蒜苗过氧化氢酶的分离纯化及部分性质研究

胡瑞斌，孙　芳，任美凤，唐云明*
(西南大学生命科学学院，重庆市甘薯工程研究中心，三峡库区生态环境教育部重点实验室，重庆　400715)

摘　要：新鲜蒜苗经匀浆、缓冲液浸提、硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sepharose离子交换层析、Superdex-200凝胶过滤层析，获得电泳纯的过氧化氢酶。该酶比活力达到25975.36U/mg，酶活回收率为40.05%，纯化倍数为125.97。该酶的全分子质量为234.93kD，亚基分子质量为59.16kD；最适温度为45℃，最适pH值为7.2，该酶在25～45℃及pH5.0～10.0的范围内有较好的稳定性；在最适条件下测得其K_m值为38.2mmol/L；甲醇、乙醇、异丙醇及SDS、KSCN、Ag^+、Cu^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}、Cd^{2+}、Zn^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Ba^{2+}对该酶有抑制作用，Li^+、Pb^{2+}及低浓度K^+对该酶具有一定的激活作用。

关键词：蒜苗；过氧化氢酶；分离纯化；性质

Isolation, Purification and Some Characterization of Catalase from Garlic Seedlings

HU Rui-bin，SUN Fang，REN Mei-feng，TANG Yun-ming*
(Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education,
Chongqing Sweet-potato Engineering Research Center, School of Life Science, Southwest University, Chongqing　400715, China)

Abstract：Electrophoresis-purity catalase from fresh garlic seedlings was obtained through homogenization, buffer solution extraction, ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose ion exchange chromatography and Superdex-200 gel filtration chromatography. The specific activity of purified CAT was 25975.36 U/mg with a recovery of 40.05% and a purification factor of 125.97. The molecular and subunit molecular weight of this enzyme was 234.93 kD and 59.16 kD, respectively. It was relatively stable in the range of 25—45 ℃ and pH 5.0—10.0 Its optimum temperature and pH were 45 ℃ and 7.2, respectively. Furthermore, its K_m was 38.2 mmol/L under the optimum conditions. Its activity was inhibited by methanol, ethanol, isopropanol, SDS and KSCN as well as some metal ions such as Ag^+, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} and Ba^{2+}, but was activated by Li^+ and Pb^{2+} as well as low concentration of K^+.

Key words：garlic seedlings；catalase；isolation and purification；characterization
中图分类号：Q946.5　　文献标志码：A　　文章编号：1002-6630(2013)09-0250-06
doi:10.7506/spkx1002-6630-201309051

过氧化氢酶(catalase，CAT)又称触酶，是一类普遍存在于动植物和绝大多数需氧微生物体内的末端氧化酶。其生理功能是催化细胞内过氧化氢分解，防止过氧化，清除生物体内的活性氧[1]。与超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)共同组成了生物体内活性氧防御系统[2]。它在食品加工、临床医疗、纺织、印染、环保等行业具有十分重要的应用价值[3-9]。同时来源于植物的CAT市场上很少，而且植物材料含有相对较少的杂蛋白，因此研究开发取材简便、价格低廉、活性较高而且性质稳定的植物CAT有着十分重要的意义。蒜苗，又叫蒜毫、青蒜，是大蒜幼苗发育到一定时期的青苗，是一种四季生长又廉价易得的绿色蔬菜。它含有丰富的VC以及可溶性蛋白质、游离氨基酸、多糖、大蒜素等营养成分并能增进食欲，具有杀菌作用[10]。经研究发现，蒜苗中过氧化氢酶含量较一般植物中高，在实验过程中较稳定且从蒜苗中分离纯化过氧化氢酶未见报道。本研究以新鲜的蒜苗为材料，从中分离纯化CAT并对其部分性质进行研究，以期为工业生产及进一步的开发应用该酶提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

以新鲜白皮蒜苗的叶片为提取过氧化氢酶的材料，购自重庆市北碚区菜市场。

收稿日期：2012-06-20
基金项目：重庆市科委重点攻关项目(CSTC2011AB1027)
作者简介：胡瑞斌(1985—)，男，硕士研究生，主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail：huruibin55@163.com
*通信作者：唐云明(1960—)，男，教授，博士，主要从事蛋白质与酶工程研究。E-mail：tbright@swu.edu.cn

DEAE-Sepharose、Superdex-200、凝胶过滤层析分子质量标准品、蛋白质SDS-PAGE标准品　美国GE Healthcare公司；三羟甲基氨基甲烷　香港Farco公司；丙烯酰胺、甲叉-双丙烯酰胺　瑞士Fluka公司；考马斯亮蓝R-250　美国Bio-Rad公司。

1.2　仪器与设备

Mill-Q plus超纯水仪　美国Millipore公司；PHS-32W微电路pH计　上海理达仪器厂；精密电子天平　瑞士Mettler-Toledo公司；GL-21M高速冷冻离心机　湖南湘仪公司；UV-2550型分光光度计、蛋白核酸定量仪　日本岛津公司；AKTA prime plus蛋白质纯化系统　美国GE公司；冷冻干燥仪　德国Uni Equip公司；垂直板电泳槽和电泳仪　美国Bio-Rad公司。

1.3　方法

1.3.1　粗酶液的提取

新鲜蒜苗叶片，用去离子水冲洗干净，擦干，称质量后剪碎，然后按1:2(*m*/*V*)的比例加入4℃预冷的0.05mol/L磷酸盐提取缓冲液(pH7.2)，匀浆(12000r/min，15s，每隔5s停1次)后，置4℃冰箱静置抽提2h；在4℃条件下12000r/min离心60min，取上清液即得粗酶液。

1.3.2　硫酸铵分级沉淀

向粗酶液中加入硫酸铵粉末至30%饱和度，4℃盐析2h，12000r/min离心35min收集上清；加入硫酸铵粉末至40%饱和度，4℃盐析2h，6000r/min离心35min，收集沉淀；加入0.05mol/L磷酸盐提取缓冲液(pH7.2)至沉淀完全溶解，4℃用0.05mol/L pH7.2磷酸盐提取缓冲液(含1mmol/L的EDTA)透析过夜即得初酶液。

1.3.3　DEAE-Sepharose层析

经0.05mol/L pH7.2磷酸缓冲液(含1mmol/L的EDTA)平衡层析柱后，初酶液加样10mL，用0～1mol/L的NaCl溶液(含0.05mol/L，pH7.2的磷酸缓冲液，1mmol/L的EDTA)进行线性梯度洗脱，流速0.5mL/min，每管收集5mL；紫外检测波长为280nm。测定各管过氧化氢酶液的活性和蛋白含量，收集活性较高的酶液。

1.3.4　Superdex-200层析

经0.05mol/L pH7.2磷酸缓冲液(含1mmol/L的EDTA)平衡层析柱后，取上述活性较高的酶液，每次加样4mL，用0.05mol/L pH7.2磷酸缓冲液(含1mmol/L的EDTA)缓冲液洗脱，流速0.3mL/min，每管收集3mL；测定各管过氧化氢酶液的活性和蛋白含量；收集活性较高的酶液，4℃去离子水透析脱盐冷冻干燥后，获得过氧化氢酶纯品，－20℃冰箱保存。

1.3.5　CAT活力的测定

以过氧化氢为底物，按文献[11]的方法测定。一个酶活力单位(U)定义为：在测定条件下，每分钟催化分解1μmol过氧化氢所需的酶量。

1.3.6　CAT纯度鉴定与分子质量测定[12]

用SDS-PAGE电泳对该酶纯度鉴定，12%的分离胶，加样量为10μL。经SDS-PAGE电泳和Superdex-200凝胶过滤层析分别测定该酶的亚基分子质量和全分子质量。

1.3.7　蛋白质浓度的测定

用紫外分光光度法与考马斯亮蓝(Bradford)染料法测定[13]。

1.3.8　CAT性质的测定

1.3.8.1　最适温度和温度稳定性

分别测定该酶不同温度20～75℃，间隔为5℃条件下的酶活力(在最适温度条件下测得的酶活力作为100%)及将酶液分别放置在不同温度25～65℃，间隔为10℃条件下，每隔1h测定酶活力(在25℃条件下原酶液的酶活力作为100%)，计算相对酶活力以确定该酶的最适温度和温度稳定性。

1.3.8.2　最适pH值和pH值稳定性

分别测定不同pH4.0～10.6条件下的酶活力及将酶液分别放置在不同的pH值为4.0～10.6的缓冲液中，25℃条件下60min后测定酶活力，二者均以在最适条件下测得的酶活力作为100%，计算相对酶活力以确定该酶的最适pH值并研究其pH值稳定性。

1.3.8.3　米氏常数(K_m)的测定

配制不同浓度5、15、25、35、45mmol/L的过氧化氢，分别在最适温度和最适pH值条件下测定各浓度底物条件下CAT的酶活力，采用双倒数(Lineweaver-Burk)作图法[14]确定该酶的K_m值。

1.3.8.4　部分有机溶剂对CAT活性的影响

分别将甲醇、乙醇、异丙醇与磷酸盐抽提缓冲液和酶液混匀(混匀后体积分数分别为10%、20%、30%、40%、50%、60%)，在4℃条件下放置30min，然后在最适条件下测定该酶的活性(采用等量的酶液和不加有机溶剂的该缓冲液混合时的酶活力为100%)。

1.3.8.5　部分化合物对CAT活性的影响

分别将尿素、KSCN、EDTA、ASA、SDS配成100mmol/L母液，按一定比例与磷酸盐抽提缓冲液和酶液混合(混合后浓度分别为10、20、30、40mmol/L)，在4℃条件下放置30min，然后在最适条件下测定该酶的活性(采用等量的酶液和不加化合物的该缓冲液混合时的酶活力为100%)。

1.3.8.6　部分金属离子对CAT活性的影响

分别将部分金属离子配成50mmol/L母液，按一定比例与去离子水和酶液混合(混合后的浓度分别为1、2、3、4、5mmol/L)，在4℃条件下放置30min，然后在最适条件下测定该酶的活性(采用等量的酶液和不加金属离子的去离子水混合时的酶活力为100%)。

2 结果与分析

2.1 蒜苗CAT的分离纯化

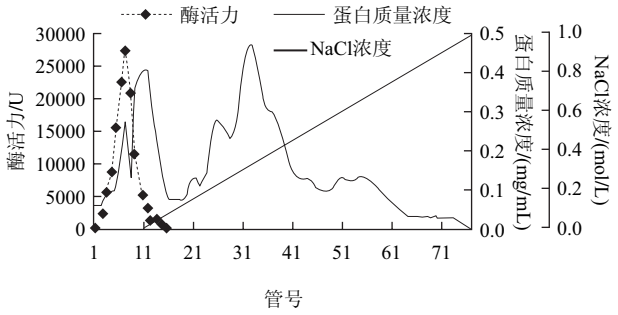


图 1 蒜苗CAT的DEAE-Sepharose离子交换层析

Fig.1 DEAE-Sepharose ion-exchange chromatography of catalase from garlic seedlings

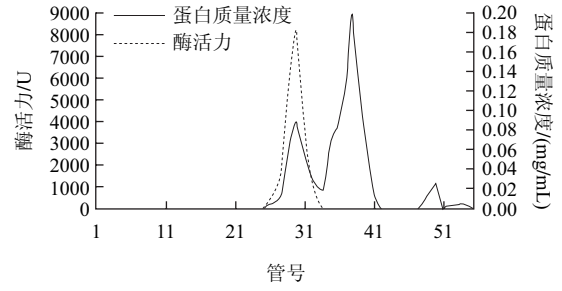


图 2 蒜苗CAT的Superdex-200凝胶过滤层析

Fig.2 Superdex-200 gel filtration chromatography of catalase from garlic seedlings

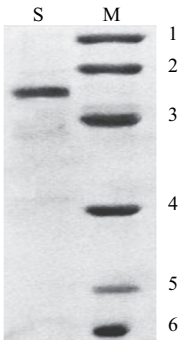
表 1 蒜苗CAT的分离纯化

Table 1 Summary of isolation and purification of catalase from garlic seedlings

纯化步骤	总蛋白/mg	总酶活力/U	酶比活力/(U/mg)	酶活回收率/%	纯化倍数
粗酶液	5032.07	1037615.09	206.20	100.00	1.00
硫酸铵分级沉淀	397.71	724007.55	1820.43	69.78	8.83
DEAE-Sepharose	52.07	434662.64	8347.52	41.89	40.48
Superdex-200	16.00	415610.00	25975.36	40.05	125.97

由图1可知，经过DEAE-Sepharose离子交换层析进行线性梯度洗脱，且洗脱缓冲液中加入1mmol/L的EDTA后，保护了该酶的活性，同时与绝大多数杂蛋白分离开来。由图2可知，经Superdex-200凝胶过滤层析后杂蛋白和该酶进一步得到较好的分离。酶的整个纯化过程如表1所示，该酶的比活力、回收率、纯化倍数都相对较高，分别为25975.36U/mg、40.05%、125.97；纯化后的CAT经过SDS-PAGE电泳，考马斯亮蓝R-250染色，脱色后显示为单一条带(图3)，表明分离纯化后的该酶已为电泳纯，达到了理想的分离效果。

2.2 过氧化氢酶分子质量

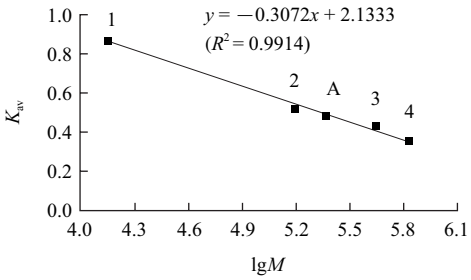


M. 分子质量标准品；S. 蒜苗过氧化氢酶 59.16kD；1. 兔磷酸化酶B 97.0kD；2. 牛血清白蛋白66.0kD；3. 鸡卵清蛋白45.0kD；4. 牛碳酸酐酶30.0kD；5. 胰蛋白酶抑制剂20.1kD；6. α-牛乳清蛋白14.4kD。

图 3 蒜苗CAT的SDS-PAGE电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE of purified catalase from garlic seedlings

由图3可知，经SDS-PAGE测得酶的亚基分子质量为59.16kD。由图4可知，经Superdex-200凝胶过滤层析测得该酶的全分子质量为234.93kD，由此说明蒜苗过氧化氢酶由4个相同的亚基构成。



1. 溶菌酶14.30kD；2. 醛缩酶158.0kD；3. 铁蛋白440.0kD；4. 甲状腺球蛋白669.0kD；A. 蒜苗过氧化氢酶234.9kD。

图 4 Superdex-200凝胶过滤层析测蒜苗CAT的分子质量

Fig.4 Molecular weight estimation of catalase by Superdex-200 gel filtration chromatography

2.3 蒜苗CAT的部分理化性质研究

2.3.1 最适作用温度和热稳定性

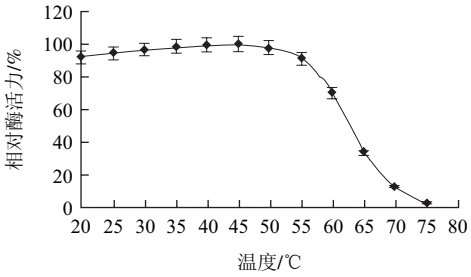


图 5 温度对蒜苗CAT酶活力的影响

Fig.5 Effect of temperature on catalase activity

由图5可知，蒜苗过氧化氢酶的最适温度为45℃，在20～55℃范围内该酶的活性均保持在90%以上。由图6可

知，该酶在25～45℃范围内的热稳定性较好，保温5h相对酶活力均保持在85%以上，55℃保温1h后相对酶活力不足30%，65℃时保温1h后，相对酶活力基本为0。

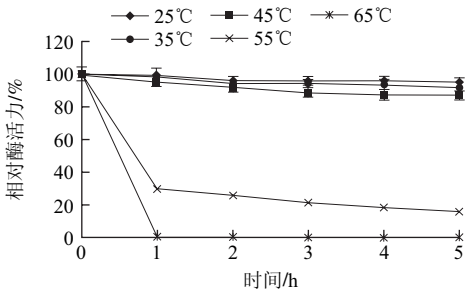


图 6 蒜苗CAT的热稳定性

Fig.6 Temperature stability of catalase activity

2.3.2 最适作用pH值和pH值稳定性

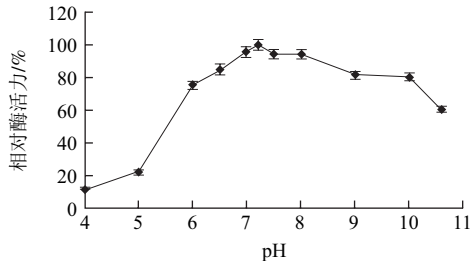


图 7 pH值对蒜苗CAT活性的影响

Fig.7 Effect of pH on catalase activity

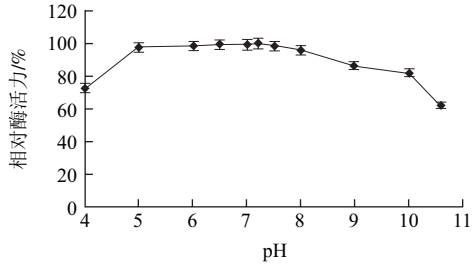


图 8 蒜苗CAT的pH值稳定性

Fig.8 pH stability of catalase activity

由图7可知，蒜苗过氧化氢酶的最适pH值为7.2，在pH6.0～10.0范围内该酶的相对酶活力均保持在75%以上。由图8可知，25℃保温60min后，在pH5.0～10.0范围内该酶的相对酶活力均保持在80%以上，超出此范围变化趋势减缓，说明该酶能耐受较大范围的pH值，对酸碱耐受性较好。

2.3.3 米氏常数(K_m)的测定

由图9可知，在最适条件下，以过氧化氢(5～45mmol/L、浓度间隔10mmol/L)为底物，测定该酶的相对酶活力，采用双倒数法求得该酶的K_m值为38.2mmol/L。

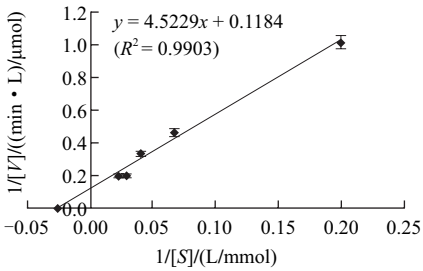


图 9 双倒数法测定蒜苗CAT的米氏常数

Fig.9 Lineweaver-Burk plot for K_m determination of catalase

2.3.4 部分有机溶剂对蒜苗CAT活性的影响

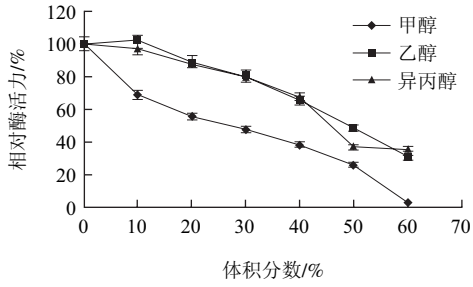


图 10 甲醇、乙醇、异丙醇对蒜苗CAT酶活力的影响

Fig.10 Effect of methanol, ethanol and isopropyl alcohol on catalase activity

由图10可知，甲醇、乙醇、异丙醇均对该酶有一定的抑制作用，随着三者体积分数逐渐增大，酶活性不断被抑制，且甲醇对该酶抑制作用较强，当体积分数达到60%时，该酶活性基本完全丧失；乙醇和异丙醇对该酶抑制相对较弱。

2.3.5 不同化合物对蒜苗CAT活性的影响

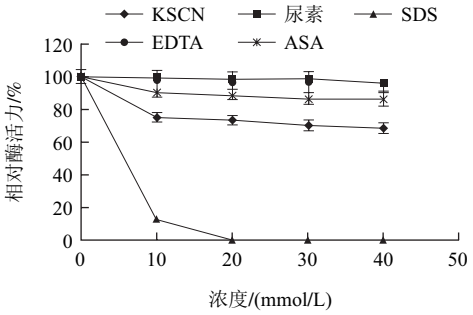


图 11 不同化合物对蒜苗CAT酶活力的影响

Fig.11 Effect of various compounds on catalase activity

由图11可知，在0～40mmol/L范围内，随着尿素、KSCN、EDTA、ASA浓度的增加，尿素、EDTA、ASA对该酶活性影响不大，浓度达到40mmol/L时，相对酶活力均在95%以上；KSCN对该酶有一定的抑制作用；SDS对该酶抑制作用比较明显，当其浓度达到20mmol/L时，该酶的活性基本完全丧失。

2.3.6 不同金属离子对蒜苗CAT活性的影响

由图12可知，在不同浓度范围内，不同金属离子

及同一金属离子不同浓度对该酶活性的影响存在一定差异；Ca^{2+}、Mg^{2+}、Ba^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}、Cd^{2+}、Zn^{2+}对该酶有一定抑制作用；Ag^{+}、Cu^{2+}对该酶有非常显著的抑制作用，当两者的浓度达到1mmol/L时，该酶的活性完全丧失；Li^{+}、Pb^{2+}对该酶有较强的激活作用；K^{+}对该酶的作用具有两重性：低浓度时有一定的激活作用。

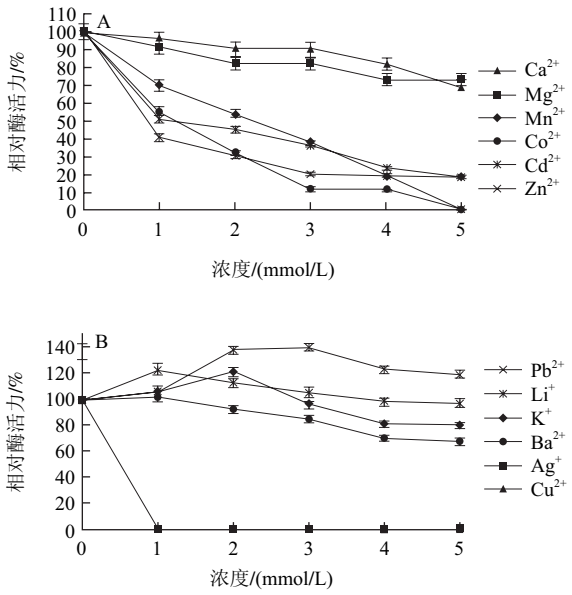


图 12 不同金属离子对蒜苗CAT酶活力的影响

Fig.12 Effect of metal ions on catalase activity

3 讨 论

本研究与其他材料分离纯化过氧化氢酶相比，具有如下特点：1)四季可以取材，价格比较低廉。2)经过DEAE-Sepharose 离子交换层析后直接上Superdex-200凝胶过滤层析柱，减少了透析和冷冻干燥所带来的酶活力损失，简化了纯化流程，节省了时间，同时得到电泳纯的蒜苗过氧化氢酶；与韭菜[15]和发芽的黑绿豆[16]过氧化氢酶相比较，提高了该酶的比活力、酶活回收率和纯化倍数(韭菜和发芽的黑绿豆过氧化氢酶的比活力为22064.57、5649U/mg，酶活回收率为18.33%、10.1%，纯化倍数为70.36、23.3。本实验蒜苗过氧化氢酶的比活力为25975.36U/mg、酶活回收率为40.05%、纯化倍数为125.97)；纯化倍数低于芦荟[11]过氧化氢酶(纯化倍数为228.05)。

该酶亚基分子质量为59.16kD，与韭菜(62.43kD)[15]、芦荟(60.6kD)[11]、猎犬狗肝脏(63kD)[17]等来源的CAT的亚基分子质量接近，而不同于鹰嘴豆[18]CAT的同工酶的亚基分子质量(97.4、66kD)，说明CAT的分子结构具有物种特异性。

该酶的最适温度为45℃，与芦荟(45℃)[11]CAT的最适温度一致，高于韭菜(37℃)[15]、鸭肝(40℃)[19]、褶皱冠蚌(25℃)[20]CAT的最适温度，且热稳定性较好，在25～45℃范围内5h后酶活力均保持在85%以上；该酶的最适pH值为7.2，与韭菜(pH7.2)[15]一致，与芦荟(pH7.5)[11]、鸭肝(pH7.0)[19]、褶皱冠蚌(pH7.0)[20]，发芽的黑绿豆(pH7.0)[16]重组大肠杆菌(pH7.0) [21]接近，说明不同材料中CAT对pH值环境具有相似的适应性；25℃保温60min后，在pH5.0～10.0范围内该酶的活力均保持在80%以上，且pH4.0时为78%，pH10.6为62%远高于其他生物[16-17,22-23]说明该酶对酸碱耐受范围较好；K_m为38.2mmol/L与鸭肝(37.29mmol/L)[19]，芦荟(34mmol/L)[11]接近，远低于氧化葡糖杆菌(61mmol/L)[23]、嗜热子囊菌(48mmol/L)[24]、韭菜(46.93mmol/L)[15]，而远高于发芽的黑绿豆(16.2mmol/L)[16]，说明不同材料中CAT的K_m值不同，对底物过氧化氢的亲和力存在一定的差异。

研究结果表明，甲醇、乙醇、异丙醇对该酶有一定抑制作用，且甲醇抑制作用较显著；随着三者体积分数的逐渐增大，酶活性不断被抑制而下降，主要是因为不同浓度有机溶剂的加入破坏了该酶表面的水化层，使溶液的极性不断降低，维持酶构象的次级键遭到破坏，空间构象的改变，导致该酶活性不断下降甚至完全丧失。尿素、EDTA、ASA对该酶活性影响不大，其中EDTA在分离纯化过程中对保护酶的活性起到十分重要的作用；特别是在透析和层析过程中须加1mmol/L的EDTA，否则经过透析和层析柱后酶活力将基本损失；KSCN对该酶有一定的抑制作用；SDS对该酶抑制作用比较明显，与来源于韭菜[15]的一致，因SDS是一种变性剂，破坏该酶的疏水键和氢键，进而改变该酶的空间构象，导致该酶活性丧失；Ca^{2+}、Mg^{2+}、Ba^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}、Cd^{2+}、Zn^{2+}对该酶有一定的抑制作用，Ag^{+}、Cu^{2+}对该酶有非常显著的抑制作用，其中Cu^{2+}与其他材料的CAT的结果相似[11,15,19]；Li^{+}、Pb^{2+}对该酶有一定的激活作用，其中Pb^{2+}的性质与韭菜[15]的一致；K^{+}对该酶的作用具有两重性：低浓度时有一定的激活作用，可能是由于一价的K^{+}影响到该酶本身的带电量，低浓度时可以促进底物与该酶的活性部位结合，形成底物-酶-离子复合物，激活该酶的活性，随着K^{+}浓度的不断增大，K^{+}的聚集改变该酶的带电状况，影响该酶的空间结构，导致酶活性下降。

参考文献：

[1] NORDBERG J, ARNÉR E S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2001, 31(11): 1287-312.

[2] HODGES M, ANDREWS C J, JOHNSON D A, et al. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines[J]. Physiologia Plantarum, 1996, 98(4): 685-692.

[3] MAURIZIO P, MASSIMILIANO F, PAOLA P, et al. Effect of stirrer speed and buffering agents on the production of glucose oxidase and catalase by *Penicillium variabile*(P16) in benchtop bioreactor[J].

Enzyme and Microbial Technology, 1995, 17: 336-339.

[4] CHU H D, LEEDER J G, GILBERT S G. Immobilized catalase reactor for use in peroxide sterilization of dairy products[J]. Journal of Food Science, 2006, 40(3): 641-643.

[5] ALACAM A, TULUNOGLU O, OYGÜR T, et al. Effects of topical catalase application on dental pulp tissue: a histopathological evaluation[J]. Journal of Dentistry, 2000, 28(5): 333-339.

[6] AMORIM A M, GASQUES M D G, JÜRGEN A M, et al. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics[J]. Anais da Academia Brasileira Ciencias, 2002, 74(3): 433-436.

[7] 冷晒祥, 钱国坻, 华兆哲, 等. 过氧化氢酶的棉针织物漂染工艺研究[J]. 印染, 2006, 32(19): 1-3

[8] 范景阳. 美科学家分离出超稳定过氧化氢酶[J]. 造纸信息, 2005(2): 20-21.

[9] COSTA S, TZANOV, PAAR A, et al. Irnrnobilization of catalase from *Bacillus* SF on alurnina for the treatment of textile bleaching effluents[J]. Enzyme Microbial Technol, 2001, 28(9/10): 815-819.

[10] 杨晓建, 刘世琦, 张自坤, 等. 不同发光二极管对青蒜苗营养品质的影响[J]. 营养学报, 2010, 32(5): 518-520.

[11] 朱鸿, 李想韵, 邓玉, 等. 芦荟过氧化氢酶的分离纯化和性质研究[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 206-210.

[12] 李建武, 余瑞元. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.

[14] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 378-380.

[15] 邓玉, 敬海明, 成丽丽, 等. 韭菜过氧化氢酶的分离纯化及其部分酶学特性[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 217-221.

[16] KANDUKURI S S, NOOR A, RANJINI S S, et al. Purification and characterization of catalase from sprouted black gram(*Vigra mungo*) seeds[J]. Journal of Chromatography B: Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.01.029.

[17] NAKAMURA K, WATANABE M, SASAKI Y, et al. Purification and characterization of liver catalase in acatalasemic beagle dog: comparison with normal dog liver catalase[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2000, 32(1): 89-98.

[18] GAYATRIDEVI S, JAYALAKSHMi S K, SREERAMULU K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 52: 154-161.

[19] 邱慧, 郭小路, 易燚波, 等. 鸭肝过氧化氢酶的分离纯化及部分性质研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(4): 163-167.

[20] YANG X, LI G, WEN C, et al. A catalase from the freshwater mussel *Cristaria plicata* with cloning, identification and protein characterization[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31: 389-399.

[21] 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[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 348-353.

[22] ZÁMOCKÝ M, GODOČÍKOVÁ J, GASPERÍK J, et al. Expression, purification, and sequence analysis of catalase-1from the soil bacterium *Comamonas terrigena* N3H[J]. Protein Expression and Purifcation, 2004, 36(1): 115-123.

[23] YAMAGUCHI H, SUGIYAMA K, HOSOYA M, et al. Gene cloning and biochemical characterization of a catalase from *Gluconobacter oxydans*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineer, 2011, 111(5): 522-527.

[24] WANG Hongxia, TOKUSIGE Y, SHINOYAMA H, et al. Purification and characterization of a thermostable catalase catalase from culture broth of *Thermoascus aurantiacus*[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 85(2): 169-173.