

混合添加乙醇和 H_2O_2 对嗜热子囊菌产过氧化氢酶的影响

芦国军^{1,2}, 华兆哲^{1,2*}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{1,2}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

摘要 在以嗜热子囊菌 (*T. aurantiacus* WSH03-01BC) 生产过氧化氢酶的 7L 罐发酵研究中, 发现混合添加适量的乙醇(75%) 和 H_2O_2 可以促进菌体产酶。在发酵 36h 和 48h 分别添加 0.8% (v/v) 的乙醇时, 酶活比对照提高了 34.3%; 当添加乙醇的总量超过 2.4% 时, 对菌体的生长及产酶有明显的抑制作用; 在发酵 36~60h 恒速流加 1.6% 的乙醇, CAT 的酶活达到 2519U/mL, 单位细胞产酶能力提高了 47.3%; 在发酵 36h~60h 恒速流加 1.6% 的乙醇并在 48h 混合添加 0.4% 的 H_2O_2 时, CAT 的酶活达到 2786U/mL, 比对照提高了 50.1%。

关键词: 过氧化氢酶; 嗜热子囊菌; 乙醇; 过氧化氢; 混合添加

过氧化氢酶 (hydrogen peroxidase or hydrogen peroxidase oxidoreductase), 又称触酶 (Catalase, CAT), 在食品工业、纺织工业、制浆和造纸工业、医疗诊断等方面有越来越广泛的应用。近年来, 随着环保和节能意识的不断加强, 在纺织染整工艺中利用过氧化氢酶取出漂白液中残余过氧化氢已越来越被接受^[1]。目前商品化的过氧化氢酶主要来源于牛肝、微球菌和黑曲霉, 但这些种类的过氧化氢酶耐热性和耐碱性较差。近年来, 国内外研究者对嗜热性微生物的耐热性过氧化氢酶产生了浓厚的兴趣, 关于嗜热菌^[2,3]、嗜碱菌^[4]或嗜热嗜碱菌^[5,6]产生 CAT 的报道陆续出现, 并且对利用添加不同碳源或者诱导剂 (H_2O_2 等) 来促进嗜热子囊菌合成 CAT 表现出极大的关注。本研究室在前期研究中, 对嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus*) 生产碱性耐热过氧化氢酶的基本条件及保藏稳定性进行了研究^[1], 为进一步的工业化生产工艺条件研究提供了基础。

本文在 7L 发酵罐中, 研究了用乙醇作为外加碳源对嗜热子囊菌产过氧化氢酶的影响, 并进一步研究混合添加乙醇和 H_2O_2 对嗜热子囊菌产酶的促进作用, 从而考察利用 *T. aurantiacus* WSH 03-01 发酵产 CAT 的工业化生产的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

金黄色嗜热子囊菌 (*Thermoascus aurantiacus* WSH 03-01BC), 江南大学生物工程学院环境生物技术研究室保藏。

1.1.2 培养基

斜面培养基 (每支茄子瓶): 5 度麦芽汁 50mL, 琼脂 1g, pH 6.0。

种子培养基 (g/L): 酵母膏 4, 玉米淀粉 15, 蛋白胨 4, K_2HPO_4 1, Na_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5; pH 6.8。

基础发酵培养基 (g/L): 玉米淀粉 26, 蛋白胨 10, $(NH_4)_2SO_4$ 2, K_2HPO_4 5, $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 微量元素液 2 mL; pH 8.0。

微量元素液 (g/L): $FeC_6H_5O_7 \cdot nH_2O$ 6, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 4, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1, KI 0.1, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.1, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1, H_3BO_3 0.1, NaCl 5。

1.1.3 化学试剂

乙醇(75%), H_2O_2 (30%)。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)(No. 2007CB714306); 国家自然科学基金项目(20676056)。

* 作者简介: 芦国军(1984~), 男, 硕士研究生, 环境工程专业。

* 通讯作者, 电话: 0510-85918309, E-mail: huazz@jiangnan.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 培养方法

将成熟的孢子接种至斜面上,于45℃培养12~15d,待孢子成熟后,刮取斜面上的孢子,用无菌水制成孢子悬液接种于种子培养基中(培养基中孢子浓度为10⁴个/mL),45℃摇床培养52h。按10%的接种量接种于含100 mL基础发酵培养基的500 mL摇瓶中,于45℃培养72h。每项实验均设3个平行样。

1.2.2 测定方法

1.2.2.1 发酵液挥发量的校正

由于发酵过程在45℃高温下进行且周期较长,培养基中水分的挥发对实验结果的准确性有较大影响,因此在发酵结束后采用称重补水法进行校正。将接种后的摇瓶用电子天平(±0.01 g)记录初始质量,发酵结束后,分别将去离子水补入摇瓶至相应初始值。恢复质量后的发酵液再用于发酵液各项参数的分析测定。

1.2.2.2 生物量测定

取50 mL发酵液进行真空抽滤,收集湿菌体,用蒸馏水洗涤2次后,置105℃下干燥至恒重,用称重法测定生物量。

1.2.2.3 过氧化氢酶活性测定

过氧化氢酶活性采用分光光度法在25℃下测定^[7]。反应总体积为3 mL,含0.1 mL酶液和2.9 mL含10mmol/L H₂O₂的50 mmol/L磷酸二氢钾、磷酸氢二钠缓冲液(pH 7.0)。过氧化氢的分解速率用752型紫外-可见分光光度计在240 nm下测定。酶活定义为:在25℃下,分解H₂O₂ 1 μmol/min所需的酶量为一个酶活单位。

1.2.2.4 总糖的测定

总糖的测定采用蒽酮比色法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 乙醇添加量对过氧化氢酶合成的影响

有研究表明乙醇作为嗜热子囊菌的碳源^[9]对菌体产酶有促进作用,一方面,乙醇可以作为碳源参与菌体的生长代谢;另一方面,乙醇在*T. aurantiacus* WSH03-01体内可能的代谢途径是:体系中的乙醇首先在NADPH氧化酶-过氧化氢酶体系作用下,在过氧化氢酶的催化下直接氧化成乙醛,然后生成的乙醛可

由乙醛脱氢酶(ALDH)代谢成乙酸,后者以乙酰CoA的形式进入三羧酸循环,氧化成二氧化碳和水。因此,在发酵过程中添加乙醇可以对*T. aurantiacus* WSH03-01BC合成过氧化氢酶有着较好的诱导作用。在工业化生产时,如果采用95%乙醇,因为补料罐体积太大,无法提供紫外照射,不能保证在无菌环境下将乙醇加入容器,要保证无菌条件下会增加生产成本,因此采用75%的乙醇作为外加碳源,不仅可以降低染菌的机会,而且有效地节约工业生产的成本。从该生产菌种生长周期看,16h~44h是该子囊菌的对数生长期,因此选择在36h开始添加乙醇。从图1可以看到,添加适量的乙醇可以促进过氧化氢酶的合成,当向发酵液中添加0.8% (体积百分数)时,在菌体浓度下降了4.64%的情况下,过氧化氢酶的产量却达到2276 U/mL,比对照组提高了29.46%。随着添加量的增加,当超过0.8%时,细胞生长受到了明显的抑制,并且酶产量也在下降。

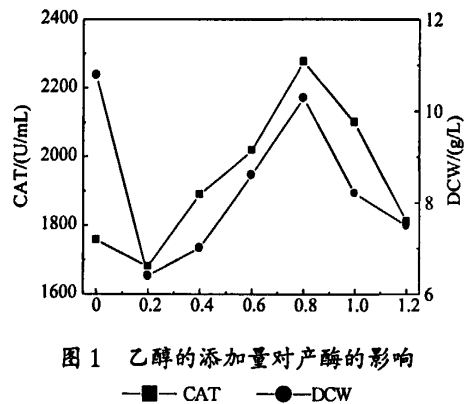


图1 乙醇的添加量对产酶的影响

—■— CAT —●— DCW

2.2 乙醇添加时间对过氧化氢酶合成的影响

实验表明,乙醇的添加时间对菌体生长和过氧化氢酶的合成都有较大的影响(图2a)。在发酵前期添加的乙醇对菌体合成酶的促进作用很小,并且比较明显地抑制菌体生长,而乙醇添加时间较晚对过氧化氢酶的合成具有很好的促进作用,在36h添加乙醇,细胞浓度虽降低了5.6%,但过氧化氢酶的酶活为2289 U/mL,比对照提高了28.74%(图2b),单位细胞产酶能力比对照提高了36.5%。在发酵前期添加的乙醇抑制了细胞的生长,可能是因为一方面乙醇(75%)在接触菌体的短时间内具有杀菌作用,另一方面由于细胞生长及相关酶系刚处于发育

的初期,所以对菌体的生长有较强的抑制作用,而过氧化氢酶主要在发酵后期合成。因此,在发酵后期添加的乙醇不仅可以补充一定量的碳源,而且可以作为诱导剂,对过氧化氢酶的合成具有一定诱导作用。

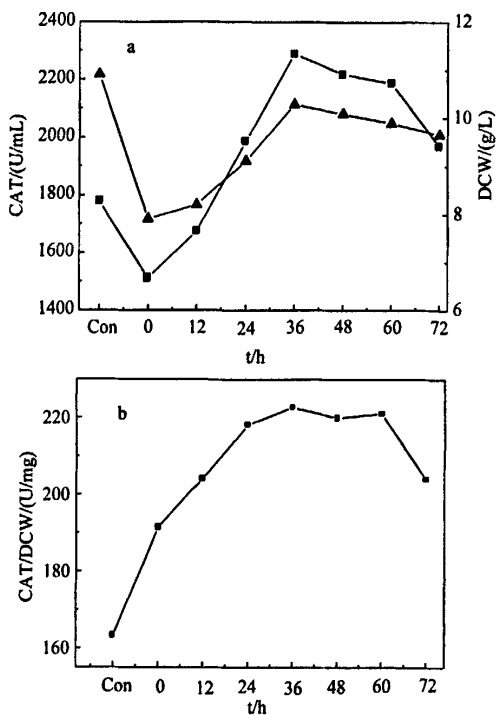


图2 乙醇的添加时间对菌体产酶的影响
(a,对菌体生长和产酶的影响;b,对单位细胞产酶的影响)
—■— CAT —▲— DCW

2.3 乙醇添加方式对过氧化氢酶合成影响的比较

实验结果表明,添加适量的乙醇可以促进过氧化氢酶的合成,乙醇既可以作为一种补充碳源,又是一种刺激子囊菌产过氧化氢酶的重要诱导剂。通过

表1 乙醇(75%)的多次添加对产酶的影响

添加时间 (h)	DCW(g/L)	CAT(U/mL)	CAT/DCW(U/mg)
对照	10.9	1778	163.12
36	10.28	2276	221.40
24, 36	10.39	2240	215.59
36, 48	10.67	2389	229.99
48, 60	10.21	2219	217.33
24, 36, 48	9.99	2102	210.41
24, 48, 60	9.85	1989	201.93
36, 48, 60	9.91	2076	209.48
24, 36, 48, 60	9.44	1689	215.28

多次少量的添加乙醇,给细胞以持续地刺激,可以进一步提高过氧化氢酶的提高(表1)。结果表明随着添加次数的增加而添加总量超过2.4%时,乙醇对细胞生长有着明显的抑制,产酶量也在下降;而在36h和48h分别添加0.8%的乙醇,发酵结束时过氧化氢酶产量达到了2389U/mL,较对照提高了34.3%。

上述实验结果表明多次少量的添加乙醇可以有效地促进菌体合成过氧化氢酶,那么可以选择恒速流加的方式给细胞均匀持续的刺激,促进菌体更有效地合成过氧化氢酶。在36h~60h恒速流加总量为1.6%的乙醇,结果显示分别在36h、48h添加0.8%的乙醇和在36~60h恒速流加总量1.6%的乙醇两种方式对菌体的生长的影响趋势基本一致(图3),但是在48~60h阶段前者的菌体量下降幅度很大,细胞浓度下降了5.4%,这可能是因为48h一次性添加0.8%的乙醇,对菌体生长产生较大的抑制作用,而在细胞浓度比对照下降2.1%时,酶活提高了30%,单位细胞产酶能力提高了40.9%;在48~60h阶段采取恒速流加方式的菌体量下降不明显,菌体量比较稳定,可能由于持续地给菌体以均匀的较小的刺激,对菌体的生长的抑制作用相对较小,有利于菌体稳定地合成过氧化氢酶,与对照相比细胞浓度下降3.9%(图4),酶活达到了2519U/mL,比对照提高了41.6%,单位细胞的产酶能力提高了47.3%,在添加总量一定的乙醇时,采取恒速流加更能有效地促进菌体合成过氧化氢酶。

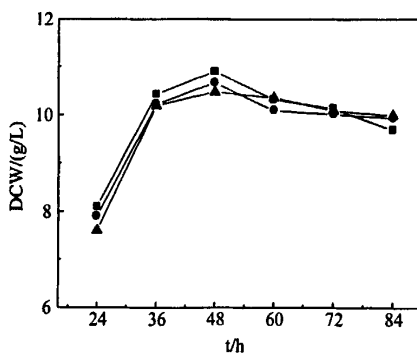


图3 乙醇的不同添加方式对菌体生长的影响
▲ 发酵36h,48h分别添加0.8%的乙醇;
● 发酵36h~60h恒速流加1.6%的乙醇;■ 对照

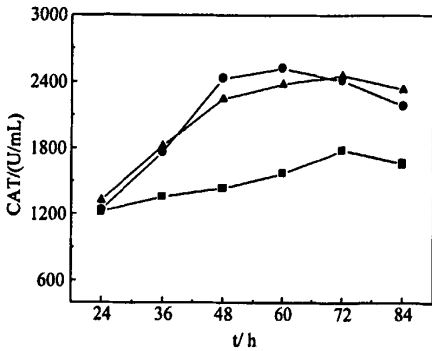


图4 乙醇的不同添加方式对产酶的影响

▲发酵36h,48h分别添加0.8%的乙醇;
●发酵36h-60h恒速流加1.6%的乙醇;■对照

2.4 H₂O₂添加浓度对过氧化氢酶合成的影响

H₂O₂是刺激菌体产生CAT的直接外源诱导物,有研究表明当细胞受到某些因素刺激导致活性氧大量产生,引起细胞氧化损伤时,抗氧化酶合成水平的提高是细胞抵抗氧自由基攻击最直接也是最有效的方式^[10]。缺少CAT的*T. aurantiacus* WSH03-01在正常生长条件下其生长受到的影响并不大,但是在外源H₂O₂直接胁迫下,CAT却是不可缺少的,只有高水平的CAT才能够保证细胞在高浓度的H₂O₂中存活下来^[11]。H₂O₂作为菌体合成CAT直接的诱导剂,发酵过程中添加过量的H₂O₂可以有效地刺激细胞产生过氧化氢酶。实验表明(数据未列出),在菌体生长的稳定期前期添加H₂O₂对菌体产CAT有明显的促进作用,选择在发酵48h添加不同浓度的H₂O₂以考察其对菌体产酶的影响。实验结果表明添加适量的H₂O₂可以促进过氧化氢酶的合成,甚至能促进菌体的生长,如图5所示,当向发酵液中添加0.3%(体积分数)的H₂O₂时,发酵结束时酶活达到最高2258U/mL,比对照提高了26.9%,而菌体浓度基本上不变,单位细胞的产酶能力提高了27%,随着H₂O₂的添加量的增加,菌体产过氧化氢酶的量渐渐降低,这时候H₂O₂对菌体产酶以及生长的抑制作用占据主导地位。有报道称添加甲萘醌(Menadione, 又称维生素K3)也可以有效地促进子囊菌产酶^[12,13],但是作为一种内源的刺激物甲萘醌对细胞的生长具有较大的损害作用,并且价格较贵,不适合作为工业上刺激过氧化氢酶生长的外加刺激物。

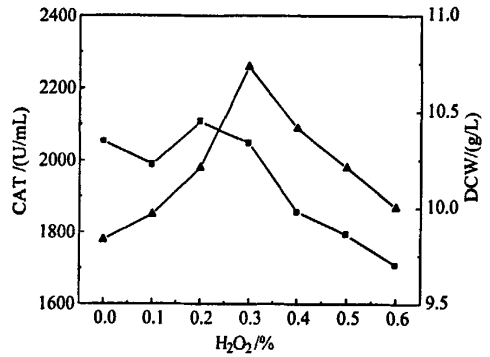


图5 H₂O₂的浓度对产酶的影响

—▲—CAT —■—DCW

2.5 乙醇和H₂O₂混合添加对过氧化氢酶合成的影响

上述实验结果表明添加一定量的乙醇(75%)或H₂O₂都可以有效地促进菌体合成过氧化氢酶,但是一次性的添加不能给菌体以均匀稳定的诱导作用,在一定程度上影响了菌体大量合成过氧化氢酶,所以考虑在36h~60h发酵期间恒速流加乙醇,在发酵期间混合添加H₂O₂与乙醇既可以在菌体的发酵过程中持续地给菌体的生长代谢提供一定的碳源,又可以在NADPH氧化酶-过氧化氢酶体系作用下,由过氧化氢酶的催化氧化变成二氧化碳和水,从而可以对菌体过量合成过氧化氢酶起到较好的诱导作用;实验表明在恒速流加乙醇的基础上,混合添加H₂O₂会大大加强对菌体的诱导作用,而对菌体的生长的抑制作用却不是叠加的,影响不大,具体原因需要进一步探讨。前面实验表明单独添加0.8%的75%乙醇或者添加0.3%的H₂O₂分别可以促进菌体产酶量达到最大,则选择1.2%(0.6%)、1.6%(0.8%)、2.0%(1.0%)三种添加量的乙醇在36~48h采取恒速流加方式以及选择0.2%、0.3%、0.4%三种添加量的H₂O₂进行混合添加,寻求最佳诱导菌体产酶的条件,实验结果显示添加H₂O₂的最佳混合添加时间分别选择在发酵36h(菌体对数生长期)和48h(生长稳定期的前期)。

在发酵36~60h期间,在恒速流加乙醇的基础上,考察混合添加乙醇和H₂O₂对过氧化氢酶合成的影响。结果表明(表3)在菌体的生长稳定期恒速流加1.6%的乙醇以及0.4%的H₂O₂可以有效地促进

菌体产CAT,因为在这一时期,菌体的总量达到一个最大值,此时特别是处于菌体生长对数期与菌体生长稳定期转换阶段,有大量的次生代谢产物产生,包括一些酶和抗生素,菌体的过氧化氢酶产量在这时达到最高值2786U/mL,而单独添加乙醇可以使过氧化氢酶产量提高29.46%,单独添加H₂O₂过氧化氢酶产量比对照提高了26.9%,而两者进行有效的混合添加,在发酵结束时酶活比对照提高了50.1%,单位的细胞产酶量达到258.77U/mg,比对照提高了51.9%(表2),在菌体的生长对数期考察这种混合添加方式产过氧化氢酶的影响,此时菌体的代谢活力最强,生长速度最大,世代期短,从而对外界不良环境条件比较敏感,虽然如表2显示,在流加2.0%的乙醇以及添加0.4%的情况下,对数期菌体的产酶量达到了2469U/mL,但是由于此时菌体吸收营养主要维持自身的高速生长和繁殖速度,一些代谢产物包括一些抗生素和酶主要在生长稳定期的前期产生,所以菌体产酶量相比较低,而且由于此时环境对菌体的生长抑制作用很强,从表2和表3对比可知,在相同环境下处于对数生长期的菌体的生长更容易受到抑制,细胞浓度普遍比在稳定期前

表2 H₂O₂在发酵36h添加对过氧化氢酶合成的影响
(75%的乙醇在36h~60h恒速流加)

乙醇(75%)	H ₂ O ₂	CAT/(U/mL)	DCW/(g/L)	CAT/DCW/(U/mg)
1.2%	0.2%	2228	9.54	233.54
1.2%	0.3%	2304	9.67	238.26
1.2%	0.4%	2367	9.75	242.77
1.6%	0.2%	2415	9.97	242.22
1.6%	0.3%	2400	9.98	240.48
1.6%	0.4%	2349	10.11	232.34
2.0%	0.2%	2449	10.24	239.16
2.0%	0.3%	2300	9.99	230.23
2.0%	0.4%	2469	10.18	242.53

表3 H₂O₂在发酵48h添加对过氧化氢酶合成的影响
(75%的乙醇在36h~60h恒速流加)

乙醇(75%)	H ₂ O ₂	CAT(U/mL)	DCW(g/L)	CAT/DCW(U/mg)
1.2%	0.2%	2320	9.95	233.16
1.2%	0.3%	2400	9.89	242.67
1.2%	0.4%	2190	9.56	229.08
1.6%	0.2%	2410	9.69	248.71
1.6%	0.3%	2523	10.33	244.24
1.6%	0.4%	2786	10.38	258.77
2.0%	0.2%	2468	10.09	244.59
2.0%	0.3%	2458	10.19	241.22
2.0%	0.4%	2400	9.99	240.24

期的低,这也影响了菌体对过氧化氢酶的进一步合成。实验结果显示恒速流加适量的乙醇以及混合添加H₂O₂能有效促进菌体生产过氧化氢酶,特别是在菌体的稳定生长期的前期流加1.6%的乙醇以及混合添加0.4%的H₂O₂可以使菌体产过氧化氢酶达到最大值。

3 结论

3.1 添加适量的乙醇可以促进菌体合成过氧化氢酶,当添加总量超过2.4%时,细胞的生长及产酶都受到较大的抑制。

3.2 在发酵36h~48h,恒速流加乙醇比一次性添加等量的乙醇更有效地促进菌体的产酶。

3.3 处于生长对数期的菌体相比稳定期前期的菌体生长更容易受到添加的乙醇以及H₂O₂的抑制,不利于诱导过氧化氢酶的合成。

3.4 在菌体生长的稳定期前期恒速流加适量的1.6%乙醇以及混合添加0.4%的H₂O₂过氧化氢酶的产量比对照提高了50.1%。

参 考 文 献

- [1] 冷晒详.过氧化氢酶的棉针织物漂染工艺研究. 印染,2006, No.19:01~03
- [2] 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.微生物学报,1990,30(3):223~227
- [3] Allgood G S, Perry J J. Characterization of a manganese containing catalase from the obligate thermophile *Thermoleophilum album*. J Bacteriol, 1986, 168 (2):563~7
- [4] Iiso Y, Yoshihiro F, Tateo Y. Purification and characterization of catalase from a facultative alkalophilic *Bacillus*. J Biochem, 1990, 108:583~587
- [5] Parr 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 Biotechnol, 2001, 89:147~153
- [6] E. Kalogeris, P. Christakopoulos, P. Katapodis, et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. J Process Biochemistry, 2003, 38:1099~1104
- [7] Issei Kobayashi, Takashi Tamura, Haitham Sghaier, et al. Characterization of Monofunctional Catalase KatA from Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans*. J Journal of Bioscience and

- Bioengineering, 2006, 101(4): 315~321
- [8] 王薇青. 淀粉科学手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1990, 235~236
- [9] HONGXIAN WANG, YUKIKO TOKUSIGE, HIROFUMI SHINOYAMA, *et al.* Purification and Characterization of a Thermotable Catalase from Culture Broth of *Thermoascus aurantiacus*. J Journal of Bioscience and Bioengineering, 1998, 85(2): 169~173
- [10] Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality J CR Biologies, 2004, 327: 649~662
- [11] Loewen P. In oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses. J Cold Spring Harbor Lab Press, 1997, Cold Spring Harbor N Y: 273~308
- [12] Mongkolsuk S, Vattanaviboon P, Praitau W. Induced adaptive and cross-protection responses against oxidative stress killing in a bacterial phytopathogen, *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*. J FEMS Microbiology Letters, 1997, 146(2): 217~222
- [13] 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. J 过程工程学报, 2005, 5(3): 337~340
- [14] 曹翔宇. 纺织用碱性耐热过氧化氢酶的微生物法生产及保存稳定性的研究. 江南大学硕士论文. 2006, 3
- [15] 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): 423~428
- [16] HEE-SUN KO, YUICHI YOKOYAMA, NOBUKO OHNO, *et al.* Purification and Characterization of Intracellular and Extracellular, Thermotable and Alkali-Tolerant Alcohol Oxidases Produced by a Thermophilic Fungus, *Thermoascus aurantiacus* NBRC 31693. J Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 99(4): 348~353
- [17] HEE-SUN KO, HIDENORI FUJIWARA, YUICHI YOKOYAMA, *et al.* Inducible Production of Alcohol Oxidase and Catalase in a Pectin Medium by *Thermoascus aurantiacus* IFO 31693. J Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 99(3): 290~292
- [18] Bergmeyer H U, Bergmeyer J, Grabl M, *et al.* Methods of Enzymatic Analysis. [M] Weinheim: Verlag Chemie Press, 1983, 3(3): 257~259
- [19] Aurelio Hidalgo, Lorena Betancor, Fernando Lopez-Gallego, *et al.* Design of an immobilized preparation of catalase from *Thermus thermophilus* to be used in a wide range of conditions. Structural stabilization of a multimeric enzyme. J Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33: 278~285
- [20] F. Horst, E. H. Rueda a, M. L. Ferreira. Activity of magnetite-immobilized catalase in hydrogen peroxide decomposition. J Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38: 1005~1012
- [21] 赵志军, 华兆哲, 陈坚. 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: 667~671
- [22] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994, pp. 682~6881

Effects of adding mixture of ethanol and hydrogen peroxide on production of catalase by *Thermoascus aurantiacus*

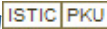
LU Guo-jun^{1,2}, HUA Zhao-zhe^{1,2}, DU Guo-cheng^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}

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

2. School of Biotechnology, Jiangsu University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract The effects of adding the mixture of ethanol(75%) and H₂O₂ on the production of catalase (CAT) by *T. aurantiacus* WSH03-01 were investigated in a 7L fermentor. The addition with appropriate mixture of ethanol and H₂O₂ enhanced the production of CAT. Compared with that of the control, CAT activity increased 34.3% by adding 0.8% (v/v) ethanol to the broth at 36h and 48h. When the total ethanol in the fermentation liquor exceed 2.4% (v/v), the production of CAT and the growth of *T. aurantiacus* WSH03-01 were inhibited significantly. When 1.6% ethanol was added to the broth by fed-batch with constant rate from 36h to 60h, the CAT activity reached 2519U/mL, and the specific productivity of CAT increased 47.3% compared with that of the control. When 1.6% ethanol was added with constant rate from 36h to 60h and 0.4% H₂O₂ (v/v) was added at 48h, the CAT activity reached 2786U/mL which was 50.1% higher than that of the control (1856U/mL).

Key words catalase; *Thermoascus aurantiacus*; ethanol; hydrogen peroxide; mixed addition

作者: 芦国军, 华兆哲, 堵国成, 陈坚, LU Guo-jun, HUA Zhao-zhe, DU Guo-cheng, CHEN Jian
作者单位: 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡, 214122; 江南大学生物工程学院, 江苏无锡, 214122
刊名: 工业微生物 
英文刊名: INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
年, 卷(期): 2009, 39(1)
被引用次数: 0次

参考文献(22条)

1. 冷晒详. 过氧化氢酶的棉针织物漂染工艺研究[期刊论文]-印染 2006(19)
2. 周一. 严自正. 卢运玉. 耐热过氧化氢酶产生菌的筛选和发酵条件的研究 1990(03)
3. Allgood G S. Perry J J. Characterization of a manganese containing catalase from the obligate thermophile Thermoleophilum album 1986(02)
4. Isao Y. Yoshihiro F. Tateo Y. Purification and characterization of catalase from a facultative alkalophilic Bacillus 1990
5. Parr A. Costa S. Tzanov T. Thermo-alkali-stable catalases from newly isolated Bacillus sp For the treatment and recycling of textile bleaching effluents 2001
6. E. Kalogeris. P. Christakopoulos. P. Katapodis. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus Thermoascus aurantiacus under solid state cultivation of agricultural wastes 2003
7. Issei Kobayashi. Takashi Tamura. Haitham Sghaier. Characterization of Monofunctional Catalase KatA from Radioresistant Bacterium Deinococcus radiodurans 2006(04)
8. 王薇青. 淀粉科学手册 1990
9. HONGXIAN WANG. YUKIKO TOKUSIGE. HIROFUMI SHINOYAMA. Purification and Characterization of a Thermostable Catalase from Culture Broth of Thermoascus aurantiacus 1998(02)
10. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality 2004
11. Loewen P. In oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses 1997
12. Mongkolsuk S. Vattanaviboon P. Praituan W. Induced adaptive and cross-protection responses against oxidative stress killing in a bacterial phytopathogen, Xanthomonas oryzae pv. Oryzae 1997(02)
13. 王明星. 李寅. 方芳. 添加甲萘醌促进嗜热子囊菌合成过氧化氢酶[期刊论文]-过程工程学报 2005(03)
14. 曹翔宇. 纺织用碱性耐热过氧化氢酶的微生物法生产及保存稳定性的研究 2006
15. 方芳. 李寅. 堵国成. 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[期刊论文]-生物工程学报 2004(03)
16. HEE-SUN KO. YUICHI YOKOYAMA. NOBUKO OHNO. Purification and Characterization of Intracellular and Extracellular, Thermostable and Alkali-Tolerant Alcohol Oxidases Produced by a Thermophilic Fungus, Thermoascus aurantiacus NBRC 31693 2005(04)
17. HEE-SUN KO. HIDENORI FUJIWARA. YUICHI YOKOYAMA. Inducible Production of Alcohol Oxidase and Catalase in a Pectin Medium by Thermoascus aurantiacus IFO 31693 2005(03)
18. Bergmeyer H U. Bergmeyer J. Grabl M. Methods of Enzymatic Analysis 1983

19. Aurelio Hidalgo, Lorena Betancor, Fernando Lopez-Gallego Design of an immobilized preparation of catalase from *Thermus thermophilus* to be used in a wide range of conditions Structural stabilization of a multimeric enzyme 2003
20. F. Horst, E. H. Rueda a. M. L. Ferreira Activity of magnetite-immobilized catalase in hydrogen peroxide decomposition 2006
21. 赵志军, 华兆哲, 陈坚 碱性过氧化氢酶高产菌的筛选、鉴定及发酵条件优化 [期刊论文]-眼科微生物学通报 2007
22. 诸葛健, 王正祥 工业微生物实验技术手册 1994

相似文献(10条)

1. 期刊论文 方芳, 李寅, 堵国成, 张娟, 陈坚 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)

研究了一株嗜热子囊菌过氧化氢酶的摇瓶发酵条件, 并对其在纺织工业中的应用潜力进行了评价。以20 g/L糊精和1% (V/V) 乙醇为混合碳源时, 过氧化氢酶活力达到1594 u/mL, 比以糊精和乙醇单独为碳源时过氧化氢酶的活力之和还高23%。改变培养基的初始pH、提高发酵液中的溶氧水平及添加外源过氧化氢, 过氧化氢酶的产量进一步提高到2762 u/mL, 比优化前提高了5.8倍。将嗜热子囊菌的过氧化氢酶同来源于牛肝、黑曲霉的过氧化氢酶进行了热(70℃, 80℃, 90℃)、碱(pH 9.0, pH 10.0, pH 11.0)稳定性的比较。结果显示, 产自嗜热子囊菌的过氧化氢酶对高温和强碱性的耐受性能明显优于其它来源的酶, 在纺织染整工艺中具有良好的应用潜力。

2. 学位论文 谢雪凤 嗜热子囊菌产过氧化氢酶的生产、固定化及应用研究 2009

本文所研究的过氧化氢酶是由嗜热子囊菌胞外分泌产生。过氧化氢酶是一种能够高效催化分解过氧化氢的酶, 广泛应用于食品消毒、临床分析、医学诊断以及纺织、造纸、制浆等工业。本文对嗜热子囊菌发酵生产过氧化氢酶的条件进行了优化, 所产粗酶经初步分离纯化后, 研究其酶学性质。利用大孔吸附树脂对过氧化氢酶进行固定化, 研究其最优固定化条件、固定化酶性质, 并对其去除H₂O₂的应用做了研究。

对摇瓶发酵条件进行优化, 结果表明, 最优种子培养条件是: 碳源为玉米淀粉, 氮源为蛋白胨, 转速200r/min, 装液量200mL (500mL摇瓶), 培养52h。在基础发酵阶段, 最优条件为: 10m/L的乙醇、20g/L的糊精为混合碳源, 氮源为10g/L的蛋白胨, 发酵培养基的初始pH为7.0, 摇瓶装液量为90mL (500mL摇瓶), 分阶段控制摇床转速, 酶活力最高达2267U/mL。在3L发酵罐中发酵时, 最优的发酵条件为: 接种量6% (v/v), 搅拌转速200rpm, 从发酵24h开始, 每12h添加一次乙醇, 每次添加量为2mL (总添加量16mL)。发酵时间延长至116h, 酶活最高达到2532U/mL。

采用过滤-超滤-硫酸铵盐析-透析等步骤对粗酶液进行初步的分离纯化, 研究酶学性质。结果表明, 粗酶液经过分离纯化以后, 酶活回收率达到了59.3%, 蛋白回收率30.2%, 比酶活为4608 U/mg蛋白, 纯化了1.96倍。酶的最适反应温度为30℃, 最适反应pH为7.0, 具有良好的耐热耐碱性能。向发酵超滤液中添加一定量的甘油或者明胶, 可以提高酶的贮藏稳定性。

选择AB-8大孔吸附树脂作为固定化载体, 戊二醛作为交联剂, 最优固定化条件为: 吸附温度35℃, pH7.0, 吸附时间6h, 加酶量970U/g (载体), 戊二醛终浓度0.2%, 交联时间2h, 交联温度4℃。在此条件下固定化过氧化氢酶的酶活收率达到45.2%。固定化酶的最适反应温度为35℃, 最适反应pH7.0。固定化酶的热稳定性, 酸碱稳定性都较游离酶有了一定的提高, 且具有较好的操作稳定性及贮藏稳定性, 固定化酶重复使用10次, 酶活仍能稳定保持在初始酶活的60%以上。游离酶和固定化酶对H₂O₂都有很好的去除效果, 在20min内能将H₂O₂完全去除。

3. 期刊论文 王明星, 李寅, 方芳, 华兆哲, 陈坚, WANG Ming-xing, LI Yin, FANG Fang, HUA Zhao-zhe, CHEN Jian 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)

研究了添加甲萘醌对嗜热子囊菌(*Thermoascus aurantiacus*) IF09862合成过氧化氢酶(CAT)的影响。结果表明, 添加甲萘醌有助于促进CAT的合成。在发酵的24或48 h分别添加1 μmol/L的甲萘醌, 发酵终了CAT酶活比对照分别提高了11.0%和23.1%;而在发酵的36和48 h各添加1 μmol/L的甲萘醌, CAT酶活可提高32.5%。在发酵0 h添加88 mmol/L的H₂O₂, 同时在48 h添加1 μmol/L的甲萘醌, CAT酶活达到1725 U/mL, 比对照(1074 U/mL)提高了60.6%。

4. 会议论文 冷晒祥, 华兆哲, 堵国成, 陈坚 纺织清洁生产用过氧化氢酶发酵生产条件及酶学性质 2007

为了节约工业化生产成本, 考察了不同工业级氮源对一株嗜热子囊菌发酵生产过氧化氢酶的影响, 结果表明, 以0.076 g/L鱼粉和0.038 g/L蛋白胨为混合氮源时, 过氧化氢酶活力达到1858u/mL, 基本能达到以0.076 g/L蛋白胨为氮源时的过氧化氢酶的活力, 使得原料成本降低了近40%。探讨嗜热子囊菌的过氧化氢酶高温和强碱性的稳定性的结果表明: 酶在pH在7~14区域稳定, 而在pH>15时酶失活。酶在85℃处理30 min酶活基本稳定, 而在高于90℃酶快速失活。产自嗜热子囊菌的过氧化氢酶在纺织染整工艺中具有良好的应用潜力。

5. 会议论文 冷晒祥, 华兆哲, 堵国成, 陈坚 纺织清洁生产用过氧化氢酶发酵生产条件及酶学性质 2006

为了节约工业化生产成本, 考察了不同工业级氮源对一株嗜热子囊菌发酵生产过氧化氢酶的影响, 结果表明, 以0.076 g/L鱼粉和0.038 g/L蛋白胨为混合氮源时, 过氧化氢酶活力达到1858u/mL, 基本能达到以0.076 g/L蛋白胨为氮源时的过氧化氢酶的活力, 使得原料成本降低了近40%。探讨嗜热子囊菌的过氧化氢酶高温和强碱性的稳定性的结果表明: 酶在pH在7~14区域稳定, 而在pH>15时酶失活。酶在85℃处理30 min酶活基本稳定, 而在高于90℃酶快速失活。产自嗜热子囊菌的过氧化氢酶在纺织染整工艺中具有良好的应用潜力。

6. 学位论文 芦国军 纺织清洁生产用过氧化氢酶的工业化生产条件优化 2008

过氧化氢酶(Catalase, 简称CAT), 存在于所有好氧微生物和动植物细胞内, 催化H₂O₂分解为H₂O和O₂, 在食品消毒、临床分析、医学诊断以及纺织、造纸、制浆等工业得到越来越广泛的应用。随着人们环保意识的加强, 过氧化氢酶开始用于织物漂白工艺中替代水洗和化学试剂还原法去除H₂O₂, 是一种绿色、清洁、高效的生物催化剂。但是, 大多数商品CAT不能耐受漂白溶液的苛刻条件, 因此需要开发在高温(>60℃)和碱性(pH>9)条件下稳定的酶, 而嗜热子囊菌*Thermoascus aurantiacus* WSH03-01BC所产的CAT与目前市场上的商品酶相比, 其耐热、耐碱性更能满足纺织漂染工艺的要求。

本文以一株嗜热子囊菌*Thermoascus aurantiacus* WSH03-01BC为出发菌株, 研究了发酵工艺改进和环境因素对菌体合成CAT的影响, 并针对细胞内存在的葡萄糖分解代谢物阻遏现象, 联系其与乙醇代谢的关系, 找到了添加乙醇(75%)促进CAT合成有利的规律。此外还对该菌株所产CAT粗酶的简单性能, 应用进行了研究, 并且对活性氧影响细胞生长以及产酶的机理进行了初探。主要研究内容如下:

1. 由于*T. aurantiacus* WSH03-01BC子囊菌在发酵产酶的不同阶段对溶氧的要求不同的, 分阶段控制溶氧水平有利于提高细胞生长和合成CAT水平。发酵0~48h控制DO浓度为80% (体积分数), 菌体的生长量DCW达到最大值10.53g/L, 比对照(10.09g/L)提高了4.4%; 在发酵48h~72h控制SUDO水平为50% (v/v), 菌体合成过氧化氢酶达到最大值2837U/ml, 比对照(1887U/ml)提高了50.34%。

2. *T. aurantiacus* WSH03-01BC子囊菌是一种专性嗜热菌, 实验表明它的最适生长温度和最适产酶温度不一致。分阶段控制发酵温度策略使得菌体的生长充分的前提下进一步促进菌体大量的合成过氧化氢酶。发酵0h~36h控制发酵温度为46℃, 在36h~72h将温度恒定在49℃, 生长量达到10.79g/L, 最大酶活达到了2875U/mL, 单位细胞产酶能力达到278.86U/mg, 与单一控制发酵温度为46℃时的最大的酶活相比, 分别提高了28.9%和29.9%。

3. 适量添加乙醇(75%)可以促进菌体合成过氧化氢酶, 当添加总量超过2.4%时, 细胞的生长及产酶则受到较大的抑制。在发酵36~48h, 恒速流加

乙醇比一次性添加等量的乙醇更有效地促进菌体的产酶。在菌体生长的稳定期前期恒速流加1.6%乙醇以及混合添加0.4%的H₂O₂, 过氧化氢酶的产量比对照提高50.1%。

4. 在前期研究的基础上, 将实验结果放大到1m³和5m³罐的中试规模时, 1m³和5m³罐的酶活和生产强度分别达到2224U/mL; 9267U/L·h和2300U/mL; 13938U/L·h, 分别接近和高于7L罐水平, 表明所采用的放大方法并由此确定的通气量和搅拌转速是合理的, 并且实际试生产结果表明利用*T. aurantiacus* WSH03-01BC进行工业化产CAT是完全可行的。

5. *T. aurantiacus* WSH-03-01BC所产CAT粗酶液的特性研究表明, 此酶的热稳定性较高, 温度适用范围是60℃~80℃, pH的适用范围为9~11, 其耐受高温和强碱性环境的特性在纺织行业中将有广阔的应用前景。

6. 提高环境中的溶氧浓度能够促进*T. aurantiacus* WSH03-01BC生长, 但细胞对高氧浓度引起的O₂-胁迫应激水平并不高, 表现为提高溶氧浓度(50%—80%)时CAT酶活没有明显地提高。而在甲苯酮(流加速度3 μM·h⁻¹)存在的情况下, 提高溶氧浓度使得细胞对O₂-胁迫应激水平提高了, 表现为当溶氧浓度提高到50%时, SOD和CAT酶活分别达到12.11U/mg和3200U/mL, 与25%水平相比, 分别提高了18.6%和17.3%; 当DO继续提高到80%时, 最大SOD酶活高达12U/mg, 但是最高CAT酶活(2889U/ml)与50%水平相比却降低了10.8%。对比细胞生长的情况, 这可能是由于细胞受到过高的氧化损伤造成的。

7. 会议论文 [芳芳. 堵国成. 陈坚. 来自嗜热菌的过氧化氢酶发酵条件优化及其在纺织工业中应用潜力的研究](#) 2003

过氧化氢酶是一种催化效率非常高的生化酶, 广泛用于食品消毒、临床分析、医学诊断以及纺织、造纸、制浆等工业。近年来随着纺织工业追求全程绿色, 织物染整工艺的改进, 大大加速了市场对过氧化氢酶的需求。过氧化氢酶在染整工艺中, 主要是用于去除织物漂白废液中残余的过氧化氢, 以避免给后续染色工序带来问题。目前国内、外对过氧化氢酶的研究多数为酶学性质的研究, 商品酶则主要来自动物肝脏和黑曲霉。由于织物经漂白后的废液为高温、碱性, 因此给提取自动物器官和由普通微生物合成的过氧化氢酶的应用带来一定的挑战。本研究旨在开发纺织用过氧化氢酶, 采用一株嗜热子囊菌用于过氧化氢酶的生物合成。

8. 期刊论文 [曹翔宇. 华兆哲. 燕国梁. 堵国成. 陈坚. CAO Xiang-Yu. HUA Zhao-Zhe. DU Guo-Cheng. YAN Guo-Liang.](#)

[CHEN Jian 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\(4\)](#)

在以嗜热子囊菌生产过氧化氢酶的摇瓶发酵研究中, 获得了适合工业化生产的碳源, 即以26g/L的糊化玉米淀粉和1%(v/v)乙醇为混合碳源, 过氧化氢酶的酶活达到了1996 u/mL, 比优化前提高了25%。在此基础上, 重点研究了发酵罐上的主要影响因素溶解氧对发酵的影响, 通过分段控制搅拌转速, 在52h将搅拌转速从200r/min提高到350r/min, 过氧化氢酶最高酶活达到4505 u/mL, 与不使用控制溶氧水平策略相比, 酶活力提高了2.4倍。此外, 还考察了该酶去除过氧化氢的效率, 并在实际纺织生产中进行了应用实验, 取得了良好的效果。

9. 期刊论文 [冷晒祥. 钱国砥. 华兆哲. 堵国成. 陈坚. LENG Shai-xiang. QIAN Guo-di. HUA Zhao-zhe. DU Guo-cheng.](#)

[CHEN Jian 过氧化氢酶的棉针织物漂染工艺研究 -印染2006, 32\(19\)](#)

氧漂后采用产自嗜热子囊菌的过氧化氢酶去除过氧化氢, 对其应用条件进行了研究, 得出的最优工艺条件为: 过氧化氢酶0.1~0.2g/L, pH值7.0~9.0, 温度55℃, 处理时间15 min。将该工艺与传统工艺作比较, 并进行大样试验, 结果表明, 在棉针织物预处理工艺中应用过氧化氢酶, 可以降低成本, 减少污染排放。

10. 学位论文 [曹翔宇 纺织用碱性耐热过氧化氢酶的工业化生产和应用研究](#) 2006

过氧化氢酶, 简称CAT, 存在于所有好氧微生物和动、植物细胞内, 可以快速有效地将H₂O₂分解为H₂O和O₂。目前已有过氧化氢酶产品用于织物漂白工艺中替代水洗和化学试剂还原法去除H₂O₂。同从动植物组织中提取相比, 经特定方法筛选得到的微生物合成的过氧化氢酶具有耐热和耐碱等优点。

本论文以嗜热子囊菌*Thermoascus aurantiacus* WSH03-01为出发菌株, 在实验室前期研究的结果上, 以中试生产为目的, 考察了以工业级原料的替代; 确定了合适的接种量和起始pH; 在考察金属元素对发酵产酶的影响时发现, 添加适合浓度的和Zn²⁺和碳酸钙对产酶有着较大的促进作用; 考察了乙醇的添加方式对产酶的影响; 将7L发酵罐发酵结果分别放大到1.5m³和5m³发酵罐规模, 获得了成功; 此外还将生产获得的过氧化氢酶在印染厂漂染车间进行了实际的生产应用, 验证了*Thermoascus aurantiacus* WSH03-01合成的过氧化氢酶去除漂白残余的过氧化氢的酶法工艺替代传统热漂工艺的潜力。主要研究内容如下:

(1) 在不影响菌体产酶水平的前提下, 发现可以用玉米淀粉替代英国胶作为发酵培养基中的碳源; 以(NH₄)₂SO₄部分替换种子和发酵培养基中的蛋白胨作为氮源, 优化后种子培养基中蛋白胨的用量可以减少40%, 发酵培养基中的用量可以减少20%。确定适宜的接种量为10%, 起始pH为8.0, 摇瓶产酶水平可以达到1845U/mL。

(2) 在摇瓶水平上考察发现向培养基中添加为0.1mmol/L的Zn²⁺和110g/L的CaCO₃, 产酶可以分别提高15%和20%。在7L发酵罐上考察了乙醇添加的方式, 从48h开始将1%的乙醇分六次平均加入可以替代原有匀速流加方式, 酶活达到3103U/mL。

(3) 在1.5m³发酵罐和5m³发酵罐上采用两阶段控制搅拌转速和补加乙醇的策略, 酶活在120h时过氧化氢酶达到了1594U/mL; 发酵在96h时过氧化氢酶酶活达到了2380U/mL, 总提取收率达到77%。

4) 在无锡天时针织有限责任公司的漂染车间进行了实际生产的应用试验, 结果表明该酶能在60℃、pH11的条件下, 在20分钟内将漂白液中剩余的过氧化氢完全去除。表明该酶在实际生产中有着良好的应用前景。

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_gyws200901009.aspx

授权使用: 浙江大学(wfzjdx), 授权号: ed671139-c404-4fe4-8249-9ea001284ee2

下载时间: 2011年3月8日