A, B) Growth curves of *C. glutamicum* WT and $\Delta katA$ under pH 7.0 and pH 5.6 conditions. (C, D) Determination of intracellular reactive oxygen species of *C. glutamicum* WT and $\Delta katA$ under pH 7.0 and pH 5.6 conditions.

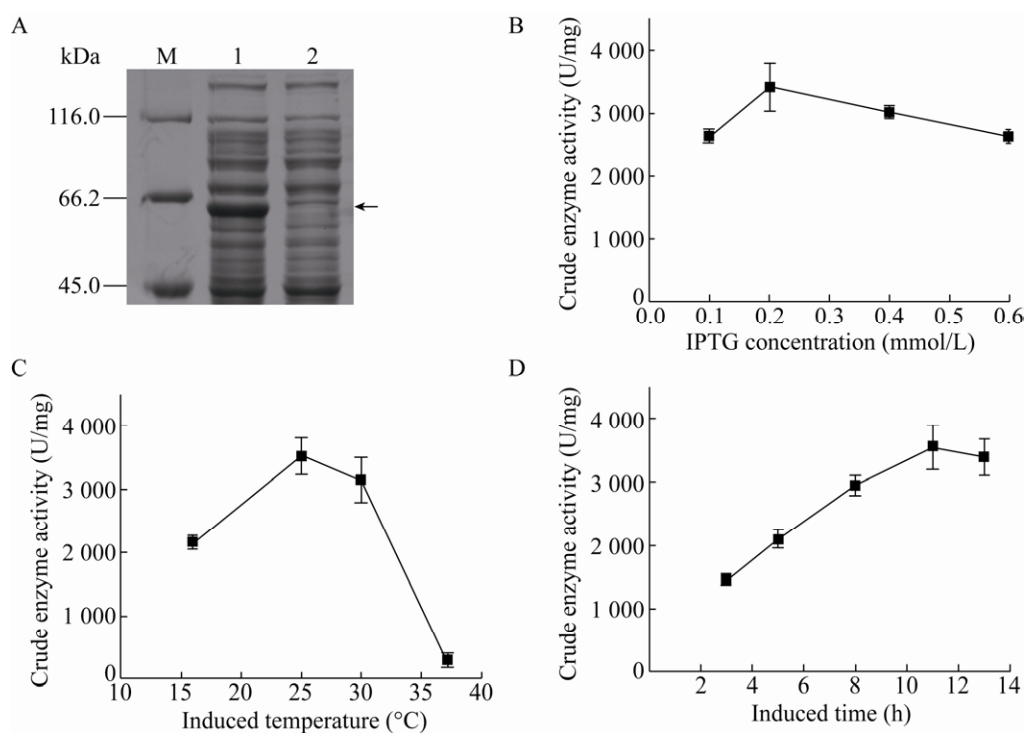


图2 重组过氧化氢酶在大肠杆菌中的表达条件优化

Fig. 2 Optimization of expression conditions of recombinant catalase in *E. coli*. (A) SDS-PAGE analysis of recombinant catalase in *E. coli* BL21(DE3). M: protein marker; 1: cell supernatant of *E. coli* BL21(DE3) (pET21b-katA-C); 2: cell supernatant of *E. coli* BL21(DE3) (pET21b). (B) Effect of IPTG concentration on KatA expression. (C) Effect of induction temperature on KatA expression. (D) Effect of induction time on KatA expression.

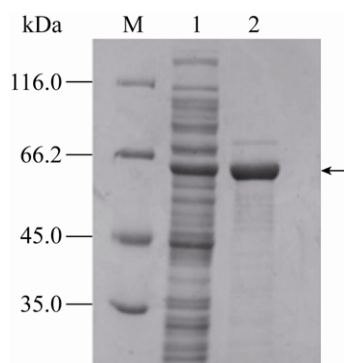


图3 重组 KatA 镍柱纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified enzyme. M: protein marker; 1: crude enzyme solution; 2: purified enzyme.

2.4 酶学性质分析

2.4.1 酶的最适 pH 值和 pH 稳定性

考察最适反应 pH 对催化反应极为重要，于 pH 3.0–12.0 的范围内测定酶的活性，如图 4A 所示，该酶在 pH 4.0–11.5 均表现出活性，在 pH 11.0

时酶活达到最大。将酶放在不同 pH 的溶液里，室温处理 3 h 之后，测定酶的 pH 稳定性，结果如图 4B 所示，在 pH 4.0–11.5 的范围内，剩余酶活都在 75% 以上，其中在 pH 8.0–11.5 之间剩余酶活在 90% 以上，由此可看出，该酶是碱性过氧化氢酶，具有较为宽广的 pH 稳定范围，并且在高碱条件下有良好的稳定性，因此从这一特征来看，该酶具有在纺织、造纸等工业中的应用潜力。

2.4.2 酶的最适温度和温度稳定性

在 20–70 °C 范围内，测定过氧化氢酶的最适温度，如图 5A 所示，酶的最适温度是 30 °C。将酶置于 pH 11.0 的溶液中，于不同温度处理 30 min 之后，测定过氧化氢酶的剩余酶活，结果如图 5B 所示，25–35 °C 剩余酶活在 80% 以上，在 40 °C 剩余酶活 68.36%，在 50 °C 酶活依然保留

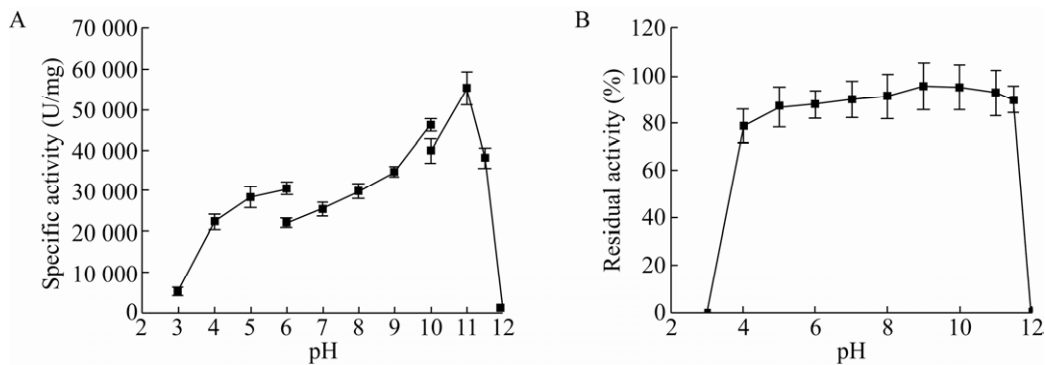


图 4 pH 对 KatA 活性和稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH on KatA activity and stability. (A) Effect of pH on the activity of KatA. (B) Effect of pH on the stability of KatA.

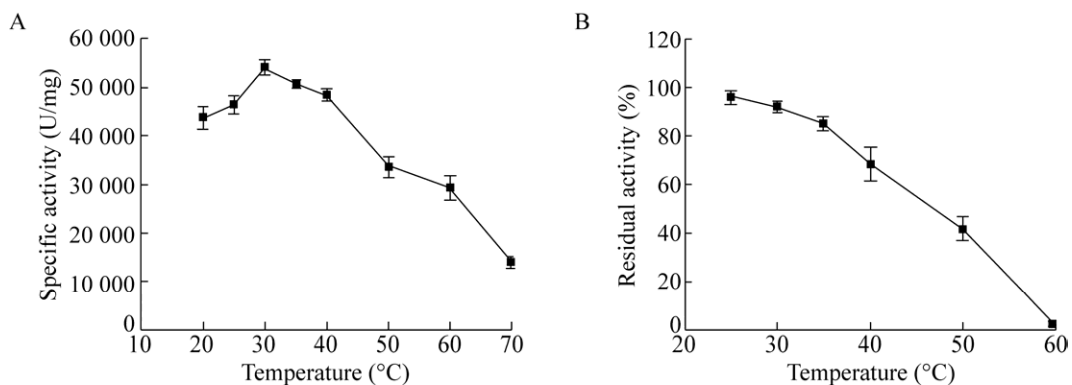


图 5 温度对 KatA 活性和稳定性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on KatA activity and stability. (A) Effect of temperature on the activity of KatA. (B) Effect of temperature on the stability of KatA.

41.85%，所以，该酶在 25–50 °C 热稳定性较好，已初步具备工业化应用的特征。

2.4.3 酶的动力学参数

在 pH 11.0、30 °C 的条件下，测定不同底物浓度时的酶活，采用双倒数作图法 (Lineweaver-Burk 法) 求得该酶的 K_m 值为 25.89 mmol/L, V_{max} 为 185.18 mmol/(min·mg)，结果如图 6 所示。

2.4.4 金属离子对酶活的影响

测定不同金属离子对酶活力的影响，结果如图 7 所示，1 mmol/L 的 K^+ 对该酶的活性有促进作用，酶活提高 10%。 Mg^{2+} 和 Cu^{2+} 影响不大，剩余

酶活分别是 99% 和 92%， Mn^{2+} 、 Na^+ 、 Ni^{2+} 对酶活都有部分抑制作用， Co^{2+} 和 Fe^{2+} 的抑制作用最强，酶活分别下降了 44% 和 42%。以上结果表明，不同金属离子对过氧化氢酶的活性具有不同的作用。

2.4.5 抑制剂和有机溶剂对酶活的影响

如表 1 所示，在 25 °C 处理 30 min 之后，SDS 抑制作用最小，酶活下降了 14.69%，尿素、 NaN_3 和 β -巯基乙醇处理后酶活分别下降了 36.06%、32.13% 和 48.47%，EDTA 抑制作用最强，酶活下降了 61.37%。在酶液中添加一定比例的乙醇和氯仿对酶活基本没有影响。

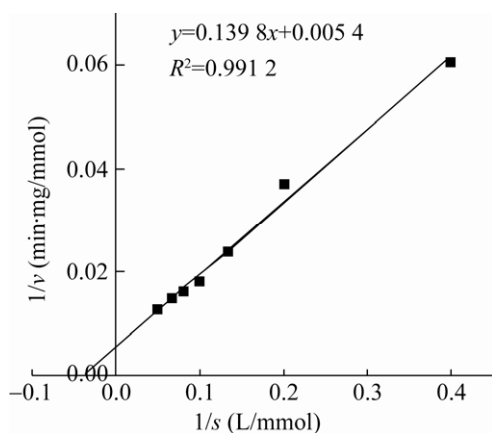


图6 双倒数作图法测定 KatA 酶反应动力学参数
Fig. 6 Analysis of enzyme kinetics of KatA by Lineweaver-Burk plotting.

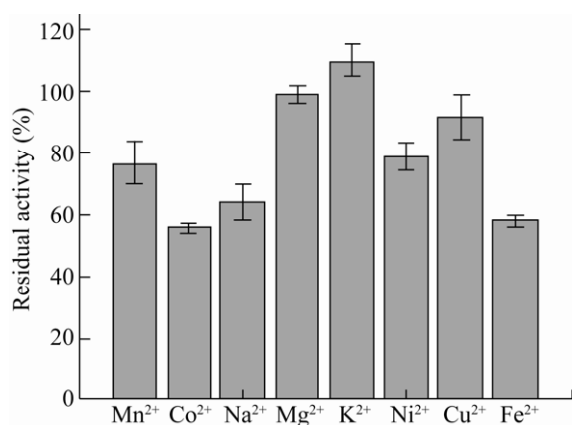


图7 金属离子对 KatA 酶活的影响
Fig. 7 Effect of metal ions on the activity of KatA.

表1 抑制剂和有机溶剂对 KatA 活力的影响
Table 1 Effect of inhibitors and organic solvents on the activity of KatA

Inhibitors and organic solvents	Concentration (mmol/L)	Residual activity (%)
SDS	5.0	85.31±8.06
Urea	10.0	63.94±2.57
NaN ₃	0.1	67.87±4.46
β-Mercaptoethanol	1.0	51.53±3.20
EDTA	1.0	38.63±3.77
Enzyme solution+ ethanol+chloroform	10:5:3	103.70±3.50

3 讨论

过氧化氢酶广泛应用于临床分析、食品消毒、纺织、造纸等工业^[15]。然而纺织和造纸工业的特殊的高碱性环境，要求过氧化氢酶具备优良的耐碱性能，所以越来越多的研究开始聚焦于碱性过氧化氢酶的开发。在这项工作中，我们第一次报道来源于谷氨酸棒杆菌的过氧化氢酶，将其在大肠杆菌中进行表达优化，并通过镍柱亲和层析得到纯酶，然后测定和表征纯酶的酶学性质。如表2所示，本研究得到的过氧化氢酶最适 pH 11.0，而且在 pH 11.0、室温处理 3 h，剩余酶活为 93%，说明本文得到的是一种碱性过氧化氢酶。来自 *Acinetobacter* 属的 YS0810CAT 最适 pH 为 11.0，在 pH 11.0、4 °C 处理 3 h，剩余 78% 的活性^[6]。来自 *B. subtilis* 168 的过氧化氢酶的最适 pH 为 12.0，在 pH 11.0 处理 1 h，残余活性 70% 以上，在 pH 12.0 处理 1 h，残余活性 30% 以上^[7]。来自 *Bacillus* sp. F26 的过氧化氢酶最适 pH 为 11.0，在 pH 11.0、15–30 °C 处理 60 min 剩余活性 100%^[11]。与以上碱性过氧化氢酶相比，本研究得到的过氧化氢酶在高碱条件下的耐受性依然有很大的优势。纯酶比活性为 55 266 U/mg，高于许多其他过氧化氢酶。所以该酶良好的碱耐受性以及较高的催化效率使其具备工业化应用的潜力。

该酶的最适温度是 30 °C，与大豆 CAT 的最适温度^[16]一致，在 25–50 °C 有较好的热稳定性，初步具备工业化应用的特征。该酶 K_m 值为 25.89 mmol/L， V_{max} 为 185.18 mmol/(min·mg)，与热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 的过氧化氢酶的 K_m 值 19.20 mmol/L^[17] 和深红螺菌 *Rhodospirillum rubrum* 的过氧化氢酶的 K_m 值 21.80 mmol/L^[18] 相近，低于许多其他来源如黄褐微球菌 *Micrococcus luteus*^[19]、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* WB600^[5]、地芽孢杆菌属 *Geobacillus* sp. CHB1^[2]、球形红细菌 *Rhodobacter sphaeroides*^[20]、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* UM1001^[21]、芽孢杆菌属 *Bacillus* sp.

表 2 不同来源过氧化氢酶学性质的比较

Table 2 Comparison of the enzymatic properties of catalases from different sources

Source	Optimal pH	pH stability (residual activity, pH 11)	Optimal temperature (°C)	K_m (mmol/L)	Specific activity ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$)	References
<i>B. subtilis</i> WB600	6.0	nr	nr	52.50	34 600	[5]
<i>Acinetobacter</i> sp. YS0810	11.0	4 °C, 3 h 78%	60	nr	37 318	[6]
<i>Geobacillus</i> sp. CHB1	6.0–7.0	nr	60–70	51.10	40 526	[2]
<i>R. sphaeroides</i>	6.0–10.0	nr	54	40.00	55 930	[20]
<i>B. subtilis</i> 168	12.0	1 h >70%	37–42	nr	37 081	[7]
<i>B. subtilis</i> UM1001	4.0–12.0	nr	nr	78.00	51 200	[21]
<i>Bacillus</i> sp. F26	11.0	15–30 °C, 60 min 100%	20–40	32.50	14 244	[11]
<i>U. thermosphaericus</i> FZSF03	7.0	60 min 70%	60	101.10	219 360	[22]
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	11.0	25 °C, 3 h 93%	30	25.89	55 266	This study

nr means not reported.

F26^[11]、嗜热链球菌 *Ureibacillus thermosphaericus* FZSF03^[22]的过氧化氢酶的 K_m 值, 说明本研究的过氧化氢酶有相对较低的 K_m 值, 与底物 H_2O_2 有较高的亲和力。1 mmol/L 的 K^+ 对该酶有促进作用, Mg^{2+} 和 Cu^{2+} 对活性影响不大, 剩余酶活分别是 99%和 92%。

本研究将来源于谷氨酸棒杆菌的过氧化氢酶进行了异源表达、纯化并对其酶学性质进行测定。研究结果表明本文得到的过氧化氢酶具有较高的催化效率, 良好的碱耐受性, 在工业生产中有较好的应用前景。但是本研究报道的过氧化氢酶的热稳定性仍有待进一步提高, 会对其在工业上的规模化应用产生限制, 今后的研究可以通过定向进化和理性设计等分子改造手段进一步提高过氧化氢酶的催化效率和稳定性, 综合提升酶的应用性能。

REFERENCES

[1] Luo H, Zhou Y, Chang YH, et al. Rapid gene cloning, overexpression and characterization of a thermophilic catalase in *E. coli*. *Adv Mater Res*, 2011, 365: 367–374.

[2] Jia XB, Chen JC, Lin CQ, et al. Cloning, expression, and characterization of a novel thermophilic monofunctional catalase from *Geobacillus* sp. CHB1. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 7535604.

[3] Kimoto H, Yoshimune K, Matsuyma H, et al. Characterization of catalase from psychrotolerant *Psychrobacter piscatorii* T-3 exhibiting high catalase activity. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(2): 1733–1746.

[4] Xu N, Lv HF, Wei L, et al. Impaired oxidative stress and sulfur assimilation contribute to acid tolerance of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(4): 1877–1891.

[5] Shi XL, Feng MQ, Zhao YJ, et al. Overexpression, purification and characterization of a recombinant secretary catalase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(1): 181–186.

[6] Fu XH, Wang W, Hao JH, et al. Purification and characterization of catalase from marine bacterium *Acinetobacter* sp. YS0810. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 409626.

[7] Yu ZX, Zheng HC, Zhao XY, et al. High level extracellular production of a recombinant alkaline catalase in *E. coli* BL21 under ethanol stress and its application in hydrogen peroxide removal after cotton fabrics bleaching. *Bioresour Technol*, 2016, 214: 303–310.

- [8] Nakayama M, Nakajima-Kambe T, Katayama H, et al. High catalase production by *Rhizobium radiobacter* strain 2-1. *J Biosci Bioeng*, 2008, 106(6): 554–558.
- [9] Cao WL, Guo YQ, Kang Z, et al. Optimization and industrial production of catalase in *Bacillus subtilis*. *J Food Sci Biotechnol*, 2015, 34(5): 482–486 (in Chinese).
曹汶龙, 郭娅琼, 康振, 等. 枯草芽孢杆菌产过氧化氢酶的优化与工业化. *食品与生物技术学报*, 2015, 34(5): 482–486.
- [10] Zhang DX, Du GC, Chen J. Fermentation production of microbial catalase and its application in textile industry. *Chin J Biotech*, 2010, 26(11): 1473–1481 (in Chinese).
张东旭, 堵国成, 陈坚. 微生物过氧化氢酶的发醇生产及其在纺织工业的应用. *生物工程学报*, 2010, 26(11): 1473–1481.
- [11] Zhang XQ, Xue YF, Zhao AM, et al. Purification and characterization of a monofunctional catalase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. F26. *Chin J Biotech*, 2005, 21(1): 71–77 (in Chinese).
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, 21(1): 71–77.
- [12] Yu XL, Jin HY, Liu WJ, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* to produce 5-aminolevulinic acid from glucose. *Microb Cell Factor*, 2015, 14: 183.
- [13] Takeshita R, Ito H, Wachi M. A role of the *cspA* gene encoding a mycolyltransferase in the growth under alkaline conditions of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(8): 1617–1623.
- [14] Yao HY, Hua ZZ, Du GC, et al. Purification and characterization of catalase from *Bacillus subtilis* WSHDZ-01. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, 14(6): 820–824 (in Chinese).
姚海勇, 华兆哲, 堵国成, 等. 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 过氧化氢酶的分离纯化及性质. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(6): 820–824.
- [15] Zhang XQ, Zheng HL, Shu C, et al. Production of *Micrococcus luteus* catalase under optimized fermentation conditions of engineered *E. coli* strain. *Food Drug*, 2012, 14(5): 153–158 (in Chinese).
张兴群, 郑慧琳, 疏翠, 等. 表达藤黄微球菌过氧化氢酶基因的工程大肠杆菌发酵条件优化. *食品与药品*, 2012, 14(5): 153–158.
- [16] Fang L, Sun CY, Tang YM. Isolation, purification and partial characterization of catalase from soybean (*Glycine max*). *Food Sci*, 2015, 36(1): 140–145 (in Chinese).
方玲, 孙才云, 唐云明. 大豆过氧化氢酶的分离纯化及性质研究. *食品科学*, 2015, 36(1): 140–145.
- [17] Yamada T, Tanaka A, Fukui S. Properties of catalase purified from whole cells and peroxisomes of n-alkane-grown *Candida tropicalis*. *Eur J Biochem*, 1982, 125(3): 517–521.
- [18] Lee DH, Oh DC, Oh YS, et al. Cloning and characterization of monofunctional catalase from photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(9): 1460–1468.
- [19] Switala J, Loewen PC. Diversity of properties among catalases. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 401(2): 145–154.
- [20] Terzenbach DP, 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.
- [21] Loewen PC, Switala J. Purification and characterization of spore-specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *Biochem Cell Biol*, 1988, 66(7): 707–714.
- [22] Jia XB, Lin XJ, Tian YD, et al. High production, purification, biochemical characterization and gene analysis of a novel catalase from the thermophilic bacterium *Ureibacillus thermosphaericus* FZSF03. *Int J Biol Macromol*, 2017, 103: 89–98.

(本文责编 郝丽芳)