

索诺拉沙漠芽孢杆菌 s262 过氧化氢酶的异源表达及酶学性质

吴甜甜, 李晓亚, 王洪玲, 葛文沛, 刘娜*

河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450001

吴甜甜, 李晓亚, 王洪玲, 葛文沛, 刘娜. 索诺拉沙漠芽孢杆菌 s262 过氧化氢酶的异源表达及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 769-778.

WU Tiantian, LI Xiaoya, WANG Hongling, GE Wenpei, LIU Na. Heterologous expression and enzymatic properties of catalase from *Bacillus sonorensis* s262[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 769-778.

摘要: 【背景】索诺拉沙漠芽孢杆菌(*Bacillus sonorensis*) s262 所产过氧化氢酶具有降解黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁)的能力。【目的】在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达索诺拉沙漠芽孢杆菌(*Bacillus sonorensis*) s262 过氧化氢酶, 对表达条件进行优化并测定酶学性质。【方法】将过氧化氢酶基因 *katA* 连接到 pET28a(+)载体中, 构建重组表达质粒 pET28a-*katA*, 转化至 *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞中, 通过优化 IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间确定重组酶的最佳表达条件。使用 Ni-NTA SefinoseTM Resin 分离纯化过氧化氢酶。通过测定过氧化氢酶最适反应温度及热稳定性、最适 pH 及 pH 稳定性和金属离子对酶活力的影响对重组酶酶学性质进行分析, 通过双倒数作图法对重组酶进行动力学分析。高效液相色谱法检测重组过氧化氢酶对 AFB₁ 的降解率。【结果】重组表达质粒 pET28a-*katA* 经双酶切(*Bam*H I和 *Hind* III)及测序证明构建成功。纯化的重组酶分子量大小在 55 kDa, 在 *E. coli* 中的最佳表达条件为: IPTG 浓度 0.8 mmol/L, 诱导温度 25 °C, 诱导时间 10 h。酶最适催化温度 50 °C, 最适 pH 7.0 时, 其动力学参数 V_{max} 为(760.17±19.61) mmol/(min·L), K_m 为(63.73±3.87) mmol/L。0.1 mmol/L Fe²⁺、Zn²⁺和 Cu²⁺对酶有促进作用, 酶活分别提高 40%、8%和 12%, 但该浓度下 K⁺对酶起抑制作用, 使酶活降低 39%。重组酶对 AFB₁ 的降解率为 61.44%。【结论】成功表达并纯化了索诺拉沙漠芽孢杆菌源过氧化氢酶, 为过氧化氢酶的工业生产及应用奠定了基础。

关键词: 过氧化氢酶; 异源表达; 酶学特性

资助项目: 2022 年度许昌学院“揭榜挂帅”项目(2022JBGS10); 2022 年河南工业大学研究生教育改革与质量提升工程项目(HAUTYJS2022JD02); 河南省重大科技专项(231100110300)

This work was supported by the Xuchang College's "Unveiling the List of Commanders" Project in 2022 (2022JBGS10), the Henan University of Technology's Graduate Education Reform and Quality Enhancement Project in 2022 (HAUTYJS2022JD02), and the Major Science and Technology Program in Henan Province (231100110300).

*Corresponding author. E-mail: liuna3456@163.com

Received: 2023-08-30; Accepted: 2023-11-16; Published online: 2023-12-20

Heterologous expression and enzymatic properties of catalase from *Bacillus sonorensis* s262

WU Tiantian, LI Xiaoya, WANG Hongling, GE Wenpei, LIU Na*

School of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, Henan, China

Abstract: [Background] The catalase produced by *Bacillus sonorensis* s262 has the ability to degrade aflatoxin B₁ (AFB₁). [Objective] To express *Bacillus sonorensis* s262 peroxidase in *Escherichia coli*, optimize the expression conditions, and determine the enzymatic properties. [Methods] The catalase gene *katA* was ligated into the pET28a(+) vector to construct the recombinant expression plasmid pET28a-*katA*, which was then transformed into *E. coli* BL21(DE3) competent cells. Furthermore, the expression conditions including IPTG concentration, the induction temperature, and the induction time of the recombinant enzyme were optimized. Ni-NTA SefinoseTM resin was used to purify the recombinant enzyme. The optimal reaction temperature and thermal stability, the optimal pH and pH stability, and the effects of metal ions on the enzyme activity were determined, and the kinetics of the recombinant enzyme was analyzed by double-reciprocal plotting. The degradation rate of AFB₁ by the recombinant catalase was measured by high performance liquid chromatography. [Results] The recombinant expression plasmid pET28a-*katA* proved to be successfully constructed by double digestion (*Bam*H I and *Hind* III) and sequencing. The molecular weight of the purified recombinant enzyme ranged from 55 kDa. The expression conditions in *E. coli* were optimized as follows: induction with 0.8 mmol/L IPTG at 25 °C for 10 h. The kinetic parameters V_{\max} and K_m were (760.17±19.61) mmol/(min·L) and (63.73±3.87) mmol/L, respectively, at the optimal catalytic temperature of 50 °C and optimal pH 7.0. In addition, 0.1 mmol/L Fe²⁺, Zn²⁺, and Cu²⁺ increased the enzyme activity by 40%, 8%, and 12%, respectively, while 0.1 mmol/L K⁺ decreased the enzyme activity by 39%. The degradation rate of AFB₁ by the recombinant enzyme was 61.44%. [Conclusion] We successfully expressed and purified the catalase of *B. sonorensis* in *E. coli*, laying a foundation for the industrial production and application of catalase.

Keywords: catalase; heterologous expression; enzymatic properties

黄曲霉毒素是由黄曲霉、寄生曲霉等真菌产生的小分子代谢产物，是一类结构相似的化合物，现已发现的黄曲霉毒素约有 20 多种^[1]。其中毒性最强的黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 具有强致癌性^[2]、致畸性^[3]及致突变性^[4]，因此去除粮油食品中的 AFB₁ 始终为研究热点。AFB₁ 的去除方法主要有物理技术^[5]、化学技术^[6]

和生物技术^[7]，与传统化学物理降解黄曲霉毒素相比，生物酶解法具有效率高、副作用小等优点^[8]。实验室前期研究得知索诺拉沙漠芽孢杆菌(*Bacillus sonorensis*) s262 的 AFB₁ 降解率可达 89.75%，其硫酸铵沉淀物中的过氧化氢酶具有降解 AFB₁ 的能力^[9]，但同时也存在降解酶产量低、酶活性受到 pH 和温度等多方面的影

响。因此利用基因工程技术克隆和异源表达索诺拉沙漠芽孢杆菌过氧化氢酶、诱导表达提高过氧化氢酶产量,为提高过氧化氢酶稳定性和降解效率奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

索诺拉沙漠芽孢杆菌 s262 由本实验室筛选保存^[10]; pET28a(+) 大肠杆菌表达载体、BL21(DE3)感受态细胞、DH5 α 感受态细胞均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;含空质粒的菌株 *Escherichia coli* BL21 [pET28a(+)]由本实验室保存。

1.2 培养基

LB 培养基和 NB 培养基均参考杨弘宇等^[11]配制。

1.3 主要试剂和仪器

AFB₁ 标准品、蛋白 Marker、DNA Marker、T4 DNA 连接酶、Taq PCR 预混液(2 \times)、咪唑、细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒等,生工生物工程(上海)股份有限公司; QuickCut *Bam*H I 和 QuickCut *Hind* III, 宝日生物技术有限公司; 甲醇(色谱纯), 天津市四友精细化学有限公司; 二氯甲烷(分析纯)和硫酸铵, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 牛肉膏和蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 氯化钠, 天津市天力化学试剂有限公司。

高效液相色谱仪, 岛津公司; 基因扩增仪, 杭州博日科技股份有限公司; 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; Ni-NTA SefinoseTM Resin 预装重力柱, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.4 过氧化氢酶活性测定

采用紫外吸光度法测定过氧化氢酶活性: 100 μ L 过氧化氢酶液迅速加入 2.9 mL 50 mmol/L

PBS (含 20 mmol/L H₂O₂)中, 使用紫外分光光度计测定反应体系在 240 nm 处吸光度变化值, 以每毫升酶液每分钟催化 1 μ mol H₂O₂ 降解定义为 1 个酶活力单位^[12]。

$$U=[\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V_{\text{样}} \div T$$

式中: ΔA 为初始吸光值和 1 min 后吸光值的差值; $V_{\text{反应}}$ 为反应体系总体积(3 $\times 10^{-3}$ L); ϵ 为 H₂O₂ 摩尔吸光系数[43.6 L/(mol \cdot cm)]; d 为比色皿光径(1 cm); $V_{\text{样}}$ 为加入样本体积(0.1 mL); T 为反应时间(1 min); 10⁶ 为单位换算系数(1 mol=10⁶ μ mol)。

1.5 过氧化氢酶的异源表达

1.5.1 过氧化氢酶基因的克隆

通过细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取菌株 s262 的基因组为模板, 使用 Primer Premier 5 设计基因 *kata* 的特异性引物 *kata*-F (5'-ATGACGACAAGCAAAAACAA-3')和 *kata*-R (5'-TTAAACTTCCTGTGGCACT-3'), PCR 扩增获得 *kata* 基因片段。PCR 反应体系参考赵书雪等^[13]并略作修改。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.5.2 pET28a-*kata* 重组质粒的构建

基因 *kata* 扩增片段经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 连接到 pET28a(+)载体上构建重组质粒 pET28a-*kata*。将重组质粒转化至 *E. coli* DH5 α 感受态中, 涂布于含有卡那霉素(100 μ g/mL)的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜后挑取单菌落溶于 20 μ L 无菌水, 取 10 μ L 于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 作为模板进行菌落 PCR。PCR 反应体系(50 μ L): Taq PCR Mix 25 μ L, *kata*-F (10 μ mol/L) 1 μ L, *kata*-R (10 μ mol/L) 1 μ L, 模板(100 ng/ μ L) 2 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50.3 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。所得 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。检测成功的单菌落

对应剩余菌液接至含有卡那霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养过夜后提取质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5.3 重组酶 KatA 的诱导表达优化

将测序成功的质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 涂布于含有卡那霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。挑取长出的单菌落于 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 24 h 制备种子液, 将种子液以 5%接种量转接至新的培养基。在 OD_{600} 为 0.6–0.8 时加入 IPTG 诱导, 诱导结束后 10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 超声破碎(功率 400 W, 工作 2 s, 停 5 s, 破碎 30 min)。破碎液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min, 上清过 0.45 μm 滤膜即为粗酶液, 按照 1.4 的方法测定酶活。对不同的表达条件进行优化, 包括诱导剂 IPTG 浓度(0.4–1.0 mmol/L)、诱导温度(15–30 $^{\circ}\text{C}$)和诱导时间(6–12 h)。

1.6 重组 KatA 的纯化

pET28a(+) 在 N 端具有 His-Tag, 即经 pET28a(+) 表达出来的蛋白有组氨酸标签。Ni-NTA 琼脂糖纯化树脂可用于组氨酸标签蛋白的纯化, 将粗酶液加到 Ni-NTA SefinoseTM Resin 柱上, 结合缓冲液洗去杂蛋白, 洗脱缓冲液梯度洗脱目的蛋白。得到的过氧化氢酶经 SDS-PAGE 检测, 并使用 Bradford 方法测定蛋白质含量^[14]。

1.7 重组酶学性质测定

1.7.1 最适反应温度和热稳定性

在不同反应温度下(温度范围为 30–70 $^{\circ}\text{C}$, 梯度为 10 $^{\circ}\text{C}$)测定重组酶最适反应温度, 计算酶活。将一定量纯化后的重组酶在最适反应温度下保温, 每隔一定时间取样, 测酶活。

1.7.2 最适反应 pH 和 pH 稳定性

配制不同 pH 含 20 mmol/L H_2O_2 的缓冲液,

在最适温度下测定重组酶的酶活。不同 pH 的缓冲液分别为 Na_2HPO_4 -柠檬酸(pH 分别为 5.0 和 6.0)、Tris-HCl (pH 分别为 7.0、8.0 和 9.0) 和 Glycine-NaOH (pH 10.0)。测定 pH 稳定性时, 将过氧化氢酶使用不同 pH 的缓冲液复溶(不含 H_2O_2), 放置 1 h 后测定剩余酶活力。

1.7.3 动力学参数的测定

配制含 2.5–50.0 mmol/L H_2O_2 的缓冲液, 分别测定酶活力, 在 Origin 2021 中采用双倒数作图法得到重组过氧化氢酶的 K_m 、 V_{max} , 并计算 k_{cat} 。

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}; k_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/[Et]$$

式中: V 为反应速度; S 为底物浓度; Et 为酶浓度。

1.7.4 金属离子对酶活的影响

在酶液中分别添加 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Li^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 至浓度为 0.1 mmol/L 1 h 后测定酶活力, 以不加金属离子的酶液作为对照。

1.8 重组酶 AFB₁ 降解率的测定

将 900 μL 纯化的重组酶与 100 μL AFB₁ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 混合, 置于 10 mL 离心管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 避光培养 48 h。以 10 mmol Tris-HCl 代替纯化的过氧化氢酶作为对照组。反应结束后采用高效液相色谱法测定残留 AFB₁ 的浓度。每组设置 3 个平行样品。

AFB₁ 的提取及检测参考 Xu 等^[15]的方法并略作修改: 使用二氯甲烷提取反应结束样液中的 AFB₁, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干后加入 1 mL 甲醇复溶, 经 0.22 μm 滤膜过滤后于 HPLC 检测。检测条件及降解率计算方法与刘亚楠等^[16]一致。

2 结果与分析

2.1 质粒的构建与转化

以索诺拉沙漠芽孢杆菌基因组为 DNA 模

板进行 *katA* 的 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳检测其大小与 NCBI 数据库中的 *katA* 一致(1 458 bp) (图 1)。纯化后, 将 PCR 获得的目的基因片段插入表达载体 pET28a(+)中, 得到重组质粒 pET28a-*katA* (图 2)。通过酶切和测序验证表达载体 pET28a-*katA* 的成功构建。

2.2 重组酶的诱导表达及表达条件优化

IPTG 浓度对过氧化氢酶活力的影响结果如图 3A 所示, 当 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L 与 0.6 mmol/L 时, 酶活性差别不大, IPTG 浓度由 0.6 mmol/L 升至 0.8 mmol/L 时, 酶活明显提升, IPTG 浓度升至 1.0 mmol/L 时, 酶活少许降低。当 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L 时酶活性最高, 为 540.13 U/mL, 后续试验选择 0.8 mmol/L IPTG。

不同诱导温度对重组酶表达的影响如图 3B 所示, 当诱导温度低于 25 °C 时, 酶活随诱导温度的提高而提高, 温度高于 25 °C 时酶活降低。

在诱导时间为 6–12 h 时对酶活力进行测定, 结果如图 3C 所示, 当诱导时间低于 10 h, 酶活随诱导时间增加而增加, 超过 10 h, 酶活随诱导时间降低。

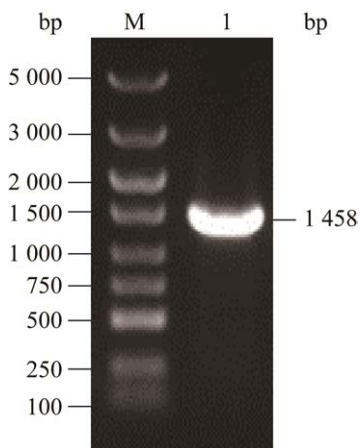


图 1 *katA* 基因 PCR 扩增图 M: DL5000 DNA Marker; 1: 过氧化氢酶基因 *katA*

Figure 1 *katA* gene PCR amplification map. M: DL5000 DNA Marker; 1: Catalase gene *katA*.

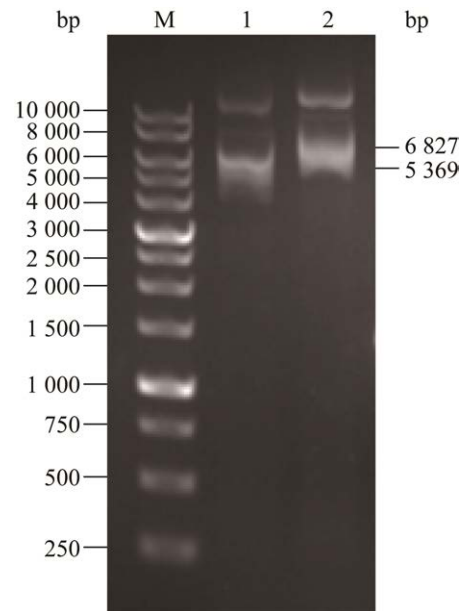


图 2 pET28a-*katA* 质粒构建图 M: DL10000 DNA Marker; 1: 空质粒 pET28a(+); 2: 构建质粒 pET28a-*katA*

Figure 2 Plot of pET28a-*katA* plasmid constructs. M: DL10000 DNA Marker; 1: Empty plasmid pET28a(+); 2: Constructed plasmid pET28a-*katA*.

2.3 重组酶的纯化

IPTG 诱导表达后制备粗酶液, 经镍柱纯化, SDS-PAGE 检测如图 4 所示, 重组过氧化氢酶分子量大小在 55 kDa。

2.4 重组酶学性质分析

2.4.1 酶最适反应温度及热稳定性检测

如图 5A 所示, 在温度较低时, 随着温度的升高, 酶活力也不断增加, 在 50 °C 时酶活达到最高, 随着温度的继续升高, 酶活开始下降, 说明高温破坏酶的蛋白结构, 对酶促反应造成较大的影响。与此同时, 试验还研究了该酶在最适温度 50 °C 下的热稳定性(图 5B), 酶液被处理 2 h 后剩余酶活为 68.58%, 因此该酶热稳定性较好。

2.4.2 酶最适 pH 及 pH 稳定性检测

由图 6A 可知, 过氧化氢酶的最适反应 pH 为 7.0。将酶液置于 pH 5.0–10.0 的环境下 1 h,

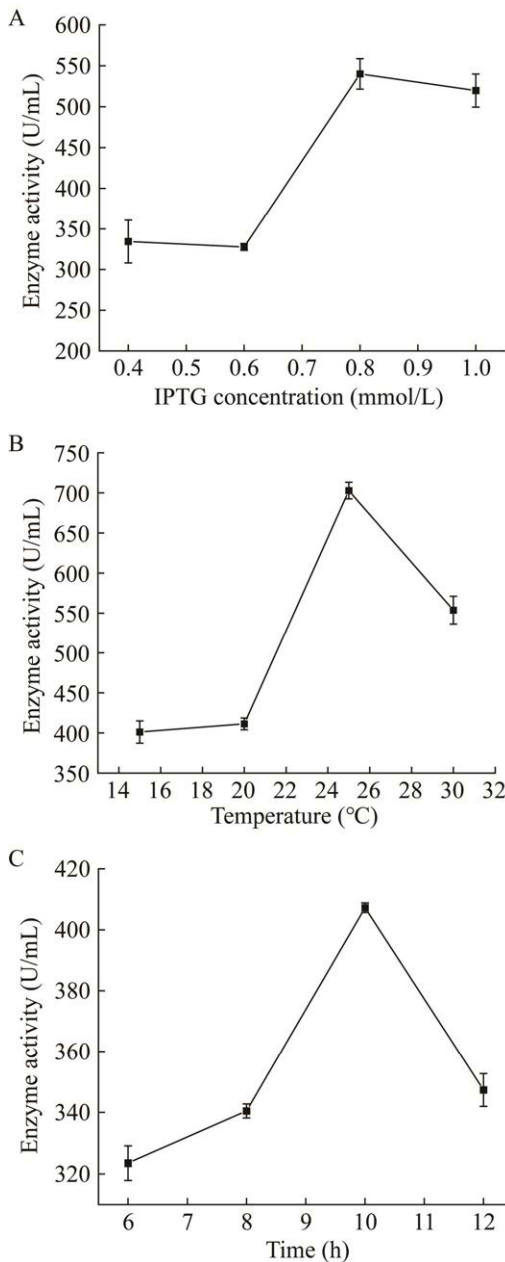


图 3 重组过氧化氢酶在大肠杆菌中的表达条件优化 A: 不同 IPTG 浓度对酶活的影响. B: 不同诱导温度对酶活的影响. C: 不同诱导时间对酶活的影响

Figure 3 Optimization of expression conditions for recombinant catalase in *Escherichia coli*. A: Effect of different IPTG concentrations on enzyme activity. B: Effect of different induction temperatures on enzyme activity. C: Effect of different induction time on enzyme activity.

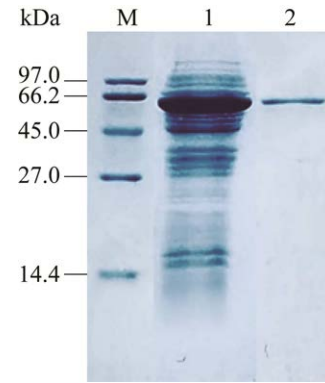


图 4 重组过氧化氢酶 SDS-PAGE 分析 M: 蛋白 marker; 1: 粗酶液; 2: 过氧化氢酶

Figure 4 SDS-PAGE analysis of recombinant catalase. M: Protein marker; 1: Crude enzyme solution; 2: Catalase.

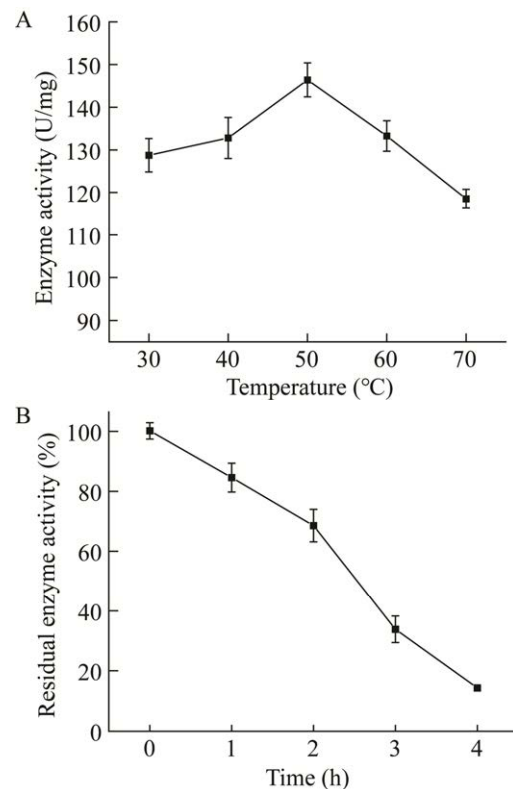


图 5 温度对重组酶活力的影响 A: 酶的最适反应温度检测. B: 酶的热稳定性检测

Figure 5 Effect of temperature on the activity of recombinant enzymes. A: Detection of the optimal reaction temperature of enzymes. B: Thermal stability assay for enzymes.

考察其残存酶活的情况, 在 pH 5.0–9.0 范围内剩余酶活均达到 40%以上(图 6B)。

2.4.3 金属离子对重组酶活力的影响

不同金属离子对酶活力的影响结果如图 7 所示, 0.1 mmol/L Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶活有一定的促进作用, 使酶活分别提高 40%、8%和 12%; Na^+ 对酶活的作用不明显; 而 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Li^+ 和 Mn^{2+} 对酶活有部分抑制作用; K^+ 对酶活抑制作用最强, 使酶活下降 39%。

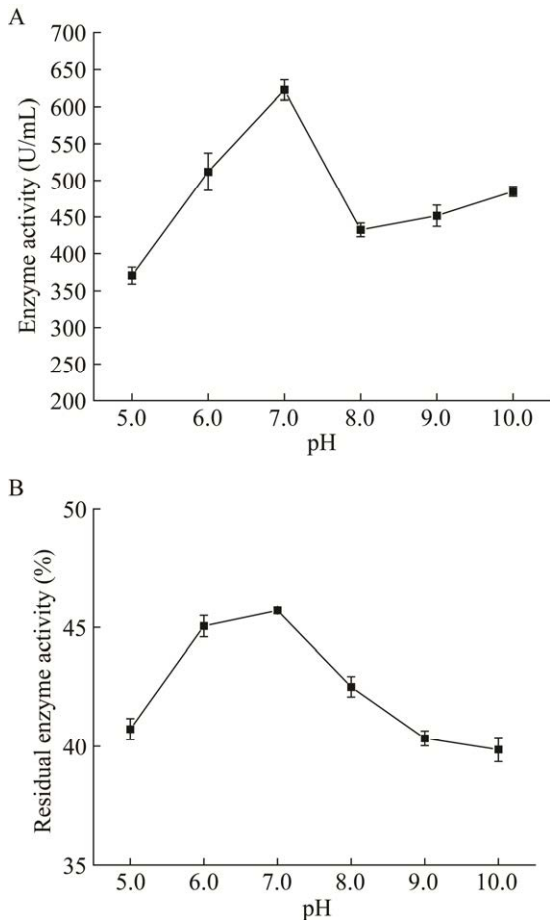


图 6 pH 对重组酶活力的影响 A: 酶的最适反应 pH 测定. B: 酶的 pH 稳定性测定

Figure 6 Effect of pH on recombinant enzyme activity. A: Determination of the pH of the enzyme's optimal reaction. B: Determination of pH stability of enzymes.

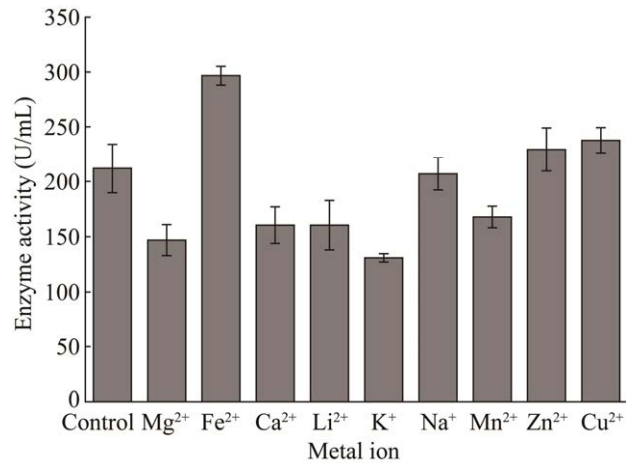


图 7 金属离子对重组酶活力的作用

Figure 7 The role of metal ions on the activity of recombinant enzymes.

2.4.4 重组酶动力学分析

通过双倒数作图法计算该酶动力学参数 V_{\max} 为 (760.17 ± 19.61) mmol/(min·L), K_m 为 (63.73 ± 3.87) mmol/L, k_{cat} 为 (500.32 ± 12.91) s⁻¹。

2.5 重组酶 AFB₁ 降解率

高效液相色谱法测定的 AFB₁ 色谱图如图 8 所示, 通过峰面积计算得出重组酶对 AFB₁ 降解率为 61.44%。

3 讨论与结论

本试验通过 PCR 扩增索诺拉沙漠芽孢杆菌过氧化氢酶基因, 并与质粒 pET28a(+) 连接, 将 pET28a-katA 转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 经过 SDS-PAGE 验证表达成功。重组酶分子量大小在 55 kDa。对重组酶表达的条件进行优化, 最适诱导条件为: IPTG 浓度 0.8 mmol/L, 温度 25 °C, 时间 10 h。IPTG 浓度高于 0.8 mmol/L 时, 酶活逐渐降低, 可能是因为在细胞培养过程中 IPTG 浓度较高给细胞带来代谢负担^[17]。该酶最适诱导温度为 25 °C, 这与杨弘宇等^[11]研究的谷氨酸棒状杆菌过氧化氢酶异源表达的最适诱导温度一致。

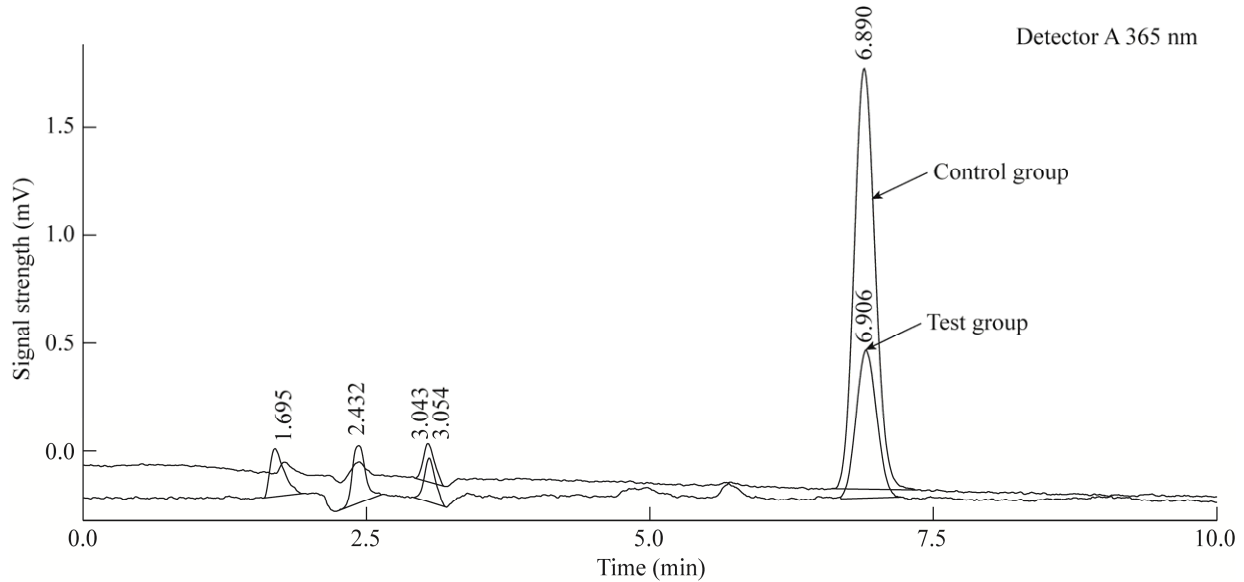


图8 重组酶降解 AFB₁ 高效液相色谱图

Figure 8 High performance liquid chromatogram of AFB₁ degradation by recombinant enzymes.

对重组酶学性质研究表明, 酶的最适温度为 50 °C, 具有良好的热稳定性。pH 是影响酶催化活性的一个重要参数, 合适的 pH 会促进反应, 反之, 极性 pH 会对酶本身结构造成损害, 影响酶的催化^[18]。在最适 pH 为 7.0 的条件下, 酶活可达到 622.62 U/mL。当 pH < 7.0 时, 随着 pH 的升高, 酶活呈增长趋势, 但当 pH > 7.0 时, 酶活开始下降。将酶液置于 pH 5.0–10.0 的环境下 1 h 后, 在 pH 5.0–9.0 时剩余酶活均达到 40% 以上, 说明该酶 pH 稳定性较好。

重组酶 V_{max} 为 (760.17 ± 19.61) mmol/(min·L), K_m 为 (63.73 ± 3.87) mmol/L, k_{cat} 为 (500.32 ± 12.91) s⁻¹。庞焦等^[19]研究枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 过氧化氢酶的 K_m 为 (18.98 ± 1.21) mmol/L。Jia 等^[20]从高温堆肥中分离出的嗜热细菌 (*Ureibacillus thermosphaericus*) FZSF03 所产过氧化氢酶的 K_m 为 101.1 mmol/L。赵书雪等^[13]研究的 *Pseudomonas stutzer* S12 过氧化氢酶 K_m 为 100.5 mmol/L, k_{cat} 为 574.05 s⁻¹。因此, 后续可对该蛋白进行改造以提高其对过氧化氢的亲和能力, 提高催化

效率^[21]。

金属离子对酶活影响的作用机制研究并不完善^[22]。有些金属离子在酶促反应时作为激活剂, 促进酶作用于底物^[23]。0.1 mmol/L Fe²⁺、Zn²⁺和 Cu²⁺对酶活有一定的促进作用, 使酶活分别提高 40%、8% 和 12%; Na⁺对酶活的作用不明显; 而 Mg²⁺、Ca²⁺、Li⁺和 Mn²⁺对酶活有部分抑制作用; K⁺对酶活抑制作用最强, 使酶活下降 39%。因此适当加入 Fe²⁺、Zn²⁺和 Cu²⁺可提高酶活。

高效液相色谱法检测得出重组过氧化氢酶对 AFB₁ 降解率为 61.44%, 降解效果较好。

本文通过在大肠杆菌 BL21(DE3) 中异源表达索诺拉沙漠芽孢杆菌过氧化氢酶, 并对其进行纯化及酶学性质研究。结果表明, 重组过氧化氢酶分子量大小在 45.0–66.2 kDa, 最适诱导条件为: IPTG 浓度 0.8 mmol/L, 温度 25 °C, 时间 10 h。重组酶具有较好的热稳定性及 pH 稳定性, 并具有降解 AFB₁ 的能力。下一步将通过定点突变等方法提高重组过氧化氢酶活力。

REFERENCES

- [1] 李昆, 姚婷, 宁雪雪, 王盼琳, 崔谱. 黄曲霉毒素的研究进展[J]. 农产品加工, 2017(6): 61-63, 66.
LI K, YAO T, NING XX, WANG PL, CUI P. The research progress of aflatoxin[J]. Farm Products Processing, 2017(6): 61-63, 66 (in Chinese).
- [2] OSTRY V, MALIR F, TOMAN J, GROSSE Y. Mycotoxins as human carcinogens: the IARC Monographs classification[J]. Mycotoxin Research, 2017, 33(1): 65-73.
- [3] 许国齐. 生猪黄曲霉毒素中毒病症的诊断与防治[J]. 今日畜牧兽医, 2017(10): 42.
XU GQ. Diagnosis and prevention of aflatoxin poisoning in pigs[J]. Today Animay Husbandry and Veterinary Medicine, 2017(10): 42 (in Chinese).
- [4] OLIVEIRA RC, CORTÉS-ESLAVA J, GÓMEZ-ARROYO S, CARVAJAL-MORENO M. Mutagenicity assessment of aflatoxin B₁ exposed to essential oils[J]. LWT, 2021, 140: 110622.
- [5] 刘辉, 卢扬, 唐建波, 刘嘉, 胡永平, 赵英彩, 刘军林, 李俊. 贵州苦荞饭中黄曲霉毒素 B₁ 物理降解技术对比[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 204-209.
LIU H, LU Y, TANG JB, LIU J, HU YP, ZHAO YC, LIU JL, LI J. Comparison of physical degradation techniques of aflatoxin B₁ in Guizhou Tartary buckwheat rice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(6): 204-209 (in Chinese).
- [6] 杨威, 董志文, 雷芬芬, 胡传荣, 何东平, 罗质. 碱液处理花生脱除花生油中黄曲霉毒素 B₁ 的研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(3): 90-93.
YANG W, DONG ZW, LEI FF, HU CR, HE DP, LUO Z. Removal of aflatoxin B₁ from peanut oil by alkaline solution treatment of peanut[J]. China Oils and Fats, 2019, 44(3): 90-93 (in Chinese).
- [7] 严家俊, 庄艺协, 吴风霞, 金佳佳, 张娟. 细菌降解黄曲霉毒素 B₁ 的研究进展[J]. 中国酿造, 2018, 37(3): 10-13.
YAN JJ, ZHUANG YX, WU FX, JIN JJ, ZHANG J. Advances in the study of bacterial degradation of aflatoxin B₁[J]. China Brewing, 2018, 37(3): 10-13 (in Chinese).
- [8] 谢慧, 高蕾, 赵丹丹, 张宏森, 毛国涛, 王风芹, 宋安东. 生物法降解黄曲霉毒素 B₁ 的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 249-256.
XIE H, GAO L, ZHAO DD, ZHANG HS, MAO GT, WANG FQ, SONG AD. Research progress in biodegradation of aflatoxin B₁[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(24): 249-256 (in Chinese).
- [9] 吴甜甜, 李晓亚, 刘亚楠, 葛文沛, 王洪玲, 刘娜. 索诺拉沙漠芽孢杆菌 s262 降解黄曲霉毒素 B₁ 发酵条件优化及活性物质初步分析[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2023. DOI: 10.16433/1.1673-2383.2023.06.000.
WU TT, LI XY, LIU YN, GE WP, WANG HL, LIU N. Optimization of fermentation conditions and preliminary analysis of active substances for the degradation of aflatoxin B₁ by *Bacillus sonora desertis* s262[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2023. DOI: 10.16433/1.1673-2383.2023.06.000.
- [10] 刘娜, 刘亚楠, 彭丹丹, 黄亮, 张莉, 黄继红, 惠明. 一株降解黄曲霉毒素 B₁ 的菌株 S262 及其应用: CN113430128A[P]. 2022-12-13.
LIU N, LIU YN, PENG DD, HUANG L, ZHANG L, HUANG JH, HUI M. Strain S262 for degrading aflatoxin B₁ and application thereof: CN113430128A[P]. 2022-12-13 (in Chinese).
- [11] 杨弘宇, 张雪, 马振平, 徐宁, 刘君. 谷氨酸棒杆菌过氧化氢酶的异源表达、纯化以及酶学性质[J]. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1568-1577.
YANG HY, ZHANG X, MA ZP, XU N, LIU J. Expression, purification and characterization of catalase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(8): 1568-1577 (in Chinese).
- [12] 王群, 刘朝巍, 徐文娟. 紫外分光光度法测定玉米过氧化氢酶活性新进展[J]. 中国农学通报, 2016, 32(15): 159-165.
WANG Q, LIU CW, XU WJ. Ultraviolet spectrophotometry measurement of catalase activity in maize[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2016, 32(15): 159-165 (in Chinese).
- [13] 赵书雪, 刘晓青, 伍宁丰, 田健. *Pseudomonas stutzeri* S12 过氧化氢酶基因的表达及酶学特性研究[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(11): 73-80.
ZHAO SX, LIU XQ, WU NF, TIAN J. Heterologous expression and characterization of a catalase from *Pseudomonas stutzeri* S12[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2021, 23(11): 73-80 (in Chinese).
- [14] 崔为同, 薛华儒, 成洪达, 张海滨, 王清路. Bradford 定量法在蛋白质组学中的应用的优化研究[J]. 生物技术进展, 2019, 9(3): 309-315.
CUI WT, XUE HR, CHENG HD, ZHANG HB, WANG QL. The optimization of the Bradford assay for protein quantitation in proteomic research[J]. Current

- Biotechnology, 2019, 9(3): 309-315 (in Chinese).
- [15] XU YH, LOU HW, ZHAO RY. Cloning and expression of the catalase gene (*KatA*) from *Pseudomonas aeruginosa* and the degradation of AFB₁ by recombinant catalase[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2023, 103(2): 792-798.
- [16] 刘亚楠, 彭丹丹, 王敏, 张明丹, 黄继红, 刘娜. 枯草芽孢杆菌 Q125 降解黄曲霉毒素 B₁ 发酵条件优化及活性物质分析[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2021, 42(4): 9-15.
- LIU YN, PENG DD, WANG M, ZHANG MD, HUANG JH, LIU N. Optimization of fermentation conditions for degradation of AFB₁ by *Bacillus subtilis* Q125 and preliminary exploration of active substances[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2021, 42(4): 9-15 (in Chinese).
- [17] MARGAWATI ET, FUAD AM, INDRIAWATI, RIDWAN M, DIAH VOLKANDARI S. Optimization of expression JTAT protein with emphasis on transformation efficiency and IPTG concentration[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2017, 15(2): 515-519.
- [18] PELLICER JA, GABALDÓN JA, GÓMEZ VM Effect of pH on pulsed light inactivation of polyphenol oxidase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 148: 109812.
- [19] 庞焦, 姜梦彤, 刘羽欣, 李明玉, 王从纲, 李宪臻. 融合自组装双亲短肽对重组过氧化氢酶酶学性质的影响[J]. 微生物学报, 2022, 62(9): 3449-3463.
- PANG J, JIANG MT, LIU YX, LI MY, WANG CG, LI XZ. Effect of fusing a self-assembling amphipathic peptide on the enzymatic properties of recombinant catalase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3449-3463 (in Chinese).
- [20] JIA XB, LIN XJ, TIAN YD, CHEN JC, YOU MS. High production, purification, biochemical characterization and gene analysis of a novel catalase from the thermophilic bacterium *Ureibacillus thermosphaericus* FZSF03[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 103: 89-98.
- [21] 冯旭东, 吕波, 李春. 酶分子稳定性改造研究进展[J]. 化工学报, 2016, 67(1): 277-284.
- FENG XD, LU B, LI C. Progress in the study of enzyme molecular stability modification[J]. CIESC Journal. 2016, 67(1): 277-284 (in Chinese).
- [22] 胡常英, 马清河, 刘丽娜, 王云鹏. 金属离子与生命活动[J]. 生物学通报, 2005, 40(8): 6-7.
- HU CY, MA QH, LIU LN, WANG YP. Metallic ion and vital function[J]. Bulletin of Biology, 2005, 40(8): 6-7 (in Chinese).
- [23] 徐龙威, 雍婕, 周海燕. 一种新型糖苷水解酶的异源表达及酶学性质研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(6): 650-658.
- XU LW, YONG J, ZHOU HY. Heterologous expression and enzymatic properties of a novel glycoside hydrolase[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences Edition), 2022, 48(6): 650-658 (in Chinese).