

微生物过氧化氢酶的发酵生产及其在纺织工业的应用

张东旭¹, 堵国成^{1,2}, 陈坚²

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

2 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

摘要: 微生物过氧化氢酶是一种重要的工业酶制剂, 可以催化分解过氧化氢生成水和氧气。这一酶制剂在食品、纺织、医药等领域表现出广泛的应用潜力。生物工程和基因工程技术的进步推动了微生物过氧化氢酶的发酵生产。以下综述了微生物过氧化氢酶发酵生产的进展及其在纺织工业中的应用, 同时讨论了微生物过氧化氢酶的发酵生产和纺织工业应用的未来趋势。

关键词: 微生物过氧化氢酶, 发酵, 纺织, 应用

Fermentation production of microbial catalase and its application in textile industry

Dongxu Zhang¹, Guocheng Du^{1,2}, and Jian Chen²

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Microbial catalase is an important industrial enzyme that catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen. This enzyme has great potential of application in food, textile and pharmaceutical industries. The production of microbial catalase has been significantly improved thanks to advances in bioprocess engineering and genetic engineering. In this paper, we review the progresses in fermentation production of microbial catalase and its application in textile industry. Among these progresses, we will highlight strain isolation, substrate and environment optimization, enzyme induction, construction of engineering strains and application process optimization. Meanwhile, we also address future research trends for microbial catalase production and its application in textile industry. Molecular modification (site-directed mutagenesis and directed evolution) will endue catalase with high pH and temperature stabilities. Improvement of catalase production, based on the understanding of induction mechanism and the process control of recombinant stain fermentation, will further accelerate the application of catalase in textile industry.

Keywords: microbial catalase, fermentation, textile, application

Received: March 22, 2010; **Accepted:** May 6, 2010

Supported by: Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-07-0378), Key Technologies Research and Development Program of Jiangsu Province, China (No. SBE200900022), National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 20625619), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB714306).

Corresponding author: Jian Chen. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-07-0378), 江苏省科技支撑计划 (No. SBE200900022), 国家杰出青年基金 (No. 20625619), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB714306) 资助。

1 过氧化氢酶简介

过氧化氢酶 (Hydrogen peroxide oxidoreductase, catalase EC 1.11.1.6.) 是一类以过氧化氢为专一底物, 通过催化一对电子的转移而最终将其降解为水和氧气的酶。研究表明几乎所有的需氧微生物中都存在过氧化氢酶, 只有少数好氧菌如过氧化醋杆菌 *Acetobacter peroxydas* 不存在过氧化氢酶^[1-4]。除谢氏丙酸杆菌 *Propionibacterium shermanji* 和巨大脱硫弧菌 *Desulfovibrio gigas* 等微生物外, 绝大多数厌氧微生物体内不存在过氧化氢酶^[5]。根据过氧化氢酶在结构和序列水平上的异同将其划分为 3 个亚群, 即单功能过氧化氢酶 (Monofunctional catalase or Typical catalase)、双功能过氧化氢酶 (Catalase-peroxidase) 和假过氧化氢酶 (Pseudocatalase or Mn-catalase)。大多数的过氧化氢酶由 4 个相同的亚单位组成, 分子量在 240 kDa 左右, 在亚基的活性部位各含一个血红素基团^[6]。来自哺乳动物以及某些真菌和细菌的过氧化氢酶还含有 4 个紧密结合的 NADPH 分子。过氧化氢酶可被氧化合物、苯酚类、叠氮化物、过氧化氢、尿素及碱等物质所阻抑。过氧化氢酶主要集中在存在于细胞的过氧化物酶体中, 另外线粒体和细胞质中也含有少量的过氧化氢酶。过氧化氢酶能及时分解细胞内产生 (主要为 SOD 歧化产物) 或由胞外进入细胞的过氧化氢。避免了过氧化氢通过 Fenton 和 Harber-weiss 反应产生·OH。同时过氧化氢酶还能对血红蛋白及其他含巯基蛋白质起到保护作用, 使它们不被氧化^[7]。

人们研究过氧化氢酶的历史可追溯到 100 多年前, 早在 1811 年就已发现动植物组织可以分解过氧化氢产生氧气, 到 1892 年 Jacobson 证明了在动植物组织内有专一分解过氧化氢的酶, 即过氧化氢酶的存在。1901 年 Loew 第一次报道了过氧化氢酶的生物化学特性^[8]。到 1937 年, Sumner 和 Dounce 首次从牛的肝脏中分离得到过氧化氢酶的结晶, 这是最早分离得到的高纯度酶之一^[9]。随后相继报道了哺乳动物的肝脏、红细胞及大多数微生物体内均含有此酶, 其中哺乳动物组织中过氧化氢酶的含量差异很大, 肝脏中含量最高, 结缔组织中含量最低, 在

上述组织细胞内过氧化氢酶主要与细胞器如线粒体和过氧化物酶体结合的形式存在, 而在红细胞中则以可溶的状态存在^[10]。

过氧化氢酶来源丰富, 存在于几乎所有好氧生物中和一部分厌氧生物中。动物过氧化氢酶存在于动物的主要组织中, 尤以肝与红细胞为最多, 脑、心脏与骨骼肌为最少, 动物肝脏是过氧化氢酶的一个很大来源, 国内外均已实现这一工艺的工业化生产。另外, 巴西研究者开发了从人胎盘中提取医用过氧化氢酶的技术。植物方面, 主要集中在过氧化氢酶保护植物抗氧化机理方面的研究^[10]。不同来源的过氧化氢酶在细胞中的位置有所不同。动物红细胞、肝脏以及细菌的过氧化氢酶存在于细胞质中, 必须将细胞破碎才能提取到过氧化氢酶, 因此酶的分离、提纯较为复杂。细菌过氧化氢酶的热、碱稳定性虽然可随来源不同而不同, 但因为是胞内酶, 实现高产和提取均不方便。酵母的过氧化氢酶主要积累于胞内, 而一些丝状真菌的过氧化氢酶则主要分泌于胞外, 胞内也含有一定量的过氧化氢酶^[11-12]。因此选用嗜热丝状真菌来生产过氧化氢酶在应用和产品提取方面具有较大优势。此外也有研究通过构建基因工程菌来生产过氧化氢酶^[13]。目前商业化的过氧化氢酶以动植物提取和微生物发酵生产为主, 本文将重点讨论微生物来源的过氧化氢酶的生产。

自 20 世纪 80 年代以来, 织物和纸张的生产者以及其他工业就已经开始使用过氧化氢代替有毒的氯气来漂白和消毒产品。过氧化氢可用于消除新鲜水果和蔬菜上有害的细菌, 如沙门氏菌和大肠杆菌, 还可用于消毒奶制品, 为食品的纸包装如果汁盒消毒也不必冷藏储存等。在去除生产过程中剩余的过氧化氢的过程中, 人们将注意力转向了具有非常高的催化效率的过氧化氢酶, 因此过氧化氢酶在食品、医药、临床等行业都有着广泛的用途。目前过氧化氢酶主要的应用领域包括: 1) 临床。在临床分析中, 过氧化氢酶对研究自由基代谢失衡、抗衰老和肿瘤发病机理具有一定价值, 对某些疾病的诊断、鉴别诊断亦具有重要意义^[12,14]。过氧化氢酶可消除过氧化氢, 对超氧化物歧化酶起保护作用, 因而具有抗衰老作用^[15]。2) 医药。由于过氧化氢具杀菌、清洁、

漂白及消毒的功效, 常用于器械消毒。如在隐形眼镜消毒过程中添加过氧化氢酶可分解消毒液中残留的过氧化氢。国内、外均有研究的专利发表^[16-18]。

3) 食品加工。过氧化氢酶可使食品保鲜, 并作为消除啤酒、饮料中分子氧、活性氧和自由基的抗氧化剂。此外过氧化氢酶可与葡萄糖氧化酶并用作为氧的去除剂, 还可用于牛乳杀菌及干酪原料乳的杀菌^[19]。4) 其他工业。与过氧化氢同时使用, 用于橡胶成型、塑料及多泡性粘合剂。纸浆、纤维、毛漂白工艺中除残留的过氧化氢。加入化妆品中可防止皮肤衰老, 还可处理半导体废水。近年来随着过氧化氢在纺织、造纸、制浆等行业的普遍应用, 市场对过氧化氢酶的需求也呈大幅增长趋势。本文将重点讨论过氧化氢酶在纺织工业中的应用。

2 微生物过氧化氢酶的发酵生产和性质

微生物过氧化氢酶是目前研究的热点。除生理机理研究外, 工业开发方面也进行了更深入的研究, 国外继黑曲霉和微溶壁球菌产过氧化氢酶分别实现工业化生产之后, 又开发了产酶性能更佳的嗜热子囊菌、芽胞杆菌、重组大肠杆菌等微生物菌种。国内用微生物生产过氧化氢酶仍停留在研究开发阶段。现在市售商品过氧化氢酶基本为牛肝过氧化氢酶和微生物产过氧化氢酶共存, 微生物产过

氧化氢酶基本由诺维信、有田酵素、杰能科等大公司控制。

2.1 微生物过氧化氢酶的野生菌株生产

微生物过氧化氢酶发酵研究最早可追溯到 1951 年, Brizueta 等首次报道了用杆菌 *Bacillus* 发酵生产过氧化氢酶^[20]。后来, 研究者不断筛选出新的过氧化氢酶生产菌株, 同时发展出各种优化发酵过程的方法。表 1 列举了近年来在微生物过氧化氢酶方面取得的进展。由于过氧化氢酶在微生物中普遍存在, 生物多样性赋予了微生物多种可能的过氧化氢酶合成、分泌和调控机制, 因此通过菌种筛选提高发酵水平是一种十分有效手段。到目前为止, 至少筛选出 8 种产过氧化氢酶的微生物, 如变幻青霉 *Penicillium variable*、黑曲霉 *Aspergillus niger*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、葡萄球菌 *Staphylococcus*、溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus*、嗜热囊菌 *Thermoascus aurantiacus*、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、放射型根瘤菌 *Rhizobium radiobacter* 等 (表 1)。目前最高的过氧化氢酶发酵水平是在枯草杆菌中获得的, 最高产量达到 18 000 U/mL, 生产强度可以达到 1 000 U/(mL·h)^[21]。

除菌种筛选外, 培养条件优化 (pH、温度、溶氧等) 和培养基优化等手段也运用到微生物过氧化氢酶的发酵中, 过氧化氢酶的发酵水平不断提高

表 1 提高微生物过氧化氢酶产量的不同方法比较

Table 1 Comparison of different methods to improve the production of microbial catalase

Year	Strains	Yield (U/mL)	Productivity (U/(mL·h))	Method	References
2008	<i>Rhizobium radiobacter</i>	18 000	1 000	Strain screen	[21]
2008	<i>Bacillus subtilis</i>	11 000	366.7	Culture medium optimization	[22]
2007	<i>Bacillus subtilis</i>	3 258	651	Strain screen, culture medium and condition optimization	[23]
2007	<i>Bacillus subtilis</i>	29.9	1.5	Culture medium and condition optimization	[24]
2006	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	4 505	39.2	Fermentation conditions optimization	[25]
2004	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	1 100	91.7	Culture medium optimization	[26]
2001	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	292	146	Fermentation conditions optimization	[27]
1999	<i>Staphylococcus</i>	^a n/a	n/a	Effect of nitrate and incubation conditions	[28]
1999	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16	0.2	Culture medium optimization	[10]
1998	<i>Aspergillus niger</i>	78	n/a	Biochemical mutants and fermentation conditions optimization	[29]
1994	<i>Penicillium variable</i>	n/a	0.1	Culture medium optimization	[30]
1951	<i>Bacillus</i>	n/a	n/a	Culture medium and conditions optimization	[20]

^an/a = not applicable.

(表 1)。例如, 赵志军等通过培养基优化, 使过氧化氢酶产量从 30 U/mL 提高到 3 258 U/mL^[23]。邓宇等通过氮源优化, 使酶活从 3 000 U/mL 提高到 11 000 U/mL^[22]。经过 50 多年的努力, 研究者将过氧化氢酶的发酵水平从 78 U/mL 提高到 18 000 U/(mL·h), 生产强度从 0.1 U/(mL·h) 提高到 1 000 U/(mL·h)。但随着菌种筛选工作的不断开展, 从自然界直接筛选获得产酶水平大幅提升的微生物的几率越来越小, 这就要求研究者通过基因工程手段定向的构建能够高产过氧化氢酶的微生物。

2.2 基因工程菌构建

为了进一步提高微生物过氧化氢酶的产量, 研究者尝试构建基因工程菌来高效生产过氧化氢酶。

表 2 采用基因工程菌发酵生产过氧化氢酶情况

Table 2 Milestones in microbial catalase production by genetically modified strains

Year	Catalase gene resource	Hosts	Yield (U/mL)	Productivity (U/(mL·h))	References
2009	<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Escherichia coli</i>	n/a	n/a	[32]
2008	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	3 500	117	[33]
2008	<i>Psychrobacter</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>	11 000	458	[34]
2007	Human	<i>Pichia pastoris</i>	1 380	23	[35]
2006	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Escherichia coli</i>	131	14.5	[13]
1997	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Escherichia coli</i>	20.6	n/a	[36]
1996	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>	11 200	156	[37]
1990	Rat liver cells	<i>Escherichia coli</i>	n/a	n/a	[31]

n/a = not applicable.

目前获得最高发酵水平的基因工程菌是以大肠杆菌为宿主, 最高产量 11 000 U/mL, 生产强度为 458 U/(mL·h), 发酵水平与使用野生菌生产过氧化氢酶相比仍有一定的差距^[34]。目前基因工程过氧化氢酶的研究主要集中在工程菌的构建, 缺乏发酵过程控制和优化的研究, 如前期生长阶段的高密度培养和后期产酶阶段的持续稳定诱导策略的研究。过程控制和优化方面的研究, 将进一步推动基因工程过氧化氢酶生产水平的提高。此外, 微生物过氧化氢酶是一种诱导酶, 通过对高产过氧化氢酶微生物中酶的诱导、合成、分泌机制的研究, 将有助于提高过氧化氢酶基因工程菌的构建水平。

2.3 过氧化氢酶与胁迫物的关系及诱导产酶

过氧化氢酶可由过氧化氢等诱导物诱导表达^[1,38-40]。表 3 列出了几种典型微生物在过氧化氢和

Furuta 等在 1990 年首次报道了以大肠杆菌为宿主构建产过氧化氢酶的基因工程菌, 基因来源是小鼠肝脏细胞, 但获得的产量不高^[31]。接下来科学家尝试了各种来源的过氧化氢酶基因和表达宿主 (表 2)。到目前为止, 毕赤酵母 *Pichia pastoris*、结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis*、多形汉逊酵母 *Hansenula polymorpha*、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 等已作为生产基因工程过氧化氢酶的宿主, 过氧化氢酶基因的来源也拓展到稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea*、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、嗜冷杆菌 *Psychrobacter*、人体细胞、嗜热脂肪芽胞杆菌 *Bacillus stearothermophilus*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 等来源 (表 2)。

表 3 过氧化氢和 O₂⁻胁迫下不同微生物的抗氧化酶合成情况

Table 3 Synthesis of antioxidative enzymes in different microbe under H₂O₂ and O₂⁻ stress

Strains	Transcript factor	Antioxidative enzymes	References
<i>Escherichia coli</i>	H ₂ O ₂ : OxyR O ₂ ⁻ : SoxRS	CAT (HPI), GR, AhpR SOD, CAT, G6PD, GR	[41]
<i>Salmonella typhimurium</i>	H ₂ O ₂ : OxyR	CAT, SOD, NADPH-AhpR	[42]
<i>Bacillus subtilis</i>	H ₂ O ₂ : OxyR	CAT, AhpC, AhpF DNA repair enzyme	[43]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	H ₂ O ₂ , O ₂ ⁻ : b-ZIP, Ace1	CAT, SOD, GSH, TPX GPX	[44-45]

CAT: Catalase; GR: Glutathione reductase; Ahp: Alkyl hydroperoxide reductase; SOD: Super oxide dismutase; G6PD: Glucose-6-phosphate dehydrogenase; GSH: Glutathione; TPX: Thioredoxin peroxidase.

O₂⁻胁迫下抗氧化酶的表达情况。可以看出, 过氧化氢酶是各种微生物细胞 (特别是对于 *Bacillus* 属的微生物) 抵抗活性氧胁迫最主要的抗氧化酶。

由于活性氧消耗了胞内的还原力,因此在活性氧胁迫下六磷酸葡萄糖脱氢酶 (Glucose-6-phosphate-dehydrogenase, G6PD) 的活性也得到了提高, G6PD 的作用是提供维持细胞内氧化还原环境平衡的还原力 NADPH。在微生物氧化应激研究中,还发现一些新表达的蛋白,其生理作用目前还不是很清楚,但从已经确定的来看,大多是一些控制抗氧化酶转录和表达的调控因子^[21,42]。

过氧化氢酶作为微生物体内专一清除过氧化氢的抗氧化酶,其合成受到底物(过氧化氢)的直接诱导。已有的研究表明,过氧化氢对过氧化氢酶诱导作用主要取决于其浓度,一般来说,低浓度过氧化氢诱导过氧化氢酶合成,过氧化氢酶立即分解过氧化氢,以消除过氧化氢对细胞的继续毒害,同时提高了细胞对过氧化氢胁迫的抵抗能力^[46]。但当过氧化氢浓度超过过氧化氢酶的分解能力或过氧化氢酶来不及分解过氧化氢时,过氧化氢及其产物 OH· 会不加选择地攻击细胞成分,引起细胞代谢紊乱,抑制细胞生长,导致过氧化氢酶合成水平降低。更为重要的是 OH· 本身会直接攻击过氧化氢酶活性中心导致过氧化氢酶失活,破坏细胞的防御系统,加剧氧自由基对细胞的氧化损伤^[47]。另外,过氧化氢对过氧化氢酶合成的诱导作用还取决于胁迫方式,Janero 等发现连续添加非致死浓度的过氧化氢能够刺激肌原细胞 (Cardiacmyocytes) 过氧化氢酶的合成,而一次性添加较高浓度 (25 $\mu\text{mol/L}$) 的过氧化氢却不能诱导过氧化氢酶合成^[48]。

由于 O_2^- 诱导超氧化物歧化酶合成的同时会产生过氧化氢,因此在 O_2^- 胁迫下过氧化氢酶也会有不

同程度的提高^[4,40]。另有研究表明,一些环境因素如温度、盐胁迫也能够诱发胞内 O_2^- 的产生从而提高过氧化氢酶合成水平。Bai 等发现在黑曲霉 *Aspergillus niger* 生长的对数期或稳定期提高培养温度 (25 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$),胞内活性氧浓度增加了 1.3 倍和 2.8 倍,从而诱导了过氧化氢酶合成^[49]。过氧化氢胁迫对过氧化氢酶合成的影响除了与微生物种类、过氧化氢浓度和胁迫方式有关外,还与细胞生理状态(不同生长时期)、营养环境条件等因素相关^[50]。表 4 列举了通过诱导或胁迫促进野生菌发酵生产过氧化氢酶的方法。例如,姚丹丹等使用枯草芽胞杆菌作为生产菌株,通过过氧化氢和乙醇诱导,使过氧化氢酶产量从 11 000 U/mL 提高到 23 000 U/mL,生产强度从 360 U/(mL·h) 提高到 640 U/(mL·h)^[51]。可见,通过添加活性氧、过氧化氢、甲醇等物质进行诱导或胁迫产酶,对过氧化氢酶野生菌而言是一种十分有效的提高微生物产量的方法。此外,过氧化氢酶的胁迫机制也提醒我们,基因工程菌中过量表达的过氧化氢酶可能会影响到宿主菌自身对环境氧胁迫的响应。例如过量合成的过氧化氢酶会降低宿主细胞的氧胁迫水平,这时如果通过发酵控制提高环境的溶氧水平,将在不伤害细胞的前提下促进生长和代谢速率。

2.4 不同微生物来源的过氧化氢酶的性质比较

不同来源的过氧化氢酶的热、碱稳定性往往不同。在纺织热漂去除过氧化氢时,温度和 pH 均较高 (60 $^{\circ}\text{C}$ 左右, pH 约为 11), 要求使用的过氧化氢酶必须有较高的耐热和耐碱特性^[55]。表 5 比较了不同来源的过氧化氢酶的 pH 和温度稳定范围,其中碱性

表 4 诱导和胁迫提高微生物过氧化氢酶产量

Table 4 Improvement of Catalase production by Induction and stress

Year	Strains	Yield (U/mL)	Productivity (U/(mL·h))	Method	References
2009	<i>Bacillus subtilis</i>	23 000	640	Oxidative stress	[51]
2005	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	1 725	29.2	Addition of menadione	[52]
2000	<i>Aspergillus niger</i>	65.4	0.9	O_2 and H_2O_2 induction	[11]
1999	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16	0.2	H_2O_2 induction	[10]
2005	<i>Bacillus subtilis</i>	18.5	1.0	Hydroxyl radical induction (photocatalytic reactor)	[53]
1974	<i>Candida boidinii</i>	^a n/a	n/a	Methanol induction	[54]

^an/a = not applicable.

芽孢杆菌 *Alkaliphilic Bacillus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、放射型根瘤菌 *Rhizobium radiobacter* 和嗜热子囊菌 *Thermoascus aurantiacus* 来源的过氧化氢酶, pH 稳定范围在碱性范围 (pH > 8.0), 枯草芽孢杆菌、放射型根瘤菌、嗜热子囊菌来源的过氧化氢酶温度稳定范围较高 (> 50°C), 较适合在纺织工业中应用^[23,56-58]。

目前市场上商品化过氧化氢酶中, 动物肝脏提取的过氧化氢酶的 pH 应用范围一般在 6.0~8.0, 温度应用范围在 30°C~50°C; 微生物发酵的过氧化氢酶的 pH 应用范围在 6.0~9.0, 温度应用范围在 30°C~65°C。市场上过氧化氢酶的 pH 和温度稳定范围仍有进一步提升的需要。一方面, 可通过菌种筛选, 进一步获得耐高温、高碱的过氧化氢酶; 另一方面, 可通过分子生物学手段对过氧化氢酶分子进行改造, 如通过定点突变、定向进化等方法, 提高过氧化氢酶的温度稳定性和高 pH 耐受性。

表 5 不同来源过氧化氢酶的性质比较

Table 5 Characteristics of catalases from different resources

Resources	Stable and active range of pH	Stable and active range of temperature (°C)	References
<i>Alkaliphilic Bacillus</i>	8.0-12.0	15-50	[56]
<i>Bacillus subtilis</i>	6.0-11.0	37-55	[23]
<i>Rhizobium radiobacter</i>	6.0-11.0	30-55	[21]
Recombinant <i>Magnaporthe grisea</i>	6.0-8.0	<45	[32]
Recombinant <i>Bacillus subtilis</i>	5.0-8.0	<40	[33]
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	6.0-11.0	15-75	[57]
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	5.0-13.0	30-80	[58]

3 过氧化氢酶在纺织工业的应用

纺织工业是我国的传统产业和支柱产业, 也是污染非常严重的工业, 尤其是在印染加工过程中, 传统工艺耗费大量的水和化学品, 不仅耗费资源, 同时还造成环境污染, 破坏生态平衡。这对实施可持续发展战略是极为不利的。因此随着世界范围内, 水的消耗和废水处理变得越来越昂贵, 大多数染色和整理工厂正非常密切地关注着减少水的消耗和废

水排放的节约潜力。要从根本上改变纺织工业高消耗、高污染的传统粗放型经济增长方式, 必须大力推动和发展纺织工业清洁生产技术, 实现纺织工业污染防治由“末端治理”向“源头预防”的转变。

纺织品染整加工中, 经过过氧化氢漂白后进入染色步骤, 染浴中若存在过氧化氢, 会造成对氧化敏感的活性染料褪色, 即使染料分子较小的改变都会导致色泽的消失。由于严格的质量要求, 染色织物上有微小的色泽改变, 在商业上都不能接受。因此漂白过程一旦结束, 为保证后道染色的安全性, 必须将氧漂后残留的过氧化氢去除干净, 以避免在其后的染色过程发生问题。传统工艺采用水洗或化学还原剂去除过氧化氢, 需多次升温、洗涤, 并可能带入有毒和难降解的物质。使用过氧化氢酶去除过氧化氢反应速率非常快: 在最适条件下, 每摩尔过氧化氢酶在 1 min 内可分解 5×10^6 摩尔过氧化氢。在染整工艺中使用过氧化氢酶替代多次清洗及化学还原剂去除漂白液中残留的过氧化氢, 具有很大的经济优势和环保优势^[10-11,59]。

冷晒祥等使用过氧化氢酶的酶解工艺代替传统工艺, 可以使去除过氧化氢的时间缩短 1/3, 用水量减少 2/3^[60]。Paar 等研究了过氧化氢替代传统工艺的应用条件, 发现使用固定化过氧化氢酶可以显著提高织物漂白处理后的染色性能^[61]。张瑞萍等用过氧化氢酶代替传统的高温除过氧化氢工艺, 保证了后道染色的色光和染色重现性, 并且节约能源, 提高生产效率^[62]。何照兴等采用过氧化氢酶生物除 H_2O_2 , 达到了节省水、电、汽用量, 降低成本, 提高生产效率, 并减少对环境的污染效果^[63]。这些研究表明过氧化氢酶处理替代传统化学除 H_2O_2 , 工艺简便易行、处理效果显著, 非常适合在纺织工业推广。

尽管过氧化氢酶具有高效、环保、处理效果显著等优点, 但是其高昂的价格、在工业应用中容易失活以及 pH、温度适应范围较窄等问题也阻碍着其在纺织工业的大规模应用。长期来看, 随着人们环保意识的加强和排污成本的提高, 将会促进过氧化氢酶在纺织业的应用规模。短期来看, 一方面可通过提高发酵水平降低成本, 另一方面可通过分子改造提高过氧化氢酶耐受高温和强碱的能力和稳定

性, 减少酶的用量来降低成本。此外, 研究和开发新的、更加高效和低消耗的过氧化氢酶应用工艺, 也将促进过氧化氢酶在纺织工业大规模推广应用。

4 结论与展望

综上所述, 过氧化氢酶作为一种新型酶制剂, 在棉织物的前处理工艺中起着重要的作用, 纺织漂步骤使用过氧化氢酶是实现纺织工业节能减排和可持续发展的有效方法。目前商品化过氧化氢酶的价格较高, 温度和 pH 耐受范围较低, 这些都制约着过氧化氢酶在纺织工业的大规模应用。过氧化氢酶发酵生产目前的研究主要集中在菌种筛选、培养基和发酵条件优化、基因工程菌构建等方面, 发酵水平仍需进一步提高。考虑到纺织加工处理的条件需要, 需要开发出更加适应高温和碱性条件的过氧化氢酶用于过氧化氢漂白后的酶处理。因此, 未来的研究重点将围绕以下几个方面进行: 1) 通过菌种筛选, 获取高产和能耐受高 pH、高温度的过氧化氢酶的菌株。通过野生菌发酵过程控制与优化, 提高发酵产量。同时对编码耐高温、高碱过氧化氢酶的基因进行鉴定。2) 从耐高温高碱过氧化氢酶基因出发构建工程菌, 结合现代在线控制与分析技术, 进行过氧化氢酶发酵过程优化与控制研究, 提高产酶水平。3) 通过定点突变、定向进化等分子改造手段, 提高过氧化氢酶的温度、pH 耐受性, 提高其应用性能。

REFERENCES

- [1] Heo YJ, Chung IY, Cho WJ, *et al.* The major catalase gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is under both positive and negative control of the global transactivator OxyR in response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, 2010, **192**(2): 381–390.
- [2] Kim JK, Choi HS, Kim E, *et al.* Comparative effects of TiO₂-immobilized photocatalytic supporters on the bactericidal efficiency of a novel photoreactor. *Biotech Lett*, 2004, **24**: 1397–1400.
- [3] Sahoo R, Bhattacharjee A, Majumdar U, *et al.* A novel role of catalase in detoxification of peroxynitrite in *S. cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **385**(4): 507–511.
- [4] Abbott DA, Suir E, Duong GH, *et al.* Catalase overexpression reduces lactic acid-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(8): 2320–2325.
- [5] Liu G, Zhao J, Hidaka H. ESR spin-trapping detection of radical intermediates in the TiO₂-assisted photo-oxidation of sulforhodamine B under visible irradiation. *J Photochem Photobiol A: Chem*, 2000, **133**(1/2): 83–88.
- [6] Watts RJ, Washington D, Howsawkung J, *et al.* Comparative toxicity of hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and superoxide anion to *Escherichia coli*. *Adv Environ Res*, 2003, **7**(4): 961–968.
- [7] Grzelak A, Rychlik E, Bartosz G. Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media. *Free Radical Biol Med*, 2001, **30**(12): 1418–1425.
- [8] Loew O. Catalase, a new enzyme of general occurrence, with special reference to the tobacco plant. *US Dept Agr Rept*, 1901, **68**: 1–47.
- [9] Sumner JB, Dounce AL. Crystalline catalase. *Science*, 1937, **85**(2206): 366–367.
- [10] Loewen PC, Klotz MG, Hassett DJ. Catalase—an “old” enzyme that continues to surprise us. *ASM News*, 2000, **66**(2): 76–82.
- [11] Venkateshwaran G, Somashekar D, Prakash MH, *et al.* Production and utilization of catalase using *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem*, 1999, **34**(2): 187–191.
- [12] Fiedurek J, Gromada A. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *J Appl Microbiol*, 2000, **89**(1): 85–89.
- [13] Duan XG, Shen W, Li YL, *et al.* Construction of recombinant thermo-stable catalase engineering strain and optimization of its fermentation condition. *J Food Sci Biotech*, 2006, **25**(2): 74–78.
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.
- [14] Feng GJ. *Modern Diagnosis and Treatment*. Beijing: People’s Medical Publishing House, 1994.
冯国基. *现代诊断与治疗*. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [15] Mo J. *Free Radical Biology Medicine Introduction*. Beijing: People’s Medical Publishing House, 1989.
莫简. *医学自由基生物学导论*. 北京: 人民卫生出版社, 1989.
- [16] Berka RM, Fowler T, Rey MW. Production of *Aspergillus niger* catalase-R: US 5360732. 1994-12-01.
- [17] Berka RM, Fowler T, Rey MW. Gene sequence encoding

- Aspergillus niger* catalase-R: US 5360901. 1994-12-01.
- [18] Donna M. Scytalidium catalase gene: US 5646025. 1997-07-08.
- [19] Huang WT, Hu XZ. Handbood of Enzymatic Apply. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1989. 黄文涛, 胡学智. 酶应用手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1989.
- [20] Brizuela W, Paraje R. Microbial catalase; quantitative determination in three species of the *Bacillus* genus; influence of temperature, culture media and incubation time. *Rev Fac Cienc Med Cordoba*, 1951, **9**(4/6): 565-575.
- [21] 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.
- [22] Deng Y, Hua ZZ, Zhao ZJ, *et al.* Effect of nitrogen sources on catalase production by *Bacillus subtilis* WSHDZ-01. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, **14**(4): 544-547. 邓宇, 华兆哲, 赵志军, 等. 氮源对枯草芽孢杆菌 WSHDZ-01 合成过氧化氢酶的影响. 应用与环境生物学报, 2008, **14**(4): 544-547.
- [23] Zhao ZJ, Hua ZZ, Liu DR, *et al.* Screening, identification and fermentation optimization of a alkaline catalase-producing strain. *Microbiol China*, 2007, **34**(4): 667-671. 赵志军, 华兆哲, 刘登如, 等. 碱性过氧化氢酶高产菌的筛选、鉴定及发酵条件优化. 微生物学通报, 2007, **34**(4): 667-671.
- [24] Hua ZZ, Yan GL, Du GC, *et al.* Study and improvement of the conditions for production of a novel alkali stable catalase. *Biotechnol J*, 2007, **2**(3): 326-333.
- [25] Cao XY, Hua ZZ, Yan GL, *et al.* Fermentation optimization and textile pretreatment application of catalase produced by *Thermoascus aurantiacus* WSH 03-01. *Ind Microb*, 2006, **36**(4): 7-12. 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.
- [26] Hong HJ, Xu GR. The optimization of culture medium for catalase produce-*Micrococcus lysodeikticus*. *J Wuxi Univ Light Ind*, 2004, **23**(6): 85-89. 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.
- [27] Lu T, Wang CF, Dai Y, *et al.* Study on the fermentability of *Micococcus lysodeikticus* to produce catalase. *J Suzhou Univ: Natl Sci*, 2001, **17**(3): 95-97. 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.
- [28] Talon R, Walter D, Chartier S, *et al.* Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *Int J Food Microbiol*, 1999, **52**(1/2): 47-56.
- [29] Fiedurek J, Gromada A, Pielecki J. Simultaneous production of catalase, glucose oxidase and gluconic acid by *Aspergillus niger* mutant. *Acta Microbiol Pol*, 1998, **47**(4): 355-364.
- [30] Petruccioli M, Piccioni P, Fenice M, *et al.* Glucose oxidase, catalase and gluconic acid production by immobilized mycelium of *Penicillium variable* P16. *Biotechnol Lett*, 1994, **16**(9): 939-942.
- [31] Furuta S, Hayashi H. Purification and properties of recombinant rat catalase produced in *Escherichia coli*. *J Biochem*, 1990, **107**(5): 708-713.
- [32] Zamocky M, Furtmuller PG, Bellei M, *et al.* Intracellular catalase/peroxidase from the phytopathogenic rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: expression analysis and biochemical characterization of the recombinant protein. *Biochem J*, 2009, **418**(2): 443-451.
- [33] Shi X, Feng M, Zhao Y, *et al.* Overexpression, purification and characterization of a recombinant secretary catalase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett*, 2008, **30**(1): 181-186.
- [34] Kimoto H, Matsuyama H, Yumoto I, *et al.* Heme content of recombinant catalase from *Psychrobacter* sp. T-3 altered by host *Escherichia coli* cell growth conditions. *Protein Expr Purif*, 2008, **59**(2): 357-359.
- [35] Shi XL, Feng MQ, Shi J, *et al.* High-level expression and purification of recombinant human catalase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2007, **54**(1): 24-29.
- [36] Nagy JM, Cass AE, Brown KA. Purification and characterization of recombinant catalase-peroxidase, which confers isoniazid sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 1997, **272**(50): 31265-31271.
- [37] Gellissen G, Piontek M, Dahlems U, *et al.* Recombinant *Hansenula polymorpha* as a biocatalyst: coexpression of the spinach glycolate oxidase (GO) and the *S. cerevisiae* catalase T (CTT1) gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **46**(1): 46-54.
- [38] Yan G, Hua Z, Du G, *et al.* Adaptive response of *Bacillus* sp. F26 to hydrogen peroxide and menadione. *Curr Microbiol*, 2006, **52**(3): 238-242.
- [39] Yan G, Hua Z, Liu D, *et al.* Influence of oxygen level on oxidative stress response of *Bacillus* sp. F26 to menadione. *Process Biochem*, 2006, **41**: 764-769.
- [40] Ichise N, Hirota K, Ichihashi D, *et al.* H₂O₂ tolerance of *Vibrio rumoiensis* S-1(T) is attributable to the cellular catalase activity. *J Biosci Bioeng*, 2008, **106**(1): 39-45.
- [41] Lushchak VI. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochem (Mosc)*, 2001, **66**(5): 476-489.

- [42] Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS, *et al.* Positive control of a regulon for defense against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*, 1985, **41**: 753-762.
- [43] Antelmann H, Engelmann S, Schmid R, *et al.* General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis*: cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *J Bacteriol*, 1996, **178**(22): 6571-6578.
- [44] Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**(4): 469-486.
- [45] Ma CY, Qi W, Du LX. The progress of the oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Tianjin Inst Light Ind*, 2002, **4**: 14-17.
马超颖, 戚薇, 杜连祥. 酿酒酵母氧化应激反应的研究进展. 天津轻工业学院学报, 2002, **4**: 14-17.
- [46] Cavaletto M, Ghezzi A, Burlando B, *et al.* Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Com Biochem Physiol C*, 2002, **131**(4): 447-455.
- [47] Piegeolet E, Corbisier P. SOD and catalase inactivation by AO. *Mech Age Dec*, 1990, **51**: 283-297.
- [48] Janero DR, Hreniuk KD, Sharif HM, *et al.* Hydrogen peroxide induced oxidative stress to the mammalian heart-muscle cell (cardiomyocyte): lethal peroxidative membrane injury. *J Cell Physiol*, 1991, **149**(3): 347-364.
- [49] Bai ZH, Harvey LM, McNeil B. Physiological responses of chemostat culture of *Aspergillus niger* (B1-D) to simulated and actual oxidative stress. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **82**(6): 691-701.
- [50] Thibessard A, Fernandez A, Gintz B. Hydrogen peroxide effects on *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 cell viability. *Res Microbiol*, 2001, **152**(6): 593-596.
- [51] Yao DD, Liu LM, Li JH, *et al.* Overproduction of catalase by oxidative stress on *Bacillus subtilis* WSHDZ-01. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(5): 786-792.
姚丹丹, 刘立明, 李江华, 等. 活性氧胁迫促进枯草芽孢杆菌 WSHDZ-01 过量合成过氧化氢酶. 生物工程学报, 2009, **25**(5): 786-792.
- [52] Wang MX, Li Y, Fang F, *et al.* Addition of menadione for stimulating catalase accumulation by *Thermoascus aurantiacus*. *Chin J Proc Eng*, 2005, **5**(3): 337-340.
王明星, 李寅, 方芳, 等. 添加甲萘醌促进嗜热子囊菌合成过氧化氢酶. 过程工程学报, 2005, **5**(3): 337-340.
- [53] Yan G, Hua Z, Li Y, *et al.* Enhanced catalase synthesis by a novel combined system of photocatalytic reactor and fermentor. *Biotechnol Lett*, 2005, **27**(10): 683-687.
- [54] Roggenkamp R, Sahm H, Wagner F. Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *FEBS Lett*, 1974, **41**(2): 283-286.
- [55] Wang FQ, Wang ZX, Shao WL, *et al.* Study on culture conditions of engineered strain of *Thermostable catalase*. *Food Ferment Ind*, 2000, **28**(2): 11-14.
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, 2000, **28**(2): 11-14.
- [56] 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.
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.
- [57] Fang F, Li Y, Du GC, *et al.* Thermo-alkali-stable catalase from *Thermoascus aurantiacus* and its potential use textile bleaching process. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(3): 424-432.
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): 423-432.
- [58] 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.
- [59] Chen J, Wang Q, Hua Z, *et al.* Research and application of biotechnology in textile industries in China. *Enzyme Microb Tech*, 2007, **40**: 1651-1655.
- [60] Leng SX, Qian GD, Hua ZZ, *et al.* Catalase for H₂O₂ removal after cotton knits bleaching. *Dyeing Finishing*, 2006, **19**: 1-3.
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, **19**: 1-3.
- [61] 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 Biotech*, 2001, **89**: 147-153.
- [62] Zhang RP. Application of hydrogen peroxidase to cotton bleaching and dyeing process. *Dyeing Finishing*, 2000, **8**: 12-14.
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, **8**: 12-14.
- [63] He ZX, Yuan J. Application and practice of hydrogen peroxidase. *Dyeing Finishing*, 2001, **5**: 29-30.
何照兴, 袁军. 过氧化氢酶的应用与实践. 印染, 2001, **5**: 29-30.