

文章编号 :1009 - 038X(2002)01 - 0058 - 04

重组过氧化氢酶与一种商品过氧化氢酶的性质比较

王凡强 , 王正祥 , 刘吉泉 , 诸葛健

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 ,江苏 无锡 214036)

摘 要 :将重组过氧化氢酶和市售一种商品过氧化氢酶的性质进行了比较.重组酶的最适温度为 70 ℃ ,某商品过氧化氢酶的最适温度为 40 ℃ ;与这种商品过氧化氢酶相比 ,重组酶的热稳定性更好.重组过氧化氢酶和这种商品过氧化氢酶的最适 pH 都是 7.0 ;重组酶和这种商品过氧化氢酶在 pH 3 ~ 8 的范围内均较为稳定 ,重组酶在室温放置 1 个月后酶活力基本保持不变 ,而此种商品过氧化氢酶活力损失约 70% ;金属离子对重组酶和这种商品过氧化氢酶都有抑制作用 ,抑制程度有所不同 ;EDTA 抑制这种商品过氧化氢酶的活性 ,但不抑制重组酶的活性.

关键词 :过氧化氢酶 ;重组 ;性质

中图分类号 :Q 55

文献标识码 :A

Comparison between Recombinant Catalase and Commercial Catalase

WANG Fan-qiang , WANG Zheng-xiang , LIU Ji-quan , ZHUGE Jian

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : The properties of recombinant catalase and commercial catalase were compared. The optimum temperature of recombinant catalase and commercial catalase were 70 ℃ and 40 ℃ , respectively ; the recombinant catalase was more stable than commercial catalase under high temperature circumstance. The optimum pH of both catalases was 7.0. Both catalases were stable at pH range 3 ~ 8. The activity of recombinant catalase didn't lose for a month at room temperature , while that of commercial catalase lost 70% . Both enzymes were strongly inhibited by many metal ions , The commercial catalase was inhibited by EDTA , while no affect was found on the recombinant catalase.

Key words : Catalase ; recombinant ; property

过氧化氢酶(hydrogen peroxide :hydrogen peroxide oxidoreductase EC 1. 11. 1. 6)催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 的反应 ,几乎存在于所有好氧的生物体内 ,它具有清除自由基、保护细胞免受 O_2^- 损害等保护生物机体的功能.过氧化氢酶自 1950 年就开始应用在工业生产中 ,广泛用于生物、医药、临床医学和食品领域中的某些分析测定 ;在食品和乳制品工业、纺织工业、制浆和造纸工业以及医疗器械的消毒、葡

萄糖酸的生产等方面也有越来越多的应用^[1,2]. 商品化的过氧化氢酶主要来源于牛肝、微球菌和黑曲霉.最近 Novozymes 公司推出了遗传修饰生物(GMO)生产的过氧化氢酶商品 ,用于纺织品的漂白工艺.

酶的热稳定性及贮存稳定性是能否大规模生产和商品化的关键.从 1986 年开始 ,国内外都开始进行热稳定性的过氧化氢酶的筛选工作 ,发现了几种嗜热菌产生的过氧化氢酶^[1~5].作者将嗜热脂肪芽孢杆菌

收稿日期 2001 - 09 - 03 ; 修订日期 2001 - 12 - 13.

作者简介 :王凡强(1971 -)男 ,山东五莲人 ,发酵工程博士研究生.

万方数据

产过氧化氢酶的基因 *perA* 与表达载体 pKK223-3 构建重组质粒,转化 *E. coli* 过氧化氢酶 HP[和 HP][双突变株 UM2,获得重组大肠杆菌 UM2-1,该菌能够高效表达过氧化氢酶,作者将该菌产生的过氧化氢酶与市售的一种商品过氧化氢酶的性质进行了比较。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Vibra CellTM 超声波细胞破碎仪,岛津 UV-120-2 分光光度计,异丙基- β -硫代半乳糖苷(IPTG)由华美公司提供;胰蛋白酶、酵母提取物为 Oxoid 公司产品,其余试剂为国产分析纯。

1.2 菌种及培养方法

重组大肠杆菌 UM2-1 由作者所在实验室构建。培养方法如下:从 -70°C 超低温冰箱保存的菌种挑取一环重组大肠杆菌接入盛有 50 mL LB 培养基(含氨苄青霉素 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$)的 250 mL 容积三角瓶中,于 37°C 200 r/min 培养 12~16 h,然后作为种子以 1% 接种量转接到含有 100 mL LB 培养基的 500 mL 的三角瓶中,培养至 OD_{600} 在 0.4~0.6,加入 IPTG 至终浓度为 0.75 mmol/L ,诱导培养 3 h。

1.3 过氧化氢酶活力测定

采用分光光度法测定^[6]。酶活力定义为:每分钟分解 $1\text{ }\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 所需酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.4 过氧化物酶活力测定

采用分光光度法测定^[2],底物为 2,4-二氯苯酚和 4-氨基安替比林。其方法如下:将 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的酶液添加到含有 4.1 mmol/L 2,4-二氯苯酚、 0.67 mmol/L 4-氨基安替比林和 $2.9\text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$ 的 pH 6.0 的磷酸钠-磷酸钾缓冲液中,测定 500 nm 处 OD 值的增加量^[3],摩尔消光系数 $\epsilon_{500} = 1.36 \times 10^4\text{ L}(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。酶活力定义为:每分钟生成 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 产物所需酶量为 1 个酶活力单位(U)。

2 结果与讨论

2.1 重组过氧化氢酶与一种商品过氧化氢酶的最适温度

分别在不同的反应温度下($30, 40, 50, 60, 70, 80, 90^{\circ}\text{C}$)测定重组过氧化氢酶和一种商品过氧化氢酶的过氧化氢酶活力及过氧化物酶活力,结果见图 1。重组过氧化氢酶和这种商品过氧化氢酶除了具有过氧化氢酶活力外,在以 2,4-二氯苯酚和 4-氨基安替比林为底物时都表现出一定的过氧化物酶活力。其最适反应温度分别为 70°C 和 40°C 。从图 1

中可以看出,温度对过氧化物酶活力的影响要比对过氧化氢酶活力的影响大。对重组酶来说,在 30°C 时,过氧化氢酶活力仍能达到最大值的 60% 以上,而低于 50°C 时过氧化物酶活力达不到最大值的 40%。而当反应温度高于最适温度(70°C)时,过氧化物酶活力的下降速度要小于过氧化氢酶活力的下降速度。对此种商品酶来说,在 30°C 时,过氧化氢酶和过氧化物酶的相对活力分别是最适温度(40°C)时的 90% 和 50% 左右,高于 40°C 时,过氧化物酶活力的下降速度要大于过氧化氢酶活力的下降速度。

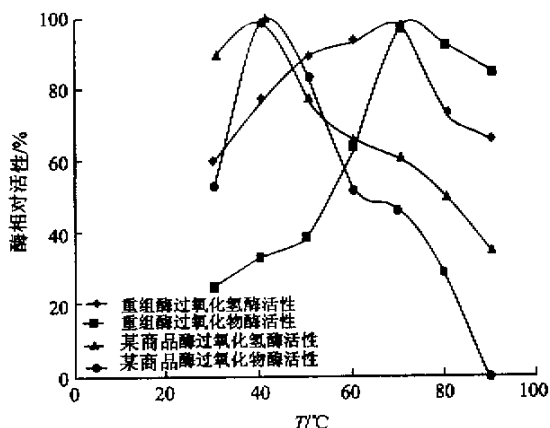


图 1 温度对重组酶和某商品酶活性的影响

Fig.1 Effect of temperature on activity of recombinant catalase and commercial catalase

2.2 重组酶的热稳定性

将酶液在 $30 \sim 90^{\circ}\text{C}$ 分别保温 10、30、60 min,然后按常规方法测定过氧化氢酶和过氧化物酶活力,以最初的酶活力作为 100%。结果见图 2。重组酶的过氧化氢酶活力在 60°C 以下较稳定,保温 60 min 后基本不变。温度在 70°C 以上时酶失活较快, 70°C 保温 60 min 后酶活尚有 80% 以上;而 80°C 保温 10 min 后酶活已损失近 50%, 90°C 保温 10 min 后酶活损失约 70%,保温 30~60 min 后酶活几乎损失殆尽。由图 2 还知重组酶的过氧化物酶活力在 60°C 以下时同样较稳定,保温 60 min 后基本保持不变。但温度高于 70°C 时酶活力损失较快, 70°C 保温 10 min 后酶活损失近 10%,保温 60 min 后损失近 40%; 80°C 保温 10 min 后酶活损失近 70%,保温 60 min 后已基本无酶活; 90°C 保温 10 min 后酶活损失近 90%,保温 30 min 及 60 min 后酶活几乎损失殆尽。

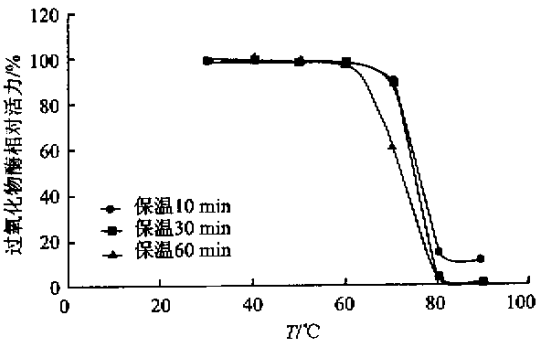
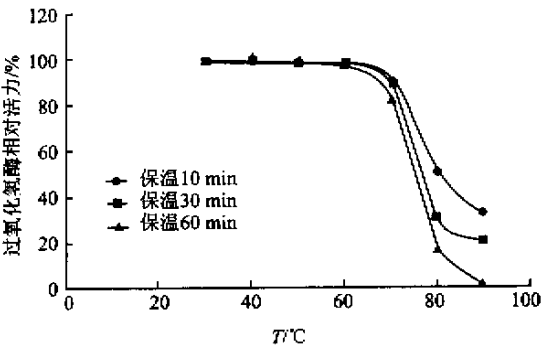


图 2 重组酶的热稳定性

Fig.2 Thermal stability of recombinant catalase(2-1 , catalase activity 2-2 peroxidase activity)

2.3 一种商品过氧化氢酶的热稳定性

将酶液在 30~90℃ 分别保温 10、30、60 min ,然后按常规方法测定过氧化氢酶酶活力.以最初的酶活力作为 100% ,结果见图 3.这种商品过氧化氢酶也具有较好的稳定性 40℃ 以下保温 60 min 时酶活基本无损失 ,50℃ 保温 60 min 酶活仅损失 10% 左右 ,60℃ 保温 60 min 酶活损失近 30% ,80℃ 以上保温时酶活损失较快 ,80℃ 保温 10 min 后酶活损失 50% 以上 ,保温 60 min 损失近 90% ;90℃ 保温 10 min 以上几乎测不到过氧化氢酶活力.

化氢酶的活力都在其最大值的 70% 以上 ,而重组酶的过氧化物酶活力的 pH 范围较窄 ,pH 值在 5~8 的范围内其活力为最大值的 60% 以上.

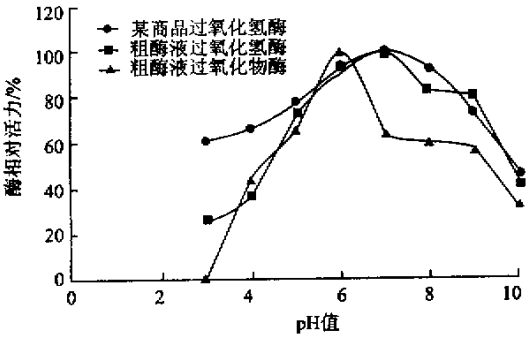
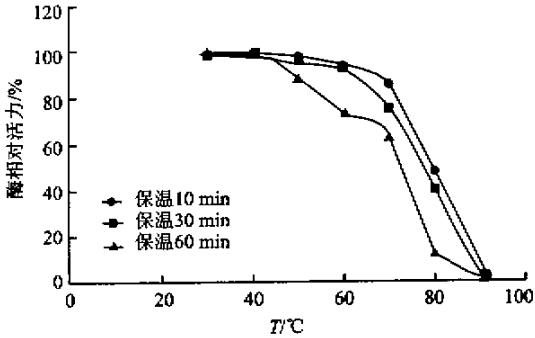


图 3 某商品过氧化氢酶的热稳定性

Fig.3 Thermal stability of commercial catalase

2.4 pH 对重组酶和一种商品过氧化氢酶活力的影响

用 pH 3.0~8.0 的 0.02 mol/L 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液和 pH 9.0~10.0 的 0.02 mol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液分别配制底物 ,按常规方法测定酶活力 ,结果见图 4.表明重组酶过氧化氢酶的最适 pH 为 7.0 ,过氧化物酶的最适 pH 为 6.0 ,这种商品过氧化氢酶的最适 pH 为 7.0.相对来说 ,pH 值对重组酶活力的影响更大一些 .pH 值小于 4 时重组酶的过氧化氢酶活力低于最适值的 50% ,而 pH 值为 3 时过氧化物酶的催化反应几乎不能进行 .pH 值在 5~9 的范围内 ,重组酶的过氧化氢酶活力和 NOVO 过氧

图 4 pH 对酶活力的影响

Fig.4 Effect of pH on activity of recombinant catalase and commercial catalase

2.5 重组酶和一种商品过氧化氢酶的 pH 稳定性

将酶与 pH 3.0~8.0 的 0.02 mol/L 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液和 pH 9.0~10.0 的 0.02 mol/L 的甘氨酸-NaOH 缓冲液混合 4℃ 放置 40 h ,按常规方法测定酶活力.结果表明 ,重组酶的 pH 稳定性比这种商品过氧化氢酶稍好 ,在 pH 3~8 的范围内是比较稳定的 ,在 pH 4~8 的范围内酶活保留原有酶活的 70% 以上 ,而该商品过氧化氢酶在 pH 4~7 的范围内 ,酶活仍保留 70% 以上 ,pH 8.0 时残余酶活为 60% 左右 ,见图 5.

2.6 重组酶和一种商品过氧化氢酶的贮存稳定性

将酶在室温放置 7、14、21、28 d ,按常规方法测定酶活力 ,以最初的酶活力为 100% ,结果见图 6.表明重组酶在室温放置 28 d 后 ,无论是过氧化氢酶还是过氧化物酶活性都几乎没有变化 ,而这种商品过氧化氢酶放置 7 d 酶活力损失约 30% ,放置 28 d 酶活力损失约 70% ,说明重组酶的贮存稳定性要优于该商品过氧化氢酶.

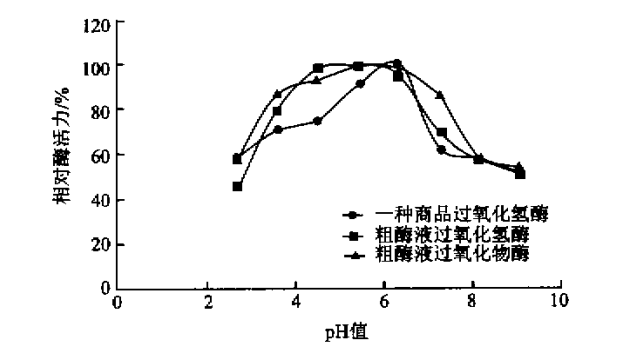


图 5 酶的 pH 稳定性

Fig.5 pH stability of recombinant catalase and commercial catalase

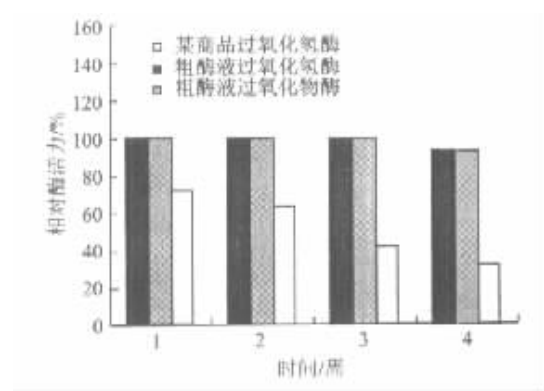


图 6 酶的贮存稳定性

Fig.6 Storing stability of recombinant catalase and commercial catalase

2.7 金属离子和 EDTA 对酶活的影响

分别向酶液中加入 1 mmol/L 的各种化合物或 10、50 mmol/L 的 EDTA,在 4℃放置 40 h,然后按常规方法测定酶活力,以不加金属离子的酶活力为 100%,结果见表 1。所有试验所测的金属离子对重组酶和一种商品过氧化氢酶的活力都有抑制作用,其中重组酶的过氧化氢酶活性受抑制的程度最大,而重组酶的过氧化物酶的活性受抑制的程度较小。EDTA 抑制这种商品过氧化氢酶的活性,但不抑制重组酶的活性。

3 结 语

一般来说,过氧化氢酶具有双重功能,即具过氧化氢酶活性及类似过氧化物酶活性或过氧化物酶活性。试验表明所得到的重组过氧化氢酶兼有过氧化物酶活性,在最适条件下重组过氧化氢酶活力与过氧化物酶活力之比为 273.5;而一种商品过氧化氢酶也表现出微弱的过氧化物酶活力,其过氧化氢酶活力与过氧化物酶活力之比为 14/204.6。相对而言,这种商品过氧化氢酶以 2,4-二氯苯酚和 4-氨

基安替比林为底物时基本不表现出过氧化物酶活性。

表 1 金属化合物离子和 EDTA 对重组酶和一种商品过氧化氢酶活力的影响

Tab.1 Effect of metal compounds and EDTA on activity of recombinant catalase and commercial catalase			
化合物	某商品过氧化氢酶相对活力/%	粗酶液过氧化氢酶相对活力/%	粗酶液过氧化物酶相对活力/%
FeSO ₄	52.3	26.9	55.6
BaCl ₂	40.2	0	76.0
MnCl ₂	0	0	75.5
ZnSO ₄	42.5	3.9	78.3
CoSO ₄	0	34.6	92.2
Fe ₂ (SO ₄) ₃	59.2	0	72.8
CuCl ₂	39.7	47.4	81.7
CuSO ₄	52.3	34.6	80.3
Al(NO ₃) ₃	41.4	37.3	89.4
MgSO ₄	59.2	21.8	63.3
CaCl ₂	27.6	15.5	70.6
EDTA (10 mmol/L)	51	100	100
EDTA (50 mmol/L)	46	100	100

试验表明重组过氧化氢酶最适温度 70℃,其过氧化氢酶活性的最适 pH 为 7.0,过氧化物酶活性的最适 pH 为 6.0。这种商品过氧化氢酶最适温度为 40℃,最适 pH 为 7.0。重组酶的热稳定性优于该商品过氧化氢酶,在 60℃以下保温 60 min 重组酶过氧化氢酶活性基本不变,而这种商品过氧化氢酶在 60℃保温 60 min 酶活力损失约 30%。重组酶的 pH 稳定性与这种商品过氧化氢酶类似,在 pH 3~8 的范围内稳定性均较好。重组酶在室温放置一个月酶活基本不变,而这种商品过氧化氢酶在室温放置一个月酶活力损失约 70%。

过氧化氢酶可用于任何需要快速清除过氧化氢的地方,因此毫无疑问它的工业化和商业化前景与过氧化氢的广泛使用是分不开的。近年来随着二噁英事件的发生,在纺织和制浆造纸工业用 H₂O₂ 替代含氯产品进行漂白已经成为趋势,因此过氧化氢的用量以 8%~10% 的速度逐年增加,世界范围

(下转第 66 页)

3 结 论

1)经水提取、乙醇沉淀、柱色谱分离获得了均一的 LBPS-I 多糖 ,该多糖是一种纯粹的非淀粉类葡

聚糖 ,是由 α -D-(1 4)-Glc_p 和 α -D-(1 3)-Glc_p 以 2:1 的比例交替形成主链 ,并有 α -D-(1 ,6)-Glc_p 侧链的葡聚糖 .

2)鼠移植性实体瘤研究表明 ,LBPS-I 对移植性黑色素 B16 和 Lewis 肺癌有较强的抑制作用 .

参考文献 :

[1] 李卫民 孟宪纾 . 中药百合的研究概况 [J]. 中草药 ,1991 22(6) :277 - 279 .
[2] 侯秀云 陈发奎 . 百合化学成分的分离与结构鉴定 [J]. 药学学报 ,1998 23(12) :923 - 926 .
[3] 姜茹 匡永清 吴少华 . 百合免疫活性多糖的分离及其组成 [J]. 第四军医大学学报 ,1998 19(2) :188 .
[4] 张继敏 匡永清 吴少华等 . 百合多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国中医药科技 ,1996 3(5) :15 - 17 .
[5] 李志孝 刘方明 陈耀祖 . 鬼臼葡聚糖的化学结构 [J]. 化学学报 ,1996 54 :1037 .
[6] BJORDAL H , LINDBERG B , SVENSSON S . Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates [J]. **Carbohydr Res** , 1967 , 5 :433 - 440 .
[7] WHISTER R L . Methods in carbohydrate chemistry [M]. New York and London : Academic Press ,1965 . 2 - 23 .
[8] ASPINALL G O , FERRIER R J . A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrates [J]. **Chem Ind (London)** ,1957(7) :1216 - 1221 .
[9] AGRAWAL P K . NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides [J]. **Phytochemistry** , 1992 32 (10) :3307 - 3330 .
[10] GORIN P A J . Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides [J]. **Adv Carbohydr Chem Biochem** , 1981 38 : 13 - 39 .
[11] 张惟杰 . 复合多糖生化研究技术 [M]. 杭州 : 浙江大学出版社 ,1994 . 324 - 340 .

(责任编辑 :秦和平)

(上接第 61 页)

内过氧化氢的用量从 1987 年的 82 万吨增长到 1995 年的 195 万吨 ,而美国从 1991 年的 11.5 万吨增长到 1999 年的 22 万吨^[2] . 而利用过氧化氢酶快速去除过氧化氢不仅完全 ,节约用水和能源 ,缩短工艺时间 ,而且不会生成硫酸盐或氮盐等有害物质 ,且酶本身是生物可降解材料 ,有利于保护环境 . 纺织

品和纸浆的漂白都是在 70 ~ 95 ℃ 的高温条件下完成的 ,而所获得的重组酶的良好热稳定性将使得漂白结束后不需用水清洗 ,直接在位清除过氧化氢成为可能 . 重组酶的良好贮存稳定性也是其商品化的一大优势 . 因此 ,所获得的重组酶就其性质来说有商品化的潜力 .

参考文献 :

[1] 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 [J]. 微生物学报 ,1990 30(3) :223 - 227 .
[2] PATRICK DHAESE . Catalase : An enzyme with growing industrial potential [J]. **Chimica Oggi** ,1996 14(1) :19 - 21 .
[3] SUVIT LOPRASERT , SEIJI NEGORO , HIROSUKE OKADA . Thermostable peroxidase from *Bacillus stearothermophilus* [J]. **Journal of General Microbiology** ,1988 134 :1971 - 1976 .
[4] ALLGOOD G S , PERRY J J . Characterization of a manganese-containing catalase from the obligate thermophile *Thermoleophilum album* [J]. **J Bacteriology** ,1986 168(2) :563 - 566 .
[5] MASAYUKI KAGAWA , NORIYUKI MURAKOSHI , YASUSHI NISHIKAWA , et al . Purification and cloning of a thermostable manganese catalase from a thermophilic bacterium [J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics** ,1999 363(2) :346 - 355 .
[6] AEBI H E . CATALASE . Methods of Enzymatic analysis [M]. Weinheim : Verlag Chemie , 1983 .

(责任编辑 :李春丽 朱 明)