

广西大学

硕士学位论文

废纸浆漂白过程中过氧化氢的生物降解研究

姓名：陈元

申请学位级别：硕士

专业：制浆造纸工程

指导教师：覃程荣

20080610

废纸浆漂白过程中过氧化氢的生物降解研究

摘 要

废纸浆容易形成腐浆，腐浆里面生长的好氧微生物会产生催化 H_2O_2 分解的过氧化氢酶，从而降低过氧化氢的漂白效率。本文主要从生物酶对废纸浆过氧化氢漂白的影响进行研究，主要包括产过氧化氢酶菌株的筛选、菌种的部分鉴定、产酶特性分析、过氧化氢酶产生菌降解 H_2O_2 应用实验以及过氧化氢酶对废纸浆过氧化氢漂白的影响。

本实验从腐浆中分离筛选出三株高产过氧化氢酶的菌株，其中一株为产酶相对较高的真菌 C-1，经初步鉴定属于黑曲霉类 (*Aspergillus niger*)；另外两株为细菌 B-5 和 D-6，经初步鉴定，菌株 D-6 属于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)，而菌株 B-5 属于 *Bacillus* 属，与其 16S rDNA 序列相似性最高的菌株为 *Bacillus subtilis* Fs32b，*Bacillus subtilis* CICC10028 等，相似性均为 99%，其中产酶量最高的菌株是 *B. subtilis*.B-5，达到 1023.3 IU/ml。实验结果表明，菌株 B-5 的最佳生长条件：温度：42℃；pH：8.5；NaCl:4.0%。最佳产酶条件：时间：48h；温度：42℃；pH：8.0；NaCl:3.0~5.0%。

通过对产酶量最高的菌株 *B. subtilis*.B-5 所产过氧化氢酶酶学特性进行研究，可发现该酶最适反应温度为 45℃，在 60℃ 以下稳定性较好；最适 pH 值 9.0，在 pH6.0~9.0 有较好的稳定性；金属离子中 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 对酶有较弱的激活作用，而 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 则对酶有较强的抑制作用。

废纸浆过氧化氢漂白的生物降解试验表明，菌株 *B. subtilis*.B-5 对废纸

浆过氧化氢漂白产生一定的影响，使漂后浆白度降低了0.92%ISO，残余过氧化氢的量降低了0.58%。而该菌所产过氧化氢酶粗酶液对过氧化氢漂白产生的影响较大，导致漂后浆白度降低了1.36%ISO，残余过氧化氢的量降低了1.069%。

通过分析不同条件下过氧化氢酶对废纸浆漂白的影响，确定过氧化氢酶对废纸浆漂白结果影响最大的工艺条件为：浆浓:10%； H_2O_2 :2.0%； NaOH :0.3%； Na_2SiO_3 :3.0%； MgSO_4 :0.5%；EDTA:0.15%；酶用量：8.37 IU/g 绝干浆；温度:60℃；时间:1 小时。漂白过程中经过螯合后的漂后浆白度和残余过氧化氢的减少比未经螯合的要明显，这说明螯合剂控制了金属离子对过氧化氢的分解，同时还抑制了过氧化氢酶的部分活性。

关键词：废纸浆 过氧化氢漂白 菌种 过氧化氢酶 酶学特性 生物降解

STUDY ON BIODEGRADATION OF HYDROGEN PEROXIDE IN RECYCLED PULP BLEACHING

ABSTRACT

Aerobic microbes, which grew in slime pulp will produce catalase degrading H_2O_2 . It reduced bleaching efficiency of hydrogen peroxide. In this paper, the effect of biology enzyme on hydrogen peroxide bleaching of the waste-paper pulp was studied, mainly including screening of catalase-producing strains, partial identification of strains, analysis of enzymatic characteristic, application experiment of catalase-producing bacteria degrading H_2O_2 and effect of catalase on hydrogen peroxide bleaching of the waste-paper pulp.

Three high-yield catalase strains were isolated from slime pulp. One of them was relatively high yield of the fungus C-1, the preliminary identification belonged to *Aspergillus niger*; another two were bacteria B-5 and D-6, the D-6 strains belonged to *Bacillus subtilis*, the B-5 strains belonged to *Bacillus*. Its 16S rDNA sequence was closely related to *Bacillus subtilis* Fs32b, *Bacillus subtilis* CICC10028, et al. with similarity of 99%. The highest enzyme producing strain was *B. subtilis*. B-5, the amount of enzyme was 1023.3 IU / ml. The results showed that the optimal growth conditions of strain B-5 were: Temperature: 42°C; pH: 8.5; NaCl: 4.0%. and the optimal enzyme production conditions were: Time: 48 h; Temperature: 42 °C; pH: 8.0; NaCl :3.0~5 .0%.

The study of the enzyme properties of catalase showed that the optimum temperature and pH were 45°C and 9.0 respectively, the enzyme had a better stability below 60°C; and from 6.0 to 9.0 of pH; Fe^{3+} , Mn^{2+} could weakly activate enzyme ability, and Ca^{2+} , Fe^{2+} could strongly inhibit enzyme ability.

The biodegradation experiment showed that *B. subtilis*.B-5 had exerted certain influence on hydrogen peroxide bleaching of recycled pulp, brightness of peroxide bleached pulps and the concentration of residual H_2O_2 decreased by 0.92%ISO and 0.58% respectively. It was also showed that the rough enzyme solution of catalase which produced by *B. subtilis*.B-5 had a great impact on hydrogen peroxide bleaching, brightness of peroxide bleached pulps and the concentration of residual H_2O_2 decreased by 1.36%ISO and 1.069%.

Through studying the influences of catalase on recycled pulp bleaching under different conditions, it was found that the conditions which effected the bleaching results greatly were: pulp consistency 10%; H_2O_2 2.0%; NaOH 0.3%; Na_2SiO_3 3.0%; MgSO_4 0.5%; EDTA: 0.15%; enzyme charge 8.37 IU/g pulp; 60°C; 1h. The brightness of bleached pulps and residual H_2O_2 after chelating decreased more obviously than that of without chelating agents. It showed that the chelating agent controlled the decomposition of hydrogen peroxide by the metal ions and restrained the activity of CAT.

KEY WORDS: recycled pulp; hydrogen peroxide bleaching; strain; catalase; enzymatic characteristic; biodegradation

广西大学学位论文原创性声明和学位论文使用授权说明

学位论文原创性声明

本人声明：所呈交的学位论文是在导师指导下完成的，研究工作所取得的成果和相关知识产权属广西大学所有。除已注明部分外，论文中不包含其他人已经发表过的研究成果，也不包含本人为获得其它学位而使用过的内容。对本文的研究工作提供过重要帮助的个人和集体，均已在论文中明确说明并致谢。

论文作者签名：

陈元

2008年6月15日

学位论文使用授权说明

本人完全了解广西大学关于收集、保存、使用学位论文的规定，即：

本人保证不以其它单位为第一署名单位发表或使用本论文的研究内容；

按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本；

学校有权保留学位论文的印刷本和电子版，并提供目录检索与阅览服务；

学校可以采用影印、缩印、数字化或其它复制手段保存论文；

在不以赢利为目的的前提下，学校可以公布论文的部分或全部内容。

请选择发布时间：

☒ 即时发布

☐ 解密后发布

（保密论文需注明，并在解密后遵守此规定）

论文作者签名：

陈元

导师签名：

李程芳

2008年6月15日

第一章 绪论

1.1 废纸制浆的国内外研究现状

20世纪90年代以来,废纸制浆受到各国造纸界的普遍关注^[1]。1999年,全世界年产纸3026亿吨,共回收二次纤维1.37亿吨,回收率为当年纸和纸板消费量的43.69%,利用率为当年纸和纸板产量的44.24%。美国是从20世纪40年代就开始重视废纸的回收和利用,是二次纤维回用最多也是出口最多的国家。1999年全美国回收废纸4291.5万吨,回收率为当年纸和纸板消费量的45.34%;日本消费废纸3377万吨,有772.2万吨作为商品在国际市场上销售,2001年日本的废纸回用量占纸和纸板生产原料的58%。美国二次纤维利用率近年来发展很快,提出了废纸利用率要达到产纸量的50%,其中新闻纸达到60%~70%、印刷纸达到40%~50%、卫生纸要全部利用废纸为原料。除此之外,德国、荷兰、韩国等对废纸的年利用率要求都在纸产量的50%左右。

我国的二次纤维利用率随着造纸工业的发展而迅速上升。废纸浆用量从1995年的760万吨上升到2000年的1230万吨,占到全国纸浆总用量的41%。据统计2003年,我国废纸回收利用已达到1920万吨。为95年的2.53倍。2004年全国纸和纸板消费量已达到了5439万吨,纸和纸板年生产量为4950万吨,废纸浆量占总用浆量的40%,约2000多万吨,二次纤维的利用有了大幅度增长。预计2010年我国纸及纸制品的消费量将达到7600万吨~8000万吨、2020年将达到或超过1亿吨。如果按未来10年我国纸及纸制品回收率每年增长2%计,2015年我国纸及纸制品的回收量将达到4500~6000万吨。因此,废纸回收技术,将越来越受到关注与重视^[2]。

1.2 废纸再生的意义

随着我国造纸产量的提高以及国内原料结构的调整,废纸用量已越来越大,由于国内废纸原料非木材纤维含量较高,在纸张生产中难以提高产品质量。因此,国内不得不大量进口一些木材纤维含量较高,质量较好的废纸用于国内纸张生产。

我国是造纸大国,但又是造纸资源短缺,特别是森林资源不足的国家。造纸原料结

构中木浆比例低,大量的非木材纤维制浆又在一定程度上增加了环境污染。因此,废纸资源的利用,应引起我国政府及造纸企业的高度重视。其重要性和必要性主要表现在以下几方面。

首先,加大废纸资源的开发利用,可以变废为宝,节约纤维原料,解决我国木材纤维原料短缺制约造纸工业发展的矛盾。废纸的再生,国内外称之为“城市里的森林工程”,利用1t废纸,可以生产约0.8t 再生浆,可替代节约3~4m³的木材,减少了森林资源的消耗,可节省约1.2t 煤, 600kw·h 电, 100t 水,同时减少了有毒废物的排放。

国家在产业发展政策中,也明确提出要扩大国内外废纸的回收和利用,加强废纸再生中脱墨技术的研究和新技术、新装备的推广,提高废纸再生纸浆的比重。和发达国家相比,我国的废纸回收率比较低,且低于世界平均水平,因此,我国更应高度重视,采取有效措施,加大废纸资源回收利用的比重,这不仅是节约纤维原料的有效途径,同时也是降低纸张制造成本的重要措施^[3]。

其次,加大废纸资源的开发利用,可以大大减轻造纸工业对环境的污染。废纸处理过程中废水的污染负荷比化学制浆的污染负荷低得多,废水经处理后,可以达到我国现行排放标准的要求。由于废纸脱墨浆的污染负荷比化学浆有大幅度降低,废水治理难度及投资减小,为达标排放创造了条件。

此外,废纸资源的再生利用,具有投资较小、成本低、见效快、技术成熟等特点,容易在制浆造纸工厂很快实施。由于废纸制浆得率高,水、电、汽消耗降低,制造成本也相应降低,可替代部分化学浆,同时,回收废纸产品的使用范围宜日益扩展,有利于参与市场竞争。

1.3 废纸浆过氧化氢漂白

随着对含氯漂剂危害的认识不断提高以及环保要求的愈来愈严格,H₂O₂作为脱木素剂以代替CE段用于SP浆(亚硫酸盐浆)多段漂白首段已研究较多并已实现工业化。对KP浆(硫酸盐浆)来说,H₂O₂作为脱木素剂是1982年瑞典人进行首次研究的,在生产上的应用是1990年在瑞典Aspa Bruck进行的。过氧化氢(H₂O₂)漂白具有无污染、白度稳定性好和纸浆得率高等优点。尤其适用于高得率浆的漂白。过氧化氢是一种含氧漂剂,在无氯漂白中具有十分重要的作用。

过氧化氢在纸浆漂白中的作用主要是改变木素中有色基团的结构,使之变成无色基

团,并在一定程度上使之溶出。所以过氧化氢被广泛地用于机械浆的漂白,而对于要求木素尽可能溶出的化学浆漂白,过氧化氢多用于终段,来最后改变各种发色基团的结构,以稳定纸浆白度。 H_2O_2 是非挥发性水溶液,起漂白作用的主要是氢过氧阴离子(HOO^-)的亲核作用,所以在过氧化氢漂白中,应保证足够的 HOO^- 浓度,减少过氧化氢的无效分解,其工艺参数的控制尤为重要。

废纸浆的漂白主要包括氧化漂白和还原漂白。还原漂白即保留木素式漂白,氧化漂白即脱除木素式漂白。近年来,在纸浆的漂白研究中,DBI(Direct Bona Intensity)漂白、酶法漂白、电化学漂白等也逐渐受到研究者的关注。

H_2O_2 最初应用于废纸浆漂白是为了补偿机械木浆在碱性条件下碎浆时的返黄。20 世纪 80 年代,由于造纸中二次纤维的比重显著增加, H_2O_2 漂白工艺也得到了迅速发展。高浓 H_2O_2 漂白是目前的发展趋势之一。在温度高达 100°C 时, H_2O_2 可以有效地漂白废纸浆。高温不仅不会损伤纤维,还可以提高 H_2O_2 的利用率。

1.4 过氧化氢酶

1.4.1 过氧化氢酶的发展史

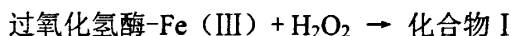
过氧化氢酶(Catalase,CAT,EC1.11.1.6)^[4]研究可追溯到19世纪初,Thenard (1811)首先发现过氧化氢(H_2O_2)可以被动物、植物组织分解产生氧气,Schonbein (1863)认为是某种酶在起作用。1901年,Loew将该酶命名为过氧化氢酶(Hydrogen Peroxidase),又称触酶(Catalase,简称CAT)^[5]。Stern(1936)证明卟啉环是CAT活性中心,其后Sumner等(1937)得到了牛肝CAT结晶,Herbert and Pinsent (1948)则从藤黄微球菌(*M.luteus*)获得了原核CAT。随后大量研究发现CAT广泛存在于动物、植物和微生物中,动物肝脏、红细胞、植物叶绿体以及细菌、真菌、放线菌等中含有大量CAT。迄今CAT已经成为农业,以及与之相关的食品与乳制品业、纸浆和造纸业、以及农业环保产业中有应用价值的酶之一。

1.4.2 过氧化氢酶与过氧化物酶

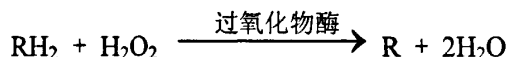
过氧化物酶和过氧化氢酶都是两种广泛存在于动植物体内,含血红素(铁卟啉)辅基的氧化还原酶。但由于它们作用的底物都有过氧化氢,容易将它们混淆。

过氧化氢酶(Hydrogen Peroxidase),又称触酶(Catalase,CAT),其系统名称是:

$\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ 氧化还原酶。国际酶学委员会编号为EC1.11.1.6, 其催化反应简示如下:



过氧化物酶(Peroxidase)也有人简称过氧化酶, 其系统名称是: 供体:过氧化氢氧化还原酶。国际酶学委员会编号为EC1.11.1.7, 其催化反应式为:



从两种酶的反应式可以看出, 触酶只有一种底物, 反应生成水和氧气; 而过氧化物酶则要两种底物, 其反应的实质是: 酶催化共体脱氢(氧化), 同时催化脱下的氢使 H_2O_2 还原为 H_2O 。在这个反应中, 如果只有 H_2O_2 , 没有供体, 反应则不能进行。

1.4.3 过氧化氢酶的类型划分

早期按来源不同把CAT划分为真核CAT和原核CAT。真核CAT主要来源于动植物组织中, 其中哺乳动物组织中CAT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, CAT主要与细胞器, 如线粒体和过氧化物酶体结合形式存在, 而在红细胞中则以可溶状态存在。原核CAT主要来源于微生物, 研究发现, 几乎所有需氧微生物中存在CAT, 只有少数好氧菌, 如过氧化醋杆菌(*A. peroxydas*)不存在CAT^[6]。绝大多数厌氧微生物体内不存在过氧化氢酶, 但也有少数厌氧细菌如谢氏丙酸杆菌(*Propionibacterium shermanji*)和巨大脱硫弧菌(*Desulfovibrio gigas*)体内发现存在过氧化氢酶^[7]。

1989年, Goldbergand Hoehman按照不同理化特性, 将CAT划分为典型性(typical)、非典型性(atypical)、CAT—过氧化物酶(catalase—peroxidases, CAT—POD), 通常认为这也是种符合进化关系的划分。按催化中心结构差异可分为两类, (1)含铁叶琳结构CAT, 又称铁叶琳酶, 典型性CAT和CAT—POD属于此类; (2)含锰离子代替铁的叶琳结构, 又称为锰过氧化氢酶(MnCat)^[8], 非典型性CAT属于此类。

1.4.4 CAT 的结构特点及其催化 H_2O_2 分解机理

1.4.4.1 典型CAT

典型CAT, 又称单功能血红素CAT, 几乎存在于所有需要呼吸组织, 包括真核生物和原核生物。大部分典型CAT尽管来源不同, 但在结构上具有高度相似性。它们都是由4个具有相同多肽链的亚基组成, 每个亚基含有一个血红素辅基作为活性位点, 该辅基

的形式为铁卟啉,一个分子中含有四个铁原子,其作用基团是血红素,相对分子量一般为200~340kD^[9]。跨越4个结构域,典型性CAT大约70~460个氨基酸残基。目前几种获得晶体结构的CAT分别来自牛肝(BLC)、微紫青酶(P. vitale)、溶壁微球菌(M.lysodeikticus)、奇异变形菌(P.mirabills)、大肠杆菌(E.coli, HP11)、啤酒酵母(S.cerevisiae, CATA)、人体红血球(HEC)^[10]。晶体结构的数据表明,非同源CAT亚基结构有很大相似性,如在水溶液中,黑曲霉CAT和牛肝CAT的二级结构含量基本一致^[11]。

天然典型性CAT催化H₂O₂反应机理是活性位点处于高度自旋Fe³⁺状态,它可以在H₂O₂的2-电子氧化下形成复合物I,在此过程中铁原子失去一电子从而与H₂O₂的氧原子形成氧代铁部分,卟啉环失去另一电子形成[π]-阳离子基,然后复合物I又在另一分子的H₂O₂的2-电子还原下转变成天然的状态,即Fe³⁺状态,从而完成一个催化循环。

1.4.4.2 CAT—POD

该类CAT广泛存在于动、植物组织中,原核生物仅在真菌中有发现。可以说CAT—POD在自然界中是典型性CAT的衍生物,是CAT同POD产生的可逆聚合体。他们的分子量大约为120~340kD,通常该酶属于同型二聚体,也有一部分属于四聚体。同典型性CAT相比,CAT—POD具有更为庞大的结构单元,它包含至少700个氨基酸残基。

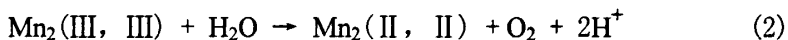
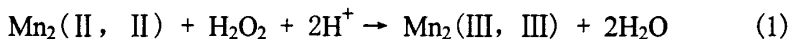
CAT—POD的典型特点是具有两种不同催化行为。由于同样含有铁血红素结构,所以具有同典型性CAT相同催化功能,不同于典型性CAT的是CAT—POD催化能力要低1个数量级,在生物体中,这种差别几乎可以忽略不计。CAT—POD对于有机组织中过氧化反应具有更宽底物范围。典型性CAT对pH变化敏感,与之相比,CAT—POD对于温度、pH、H₂O₂含量变化表现更为敏感。对于典型CAT抑制剂3-氨基1,2,4-三唑(AT),CAT—POD不受抑制,仅血红素铁发生暂时性变化^[12]。

1.4.4.3 非典型性CAT

目前从生物体内发现的非典型性CAT(MnCAT)非常少,Beyer等(1985)及Barynin等(1986,1997)分别从乳酸菌和嗜热生物组织中获得^[9]。通过电子光谱与电子自旋共振(ESR)谱证实MnCAT中含有2个紧邻锰离子,存在混合价态物种Mn₂(II,III)和Mn₂(III,IV),还原态物种显示弱的反铁磁性偶合,而氧化态物种Mn₂(III,IV)显示较强反铁磁性偶合,截至目前,已知MnCat有四种物种:(II,II)、(II,III)、(III,III)、(III,IV),其中只有Mn₂(II,II)和Mn₂(III,III)物种显示了极高的催化歧化效率,而活性MnCAT用NH₂OH和H₂O₂处理后则失活,认为是形成了非催化活性物种Mn₂(II,III)和Mn₂(III,IV)。

Dismukes 通过 MnCAT 提出一个可能, 催化反应机理酶中某一氨基酸残基作为质子受体使底物 H_2O_2 离解出一个质子, 然后取代一分子水, 键合在一个 $\text{Mn}(\text{II})$ 上, 形成端配物 B, 该质子以后又被释放, 形成产物水 ($\text{A} \rightarrow \text{B}$), 端配物 B 摆动形成桥配物 C, 过氧基 ($\square\text{OOH}$) 从还原态活化到氧化态 ($\text{B} \rightarrow \text{C}$), 促使底物还原为 H_2O 和 $\mu\text{-O}(\text{C} \rightarrow \text{D})$, 以下机理尚不清楚, 但已知在单 $\mu\text{-O}$ 桥双核锰模型配合物中, 借助质子化作用, $\mu\text{-O}$ 桥易于与 H_2O^{18} 交换, 故提出: $\mu\text{-O}$ 质子化, 桥断裂, 第二个底物 H_2O_2 键合在一个 $\text{Mn}(\text{III})$ 上 ($\text{D} \rightarrow \text{E}$), 分子内双电子从过氧化物转移到 2 个 $\text{Mn}(\text{III})$ 上, 使之还原, 同时质子转移到 OH 基上, 产生 O_2 , 生成还原态水合配合物 ($\text{E} \rightarrow \text{A}$)^[13]。

Meier 等提出另一种催化反应机理, 即反应通过在 $\{\text{Mn}_2(\text{II}, \text{II})(\mu\text{-OH})_2\}$ 和 $\{\text{Mn}_2(\text{III}, \text{III})(\mu\text{-O})_2\}$ 之间交替循环进行。在一个催化循环中, Mn 离子经历了氧化和还原反应, 它在同价 $\text{Mn}_2(\text{II}, \text{II})$ 和 $\text{Mn}_2(\text{III}, \text{III})$ 形式之间变化, 同时将一分子 H_2O_2 氧化或还原, 其反应可以用下面两个方程式表^[14]:



1.4.5 CAT 生理功能和环境胁迫的关系

CAT 作为生物体内重要物质, 具有非常重要的生理功能, 其中最为主要的就是参与活性氧代谢过程。氧分子对生物体是无毒性的, 一旦氧分子的电子分布发生改变, 就变成活性氧。活性氧的种类包括 H_2O_2 , 羟自由基 ($\text{OH}\cdot$)、超氧阴离子 ($\text{O}_2\cdot^-$) 3 种。在活氧代谢过程中, CAT 可以使 H_2O_2 发生歧化生成水和氧分子, 发挥了重要作用^[15]。

在环境胁迫等逆境情况下, 生物体内广泛存在活性氧爆发现象, 导致自由基增多, 使细胞膜产生过氧化, 导致细胞膜的破坏和损伤。CAT 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, 在清除超氧自由基、 H_2O_2 和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成等方面发挥重要作用。据国外资料报导, 动、植物体内 CAT 对多种环境因子均有明显的生态效应 (紫外光, 二氧化硫; 氮氧化物, 氨气以及重金属等等)。其研究成果的应用价值在于抗毒、防癌及环境生物学监测等诸多方面。多种环境因子对生物生理生化过程的影响, 可以通过生物体内 CAT 表现出来。

1.4.6 CAT 在纸浆和造纸工业中的应用

在纸浆和造纸工业上,由于传统的含氯漂白剂与浆中残余木素反应产生氯酚类化合物等毒性污染物质,尤其是在漂白废水中发现剧毒二苯并二恶英PCDDs、氯代二苯并呋喃PCDF类物质后,世界各国相继采取措施,禁止在纸浆和造纸工业上采用含氯漂白剂,因此近年世界造纸行业相继以 H_2O_2 漂白来代替传统漂白方法传统上用 SO_2 和亚硫酸氢钠去除漂白后的 H_2O_2 ,随着世界各国对环境和安全问题考虑,促进了寻找替代 SO_2 和亚硫酸氢钠去除 H_2O_2 方法研究,有研究表明CAT,尤其是微球菌产生CAT可在10min内将 H_2O_2 完全降解。

1.4.7 在环保方面上的应用

发达国家环保行业主要采用 H_2O_2 处理各种工业废水,而中国环保行业则刚刚起步,只有少数企业使用 H_2O_2 处理工业废水,而CAT可以取代化学试剂降解生产 H_2O_2 的工厂或在使用过程中使用 H_2O_2 的工厂排除的工业废水中所含有的 H_2O_2 。利用 H_2O_2 和CAT处理工业废水,可以降解芳环化合物和脂族化合物。利用 H_2O_2 和CAT处理生物过滤器,还可提高其对废水脱臭效果。

1.5 废纸再生的微生物问题

1.5.1 腐浆

腐浆的形成与组成决定于污染物的起源,也决定于腐浆的起始机理和微生物随后的生长条件。腐浆形成的污染物来源是^[16]:

- 在使用前未经任何处理的纸厂供水,特别是河水(地表水)带来微生物。
- 回用废纸带来微生物。
- 生产过程的断纸和切纸边带来微生物。
- 纸厂不同部分的回用水带来微生物。
- 纸厂环境带来微生物。
- 污染了的化学品带来微生物。

腐浆的组成通常由纸厂中存在的细菌、真菌、藻类和原生动物等微生物组织根据环境(物理的和营养物的)和微生物因素间微妙的平衡进行测定。腐浆的形成过程很复杂,

据报道^[17], 腐浆中除包含有细小纤维、填料颗粒和单细胞细菌外, 主要为多细胞有粘质鞘的丝状体, 其形状与伯杰氏手册中记叙的浮动球衣细菌的形态一致。而其它单细胞类型细菌的发现, 无论种类和数量, 都无规律性。在高速流动的浆料流经的光滑器壁上, 腐浆的生成过程是首先为具有粘性外鞘(多糖)的球衣细菌粘附于器壁上。不断生长形成多细胞丝状菌胶团, 继之为细小纤维和填料的附着而增大体积, 这又为其它单细胞细菌的大量生长创造了条件, 而导致腐浆的形成。

某些作者则将造纸工业存在的微生物分为两大类^[18]: 原生腐浆和再生腐浆(primary and secondary slimes)微生物。原生腐浆微生物靠它们自己产生腐浆, 并听任再生微生物群体生长。原生腐浆群体包括细菌, 如肠杆菌凝聚素(*Enterobacter agglomerans*)或铜绿色假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和酵母菌, 如粘性红圆酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)。菌种硫酸盐还原菌(*Sulphate-reducing bacteria*, 简写为SRB)和青霉菌(*Penicillium*)则属于再生腐浆微生物菌种。

有报告称在工业环境中形成腐浆的微生物种类通常有: 快速成长的细菌, 如球衣细菌(*Sphaerotilus*)、钩端颤体菌(*Leptothrix*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)和棒麦角杆菌(*Clavibacter*)等。但是, 也常发现其他细菌, 如铜绿色假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、节杆菌(*Arthrobacter*)、产碱杆菌(*Alcaligenes*)、好气细菌(*Aerobacter*)、变形杆菌(*Proteus*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)等, 另外还有真菌如黑曲霉属(*Aspergillus*)、头孢霉属(*Cephalosporium*)和青霉菌(*Penicillium*)等^[19]。

现今, 生物膜作为动态系统进行着非常重要的变化。例如在腐浆的底部, 厌氧微生物条件的出现; 在接近表面, 厌氧菌种像硫酸盐还原菌(SRB)如脱硫弧菌(*Desulfovibrio*)、脱硫斑菌(*Desulfotomaculum*)等将会生长。微生物的这种变化, 除了沉积问题外, 也会造成微生物诱发性腐蚀(MIC), 产生恶性气味和纸页斑点等。

在废纸回用厂控制腐浆问题的良好策略基础是对纸厂存在的微生物群(microflora)的了解与知识。但是系统的复杂性使之很难在传统分析技术时得到深入的知识。因此基于新的高深技术补充传统技术的详细研究已经开展了。流动细胞测定法(flow cytometry, 简写为FCM)或共焦点激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscopy, 简写为CLSM)是分析工具的例子, 这些工具在将来是很有用的。

1.5.2 废纸回用的其他微生物有关问题

纸厂微生物根源产生的讨厌气体是由于厌氧菌代谢作用功能造成的,这些厌氧菌是SRB、甲烷生成菌或来自梭状芽孢杆菌类(*Clostridium genera*)的细菌纸厂产生的臭气中最重要化合物是挥发性脂肪酸如醋酸、丙酸和丁酸。其他微生物根源的有恶臭的化合物是 H_2S ,是SRB作为代谢作用功能的结果而产生的讨厌气体造成的其他问题是由于这些气体集中在通风不良的地方而造成爆炸的危险。这种气体的集中通常是由于纸机停机造成的,Rowbottom的研究指出,在纸板厂和纸厂的爆炸是由于在缺氧条件下某些菌种会产生氢气而造成的。这些菌种是梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)、真细菌(*Eubacterium*)和梭菌(*Fusobaetorium*)等^[20],甲烷产生菌产生的甲烷是另一种产生爆炸的气体^[21]。

1.6 腐浆中产过氧化氢酶的微生物对过氧化氢漂白的影

腐浆的生成与菌源、营养源含量、温度、pH值关系很大。经研究发现,在酸性造纸系统中,霉菌的生长比细菌迅速;而在碱性造纸系统中,细菌的生长比霉菌要快。在适宜的温度和酸碱度环境中,这些微生物借助纤维悬浮液中碳水化合物的六碳糖与五碳糖,各种添加助剂如淀粉、填料和胶料等丰富的营养物质,在纸料中大量生产繁殖。随着白水封闭循环程度的提高,细菌在白水系统中的积累增多,并且工厂的水温适合细菌的生长。在使用 H_2O_2 时,会有残余 H_2O_2 留在白水中。通常残余 H_2O_2 的量为0.1%~0.3%(对绝干浆),对细菌来说,这些残余 H_2O_2 是温和的杀菌剂。为了保护自身的生存,在过氧化氢的刺激下,这些细菌会产生大量的过氧化氢酶(Catalase)来分解 H_2O_2 ,过氧化氢酶是由好氧微生物为了保护自身对付在它们代谢作用中过氧化氢对它们的有害影响而产生的酶。过氧化氢酶分解过氧化氢时会产生的很多氧气,在有氧的条件下又促进了系统中好氧微生物的繁殖,而这些好氧微生物的繁殖生长必然会产生更多的过氧化氢酶。过氧化氢酶分解 H_2O_2 ,会导致浆料白度下降, H_2O_2 消耗增加;要维持白度的稳定就要增加 H_2O_2 用量,而增加的 H_2O_2 会导致细菌产生更多的过氧化氢酶^[22-24],这样的循环形成后, H_2O_2 的漂白效率会大大降低。

1.7 废纸浆中过氧化氢酶的存在形式及检测

1.7.1 过氧化氢酶的产生及存在形式

过氧化氢酶属于好氧型微生物,产生于所有的好氧生物细胞。好氧生物体通过产生酶来保护自己,以抵御在呼吸过程中由生物化学反应产生的 H_2O_2 ^[25]。 H_2O_2 是新陈代谢的副产品,但对生物体有毒性,因此生物体为了抵御 H_2O_2 的产生,自身产生过氧化氢酶来分解 H_2O_2 ,即 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ 。过氧化氢酶分解 H_2O_2 是细胞正常新陈代谢的一部分^[22,24],但如果这些微生物受到外界 H_2O_2 的激发,则会加快过氧化氢酶的产生,即使非常少量的微生物也会产生大量的过氧化氢酶。过氧化氢酶在酸性和碱性条件下都有较强的活性,其活性pH值范围是3~11^[22]。

酶是天然的催化剂,它们在反应时自身不消耗,每个酶分子每秒钟就可以催化大量的反应。过氧化氢酶是已知酶中催化速度最快的,分解速率每秒钟可达 $(1\sim40)\times10^6$ 个分子^[22,24,26]。

过氧化氢酶分子以几种形式存在,从单一的单体到六聚体单元的组合,但在脱墨废水中最常见的是二聚物类型。

过氧化氢酶在废纸脱墨过程水中的存在形式主要有:①游离的过氧化氢酶分子;②生物体内游离的过氧化氢酶细胞;③生物膜上的过氧化氢酶分子,通常附着于设备上。游离的过氧化氢酶分子的破坏性最大,因为它们接触 H_2O_2 的机会更多。存在于生物体内和生物膜上的过氧化氢酶分子比较容易除去,比如停机时用热水冲洗或者残余 H_2O_2 能够除去这些过氧化氢酶^[27]。

1.7.2 过氧化氢酶的检测

可通过检测细菌含量、过氧化氢酶含量或过氧化氢酶的活性来检测过氧化氢酶的量。

1.7.2.1 细菌含量的检测

1.7.2.1.1 好氧菌含量

测定好氧菌含量是检测过氧化氢酶量的一种方法,其原理是细菌量少,过氧化氢酶产生的量也少。使用最广泛的方法是用计数盘来计数细菌的量。样品在一个营养罐制成的盘上生长,进行一系列稀释以保证每个盘上要有30~300个可见的菌落,计算所有的

菌落数就可以得到一个计数,即为菌落总数(CFU / mL)。这个方法的主要缺点是细菌至少要培养36h,以允许菌落生长到可见的大小,测试要在2天以后才能进行,不能在线测定。如果现场没有微生物检测设备,需要将样品拿到外面的实验室测定,在运送样品的过程中微生物含量有可能会发生变化^[22,25]。因此这种方法受时间和检测设备的限制,不能快速得到结果。

1.7.2.1.2 ATP测试

为了克服培养时间的限制,普遍采用ATP(Adenosina Tri-phosphate,即三磷酸腺苷)测试。ATP是生物体的能量分子,ATP含量可以作为系统中微生物含量的指示。这个方法的优点是可以立即得到结果,这就意味着测试完成后,可以及时地调整工艺或使用化学品控制过氧化氢酶的量。

1.7.2.2 过氧化氢酶含量的检测

1.7.2.2.1 HMB法

HMB法是一种快速测定过氧化物酶含量的方法,检测板放置在水中一定时间后取出,不要接触检测板的表面,将其放在检测试管中,试管中装有一定量的稀释液和反应物。向试管中滴加10滴HMB 50R试剂(HMB 50R是一种强氧化剂),放置15min,然后将试管放在HMB测定仪中读取数据。该方法可用于工厂中直接测量过氧化氢酶的量。

1.7.2.2.2 漂浮测试

漂浮测试是实验室过氧化氢酶快速测定方法。分别将2份水样放入2个烧杯中,一个水样煮沸5min以除去水样中的过氧化氢酶,作为对照,用2cm×2cm的吸水纸浸入质量分数为30%的H₂O₂溶液,然后将其放入另份水样烧杯,吸水纸会沉入杯底。如果H₂O₂被分解,会形成氧气泡,浮在吸水纸的表面。如果吸水纸的漂浮时间不超过15min,可以认为过氧化氢酶含量不会影响生产。记录吸水纸的漂浮时间,绘制出一个趋势图,生产过程中参考此图可以确定过程水中的过氧化氢酶含量是否影响生产。

1.7.2.2.3 氧气量的测试

将工厂过程水的水样或过滤后的浆样放在培养皿的盖子上,滴入几滴质量分数为30%的H₂O₂溶液,将培养皿翻转并用力压在样品上,可用肉眼观察到有气泡产生,这些气泡是由于H₂O₂分解产生的O₂所形成的,即 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ 。用氧电极来测定系统中O₂的产生量,以O₂的量来指示过氧化氢酶的含量。

1.7.2.3 过氧化氢酶活性的测定

按照文献^[25]的方法确定过氧化氢酶的活性,准备25mL的样品,加入0.25 mmol的

H₂O₂溶液, 在室温(25~28℃)下培养1h。停止反应, 加入5mL的H₂SO₄, 残余H₂O₂用0.1mol/L的KT滴定, 过氧化氢酶的活性可以表示为分解的H₂O₂量(mmol/(h·100mL))。

1.8 微生物过氧化氢酶的控制方法

有2种控制过氧化氢酶的方法可供选择: 直接消除过氧化氢酶或消除细菌源阻止过氧化氢酶的形成。消除过氧化氢酶对漂白产生快速效应, 而消除细菌源需要等待白水系统循环一段时间, 以冲洗掉残余的H₂O₂。

1.8.1 提高过程水的温度控制

在欧洲某工厂, 消除过氧化氢酶的方法是使水温超过70℃运行10min以上, 但这种方法只有在停机时才可行。该方法没有在工厂大规模推广, 主要原因是受蒸汽的限制以及考虑到温度对胶黏物的影响, 高温会软化胶黏物, 使其通过筛子而对生产产生不利影响。另一个提高过程水温度的方法是合理利用系统中内循环的白水。目前浮选脱墨工艺流程中的循环水主要由两大循环构成, 第一循环是从碎浆到前浮选结束后的浓缩, 第二个循环是从漂白到后浮选结束后的浓缩。由于第二循环系统经过高温热分散(85~100℃)处理后, 细菌和过氧化氢酶基本被杀死, 因此在第二循环系统中, 过氧化氢酶对H₂O₂漂白效率的影响较小^[28]。这个方法在工厂已有应用, 能够有效地抑制过氧化氢酶的产生。

1.8.2 增加 H₂O₂ 用量控制

H₂O₂在高用量(5kgH₂O₂/t 白水)时是杀菌剂, 在载有过氧化氢酶的培养皿上加入用量为1.5%的H₂O₂, 很容易就能将过氧化氢酶除去。增加H₂O₂用量的方法很简单, 但成本高、效率低^[23,29]。

1.8.3 过醋酸法控制

过醋酸是一种强力的杀菌剂和氧化剂, 在其他行业已使用多年, 实验室的研究也表明它能够去除过氧化氢酶和细菌, 用量为200~400s/t。用于其他行业时, 在10~20g/t的用量范围内就可以除去所有的细菌。对于这种解决方案, 白水不得不全部排除, 注入含有一定量过醋酸的水来消除过氧化氢酶。

1.8.4 杀菌剂控制

杀菌剂可以通过控制细菌的数量从而减少过氧化氢酶含量。杀菌剂可以分为无机和有机两类。无机的产品包括次氯酸盐、过醋酸、溴化钠甚至 H_2O_2 本身等，所有这些杀菌剂都是氧化剂，它们会降低过氧化氢酶的活性，从而降低细菌数量。还有许多有机杀菌剂，已成功地用在工厂中以降低细菌数量，阻止过氧化氢酶的产生。杀菌剂应加在系统中细菌和过氧化氢酶活性较强的区域，推荐控制化学品加入点在过程水中而不是浆料中，多数情况下，进入碎浆机的过程水的贮槽或贮罐是加入控制化学品的较佳点^[22,30,31]。

任何已知杀菌剂对腐浆沉积物的杀菌效率，通常是低于用于浮游生物中类似微生物群体的杀菌效率。生物膜对杀菌作用的抵抗机理还不是完全清楚，但是，它们确实是与杀菌剂在生物膜内侧的扩散限制是有关系的^[32]。杀菌剂能与腐浆沉积物中的非微生物组分反应，因此就降低了抗微生物的作用，特别是这些反应的发展快于扩散过程时，将拒绝杀菌剂接近生物膜的内层，因此产生了杀菌剂浓度梯度，腐浆表面将经受杀菌剂作用，但其内层可能是暴露在无害的杀菌剂浓度之下。造纸工作者需要找到以前用过的杀菌剂的替代品，因此，杀菌剂供应者开发了新的产品作为代替物。总之，造纸工业杀菌剂的应用将是增加的，因为这些是控制有害微生物最有效和经济的方法，绝大多数已经证实了的杀菌剂也是相对环境友好的替代，因为它们在离开纸厂成为废水以前能降解为无害的成分。它们与其他沉积物控制法用的替代物的一致性也将需要保证纸机良好的运行和良好的纸张质量。

1.8.5 分散剂控制

在腐浆杀菌剂控制受到限制时，新的控制方法开发了。例如，为了减少沉积物控制系统的毒性，应用分散剂以增加杀菌剂有效性已经成为很普通的了。在造纸系统，分散剂的活性还了解得很少，部分是由于缺乏甄别的方法以获得有关它们效率的知识，而且关于它们对微生物的长时间的影响也知道得很少。分散剂和杀菌剂作为适于沉积物控制系统的化合物是决定于分子类型的。非离子型分散剂能抑制和减少微生物沉积的形成；其他的分散剂，如木素磺酸盐，在抄纸条件下不是很有效的，并能强化微生物的生长，这是由于木素磺酸盐还带来了可作为微生物营养物的糖类。作为一个成果，合成分散剂已经应用于造纸工业，因为它们的特性在合成时就限定了，这样就避免了不必要的影响。阴离子型、阳离子型和非离子型三种类型的分散剂都可考虑作为工业应用产品。

1.8.6 酶控制

控制腐浆生长的另外方法是酶处理。酶处理被认为是在造纸操作条件下很有效的控制方法,酶直接攻击生物膜的结构,加入10%正常剂量的杀菌剂则能增加酶处理的效果,这是由于配合效果的结果。

根据控制目标,很多酶都可以应用。从理论观点看,酶降解微生物细胞壁是有用的,例如,促使溶解的葡聚糖酶(glucanases)和蛋白酶(proteases)。其他的机理是氧化性生物杀菌活性不利于微生物细胞,如葡萄糖氧化酶与乳酸过氧化物酶结合的系统指出对细菌模式生物膜有很好的杀菌活性^[33]。

当纸厂腐浆沉积物的主要组分是微生物聚糖和蛋白质时,酶降解微生物聚糖对破坏生物膜母体的形成和完整是有效的,因此,它将是沉积控制的重要工具。

1.9 论文选题的研究目的和意义

近年来,回用旧报纸(ONP)和旧杂志纸(OMG)生产新闻纸有了很大的增长。多数情况下旧报纸和旧杂志纸的制浆是在碱性条件下进行的,其优点是能够润胀纤维、有助于脱墨,但缺点是纤维会发生碱变黑。为了解决这一问题,通常使用 H_2O_2 作为漂白剂^[22]。而随着人们环保意识的增强和各国制定的环保法规日趋严格,使用无元素氯(ECF)和全无氯(TCF)漂白纸浆已成为造纸工业发展的必然趋势。所以 H_2O_2 作为一种含氧漂剂在无氯漂白工艺中将被大量使用。 H_2O_2 漂白具有漂浆白度稳定性好,强度高,漂白废水中不含有毒性的氯化物,对设备的腐蚀性小等优点。但是在 H_2O_2 漂白过程中,废纸浆的漂白效率较低,循环用水以及浆中存在的微生物产生的酶会加快 H_2O_2 发生无效分解,导致 H_2O_2 漂白效率降低,增加漂白成本。

本论文主要通过分离纯化腐浆中微生物,寻找出能产生降解 H_2O_2 的酶的微生物,研究其所含的酶以及其酶学性质;然后进行过氧化氢酶产生菌降解 H_2O_2 的应用实验,并通过研究过氧化氢酶对废纸浆过氧化氢漂白结果的影响,了解生物酶对 H_2O_2 漂白的影响规律。从而更好的在废纸浆过氧化氢漂白中指导实践,提高漂白效率。

第二章 腐浆过氧化氢酶产生菌的筛选及其产酶特性研究

经研究发现,几乎所有需氧微生物中都存在过氧化氢酶(Catalase)。过氧化氢酶是由好氧微生物为了保护自身对付在它们代谢作用中过氧化氢对它们的有害影响而产生的酶。过氧化氢酶作为一种高效生物催化剂,自1950年就开始广泛应用于生物、医药、临床和食品中的某些分析测定;在食品和乳制品工业、纺织工业、制浆和造纸工业、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^[34,35]。

在废纸浆过氧化氢漂白过程中,废纸浆容易产生腐浆,其中生长着大量的好氧微生物。据报道,在酸性造纸系统中,霉菌的生长比细菌迅速;而在碱性造纸系统中,细菌的生长比霉菌要快。在适宜的温度和酸碱度环境中,这些微生物借助纤维悬浮液中碳水化合物化合物的六碳糖与五碳糖,各种添加助剂如淀粉、填料和胶料等丰富的营养物质,在纸料中大量生产繁殖。如果这些微生物受到 H_2O_2 的刺激作用,会产生大量的过氧化氢酶,从而导致废纸浆过氧化氢漂白过程中过氧化氢的无效分解,使得漂白效率降低。许多学者对不同来源的微生物提取过氧化氢酶的研究已经有很多报道^[36,37,38],但是对腐浆中微生物产生的过氧化氢酶影响废纸浆漂白的研究却并不多见。

本实验从腐浆中分离筛选出三株高产过氧化氢酶的菌株,包括黑曲霉 *Aspergillus niger*.C-1, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*.B-5, *Bacillus subtilis*.D-6, 并对其产酶条件和酶学特性进行了研究。

2.1 实验材料与方法

2.1.1 实验材料

2.1.1.1 废纸浆

废纸浆由广州造纸厂提供,用无菌样品袋带回实验室4℃保存备用。

2.1.1.2 腐浆培养

在废纸浆中加入活性污泥,调pH7.0,在35℃、湿度80%条件下培养2~3个星期,制得腐浆。

2.1.1.3 培养基

2.1.1.3.1 筛选培养基

A、细菌培养基(g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, pH 7.2~7.4

B、改进型 Czapek 培养基(g/L): 蔗糖 20, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $NaNO_3$ 2, KCl 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, 琼脂 20, pH 自然

C、PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20, pH 自然。

D、筛选培养基(g/L): 淀粉 10, 蔗糖 20, 蛋白胨 10, KH_2PO_4 1, $FeSO_4$ 0.05, KNO_3 0.5, NaCl 5, 琼脂 20, pH 自然

外源 H_2O_2 : 用细菌过滤器过滤, 按试验需要量添加至筛选培养基中。

2.1.1.3.2 摇瓶发酵培养基

摇瓶发酵培养基 A(g/L): 淀粉 10, 蔗糖 20, 蛋白胨 10, KH_2PO_4 1, KNO_3 0.5, NaCl 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.5, pH 自然

摇瓶发酵培养基 B(g/L): 葡萄糖 15, 蛋白胨 10, $NaNO_3$ 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, Na_2HPO_4 9.52, KH_2PO_4 0.907, pH 7.5

注:**以上液体培养基, 配制好后在 0.1MPa, 121℃下灭菌 30min, 备用。

以上固体培养基, 配制好后在 0.1MPa, 121℃下灭菌 30min, 冷却至 60℃左右, 倒平板, 置于实验台上过夜, 若无感染现象就保存备用。

2.1.1.4 主要仪器及试剂

分光光度计: 8453 UV-Vis spectrophotometer (美国安捷伦公司)

超声波细胞粉碎机: Ultrasonic Processor (宁波新芝生物科技股份有限公司)

离心机: Beckman Model J2-21 Centrifuge

台式全温振荡器: HZQ-Q (中国哈尔滨东联电子技术开发有限公司)

电热恒温恒湿培养箱: PYX-250H-C (上海市科力仪器厂)

电热恒温干燥箱: DF 206 (北京西城区医疗器械二厂)

电子天平: Mettler Toledo AB204 及 Mettler PM2000

pH 计: Denver Instrument 215

光学显微镜: American Optical Scientific Instruments MicroStar

试剂均为常规的国产分析纯试剂

2.1.2 实验方法

2.1.2.1 菌种的分离及初筛

将人工制得的腐浆用搅拌器充分打匀,用滤纸把浆滤掉留下滤液,取 1mL 滤液至 9mL 无菌水(过滤)中稀释,分别稀释 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 从 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 各吸取 0.1mL 接种至上述四种筛选培养基中, 37℃ 恒温培养 2 天(保持培养环境一定的湿度)。根据菌落形态的异同转挑单菌落, 再接入新配制的含有不同过氧化氢浓度的筛选培养基中, 重复划线分离几次, 以无菌牙签挑取 12 小时培养的菌种, 滴加 5% H_2O_2 试剂, 观察气泡的产生情况(产生与否及鼓泡速度)。根据菌落产生气泡的多少及菌落直径大小选择菌株, 进一步采用划线分离, 得到不同细菌的纯培养。

2.1.2.2 产酶菌株的复筛

将经初筛的单菌落由筛选培养基接种到 30mL(250mL 的三角瓶)摇瓶发酵培养基中, 于 37℃、225rpm 下培养 48h, 制成液体菌种。然后按 1% 的接种量将液体菌种加入到 50mL(250mL 的三角瓶)摇瓶发酵培养基中, 在 37℃、225rpm 下进行发酵。

2.1.2.3 粗酶液的制取

取一定量培养物 4000g×15 min 离心, 上清液作为胞外过氧化氢酶测定的样品, 菌泥以 50 mM Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液(pH 7.0)洗涤一次, 以适量相同的缓冲液重悬后置冰浴预冷; 超声波破碎(3s×5s×40 times, 200W), 镜检破碎的效果; 6500g×20 min 离心, 上清液即为胞内过氧化氢酶测定样品。

2.1.2.4 过氧化氢酶活性测定(贝尔斯-西策尔斯法(改进型))^[39]

采用分光光度法在 25℃ 下测定。反应总体积为 3 mL, 分别为 0.1 mL 酶液和 2.9 mL 含有 10 mmol/L H_2O_2 的 50 mmol/L 的磷酸二氢钾-磷酸氢二钠缓冲液(pH 7.0)。过氧化氢的分解速率用 8453 型紫外-可见光分光光度计在 240 nm 下测定。实验步骤: 用移液管将 1.0mL 底物溶液和 1.9mL 蒸馏水滴入一只 1cm 比色皿, 并调至所需温度。为了检查在不加酶的情况下吸光度是否降低, 就得在 240nm 处以蒸馏水为参比测定吸光度。若吸光度的降低幅度超过 0.01, 则在计算主值时须减去此值。为了测定酶的活性, 须滴加 0.10mL 酶溶液, 并在 240nm 处以蒸馏水为参比在连续 5min 内测定吸光度, 每隔 1min 读取一次结果, 直至每分钟吸光度的降低值达到稳定为止。

酶活定义为: 在 25℃ 下, 每分钟分解 1 μ mol H_2O_2 所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{酶活计算: } \frac{E_{240} \times 3}{0.0436 \times 0.1} \text{ IU/mL}$$

E_{240} —240nm 处每分钟内吸光度的降低值

0.1—所用酶液 0.10mL

0.0436—240nm 处 μmol 过氧化氢的吸光度

3—反应混合液的总体积

2.1.2.5 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。

2.1.2.6 菌株部分性质的鉴定

1. 光学显微镜下个体形态观察

微生物的形态结构观察主要是通过染色, 在显微镜下对其形状、大小、排列方式、细胞结构(包括细胞壁、细胞膜、细胞核、鞭毛、芽孢等)及染色特性进行观察, 直观地了解细菌在形态结构上特性, 根据不同微生物在形态结构上的不同加以区别、鉴定。

2. 扫描电镜观察(送物理学院电镜中心)

利用扫描电镜分析样品的制样过程相对比较简单, 只需将风干试样固定在样品台上, 利用真空镀膜法在要观察的样品表面覆盖一层金属(采用镀金, 主要是为了增加表征样品形貌的二次电子量, 使有用信号加强)后, 即可在扫描电镜上观察和拍照。

3. 平板菌落形态观察

细菌细胞在固体培养基表面形成的细胞群体叫菌落(colony)。不同微生物在某种培养基中生长繁殖, 所形成的菌落特征有很大差异, 而同一种的细菌在一定条件下, 培养特征却有一定稳定性, 以此可以对不同微生物加以区别鉴定。

4. KOH 实验替代革兰氏染色: 于载波片上滴一滴 3%KOH 溶液, 以无菌牙签挑取 24 小时和 60 小时培养的菌种于液滴处涂布均匀, 1 分钟后轻轻抬起牙签观察是否有丝拉出; 革兰氏阴性菌在 KOH 溶液中破壁, 因此有丝拉出。

5. 细菌的各种生理生化实验^[40]

微生物生化反应是指用化学反应来测定微生物的代谢产物, 生化反应常用来鉴别一些在形态和其它方面不易区分的微生物。微生物检验中常用的生化反应有:

(1)糖酵解试验

不同微生物分解利用糖类的能力有很大差异, 或能利用或不能利用, 能利用者, 或

产气或不产气。可用指示剂及发酵管检验。

(2)淀粉水解试验

某些细菌可以产生分解淀粉的酶，把淀粉水解为麦芽糖或葡萄糖。淀粉水解后，遇碘不再变蓝色。

(3)V-P 试验

某些细菌在葡萄糖蛋白胨水培养基中能分解葡萄糖产生丙酮酸，丙酮酸缩合，脱羧成乙酰甲基甲醇，后者在强碱环境下，被空气中氧氧化为二乙酰，二乙酰与蛋白胨中的胍基生成红色化合物，称 V-P (+) 反应。

(4)甲基红 (Methyl Red) 试验

肠杆菌科各菌属都能发酵葡萄糖，在分解葡萄糖过程中产生丙酮酸，进一步分解中，由于糖代谢的途径不同，可产生乳酸，琥珀酸、醋酸和甲酸等大量酸性产物，可使培养基 pH 值下降至 pH4.5 以下，使甲基红指示剂变红。

(5)吲哚 (Indole) 试验

某些细菌能分解蛋白胨中的色氨酸，生成吲哚。吲哚的存在可用显色反应表现出来。吲哚与对二甲氨基苯醛结合，形成玫瑰吲哚，为红色化合物。

(6)硝酸盐 (Nitrate) 还原试验

有些细菌具有还原硝酸盐的能力，可将硝酸盐还原为亚硝酸盐、氨或氮气等。亚硝酸盐的存在可用硝酸试剂检验。

(7)明胶 (Gelatin) 液化试验

有些细菌具有明胶酶 (亦称类蛋白水解酶)，能将明胶先水解为多肽，又进一步水解为氨基酸，失去凝胶性质而液化。

(8)硫化氢 (H₂S) 试验

有些细菌可分解培养基中含硫氨基酸或含硫化物，而产生硫化氢气体，硫化氢遇铅盐或低铁盐可生成黑色沉淀物。

6. 最适生长 pH 确定

筛选培养基 B、D 中调节初始 pH 至 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0, 接种量为 1%，培养 24 小时，测定其生物量。

7. 最适生长温度确定

筛选培养基 B、D 在不同温度(32℃、37℃、42℃、47℃、52℃、57℃)下，接种量为 1%，培养 24 小时，测定其生物量。

8. 最适生长 NaCl 浓度确定

筛选培养基 B、D 中分别加入 0%，1%，2%，3%，4%，5%，6%，7% 的 NaCl，接种量 1%，培养 24 小时，测定其生物量。

9. 16S rDNA 序列测定：由上海基康生物技术有限公司完成。

10. 基于 16S rDNA 序列的系统发育分析：将测序结果(见附录)用在线的用于做序列差异比较的 Blast 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行同源性分析,然后在网上数据库(<http://rdp.cme.msu.edu>)中查找出相近的序列，最后自动生成系统发育树的结构。

2.2 结果与讨论

2.2.1 菌株的分离、筛选与鉴定

表 2-1 产过氧化氢酶菌株的复筛结果

Table2-1 The screening of CAT producing strains

编号	胞外酶 (IU/mL)	胞内酶 (IU/mL)	编号	胞外酶 (IU/mL)	胞内酶 (IU/mL)
A-1	14.4	16.66	C-1	137.24	323.52
A-2	20.28	36.83	C-2	84.87	201.63
A-3	9.54	32.07	C-3	49.63	58.38
A-4	9.14	13.22	C-4	45.9	146.84
A-5	13.4	54.32	C-5	57.41	132.46
A-6	47.86	90.35	C-6	72.24	121.89
B-1	12.85	64.86	D-1	35.15	86.04
B-2	29.72	67.3	D-2	24.46	51.87
B-3	38.92	117.59	D-3	83.45	22.46
B-4	49.47	140.83	D-4	50.67	41.2
B-5	187.27	369.74	D-5	79.75	163.77
B-6	82.26	183.57	D-6	103.48	256.7

经过对废纸浆中微生物的富集、初筛、复筛，从中分离出 50 多株能耐受过氧化氢浓度为 6g/L 的菌株纯培养。利用鼓泡试验检测发现，所有 50 多株菌株均为过氧化氢酶阳性，但鼓泡的速度有差异；本实验最后确定了每种培养基中各选 6 株鼓泡量大且持久

的菌株作为复筛的对象，复筛结果，如表 2-1 和图 2-1 所示。

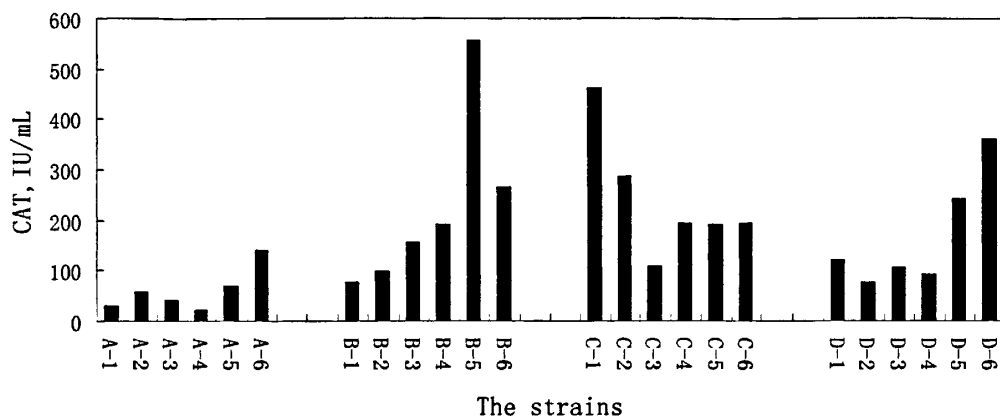


图 2-1 产过氧化氢酶菌株的复筛结果

Fig.2-1 The screening of CAT producing strains

根据表 2-1 和图 2-1 中的数据，每种培养基中选择产过氧化氢酶量最大的菌株作为进一步研究的对象，因为培养基 A 中菌株产酶量太少，故对其菌株不做研究，所以选择 B-5, C-1, D-6 作为进一步研究的目标菌株。经过反复试验，菌株 B-5, C-1, D-6 能耐受过氧化氢浓度为 8g/L 以上。经镜检发现，菌株 B-5 与 D-6 疑为同一种菌，可能是芽孢杆菌属，只是菌株的生态学特征和部分生理生化性质不同；菌株 C-1 为真菌类。

将上述三种菌进行涂布分离，进一步纯化，转挑斜面培养基。

2.2.2 菌株 B-5、C-1 及 D-6 的性质鉴定

分别鉴定了菌株 C-1、B-5 及 D-6 的培养特征以及检测菌株 B-5 及 D-6 部分生理生化特性，用以确定其微生物类型；同时，根据 16S rDNA 的序列测定及比对初步确定菌株 B-5 的系统发育地位。

2.2.2.1 菌株 C-1 的鉴定及产酶特性

2.2.2.1.1 菌株 C-1 的鉴定

平板或载玻片培养物用肉眼观察，菌落 C-1（如图 2-2）在 PDA 培养基上生长迅速，该菌类凹生长稍局限，10d~14d 直径可达 2.5cm~3cm，菌丝初为白色，常常出现黄色区域，后绒状，黑色，反面无色或中央部分略带黄褐色。菌落平坦或少数较突起，有规则或不规则辐射状沟纹，质地湿绒状或稍呈絮状，分生孢子多，表面呈暗褐色至碳黑色。

扫描电镜观察,如图2-2, 2-3。菌株C-1的分生孢子头幼时球形,渐变为放射状或裂成几个放射的柱状物,一般为1mm~3mm,直径15 μ m~20 μ m,壁厚,光滑。顶囊球形一般直径45 μ m~75 μ m。小梗双层,自顶囊全面着生,梗基一般20~30 $\times$ 5 μ m~6 μ m,长可达60 μ m~70 μ m,宽8 μ m~10 μ m,有的具有横隔,分生孢子椭圆形、球形,直径大多4 μ m~5 μ m,粗糙。

根据菌株C-1的形态特征分析,菌株C-1应该属于半知菌亚门(Deuteromycotina)丝孢纲(Hyphomycetes)丛梗孢目(Moniliales)丛梗孢科(Moniliaceae)曲霉属(*Aspergillus*)黑曲霉类(*Aspergillus niger*)。故将其命名为*Aspergillus niger*.C-1。

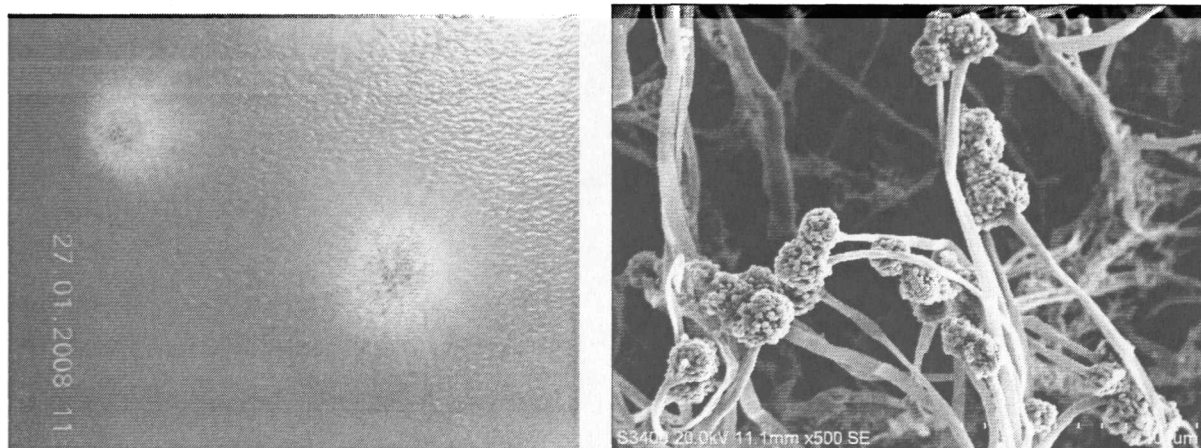


图2-2 *Aspergillus niger*.C-1在平板上的菌落形态(左)和扫描电镜照片(右:500 $\times$)

Fig2-2 Colony morphology (Left) and electron micrograph (Right:500 $\times$) of *Aspergillus niger*.C-1

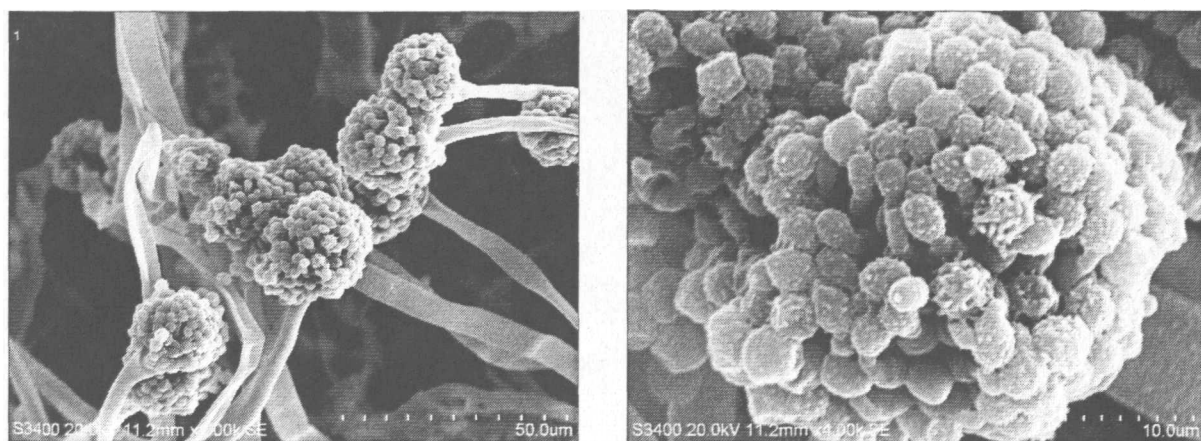


图2-3 *Aspergillus niger*.C-1的扫描电镜照片(左:1000 $\times$;右:4000 $\times$)

Fig2-3 Electron micrograph of *Aspergillus niger*.C-1 (Left:1000 $\times$; Right:4000 $\times$)

2.2.2.1.2 Aspergillus niger.C-1 的微生物学特性及产酶条件

2.2.2.1.2.1 培养时间对菌体生长及产酶的影响

培养时间分别在12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h, 96h。将孢子悬浮液定量接入培养基中,摇匀后置32℃下培养,测定摇瓶产酶过程在不同时间内的菌液的生物量和酶活性,结果如图2-4所示。结果表明,该菌在培养12h后便开始产生CAT, 72h左右达到高峰期, 72h后酶量开始下降; 培养24h左右进入菌株的对数生长期, 48h左右达到最大生长量, 72h后迅速衰退。

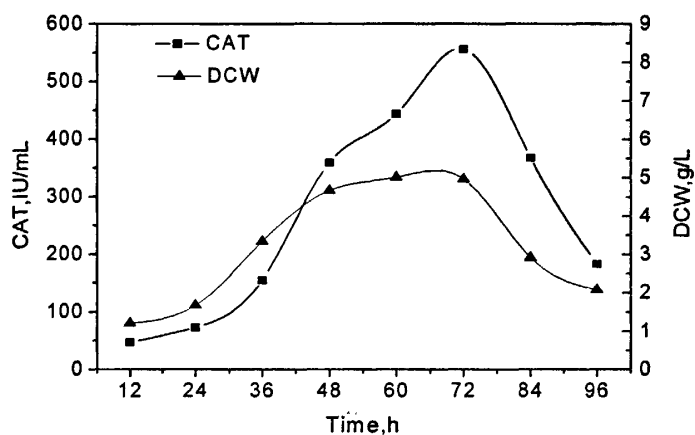


图 2-4 培养时间与产酶的关系及菌株的生长曲线

Fig.2-4 Relationship between culture time and enzyme formation and the growth curve of the strain

2.2.2.1.2.2 培养温度对菌体生长及产酶的影响

把摇瓶产酶过程分别于不同温度下进行, 培养 72h 后取样测定其生物量和酶活, 结果如图 2-5 所示。由图可见, 28~42℃菌体均能很好的生长, 其最佳温度为 32℃; 产酶受温度的影响也较大, 28~37℃均能很好的产酶, 32℃是其最佳产酶温度,其产酶量为 555.94 IU/ml。

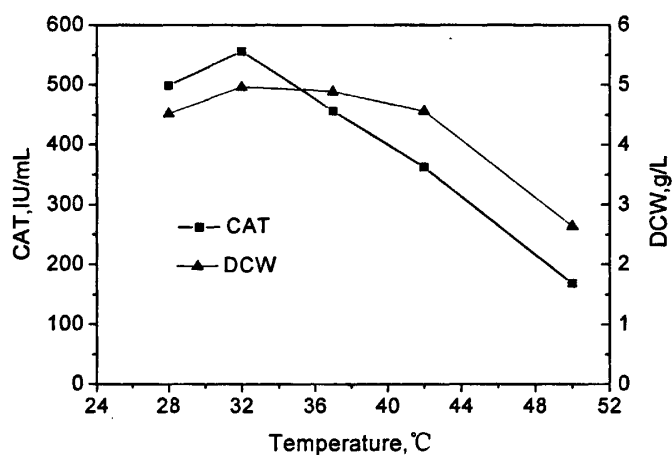


图 2-5 培养温度对产酶和菌体生长的影响

Fig.2-5 Effect of culture temperature on enzyme formation and bacteria growth

2.2.2.1.2.3 培养基起始 pH 值对菌体生长及产酶的影响

将发酵产酶培养基分别调整不同的 pH 值, 在 32°C 下摇瓶产酶, 测定 72h 时的生物量和酶活, 结果见图 2-6。图 2-6 表明菌体生长、产酶的最适起始 pH 值为 5~7, 在 pH5~7 均能很好生长, 产酶受 pH 的影响较菌体生长大, pH 为 6 时产酶量最高, 达到 602.13 IU/mL, 当 pH 大于 7 时明显受到抑制。

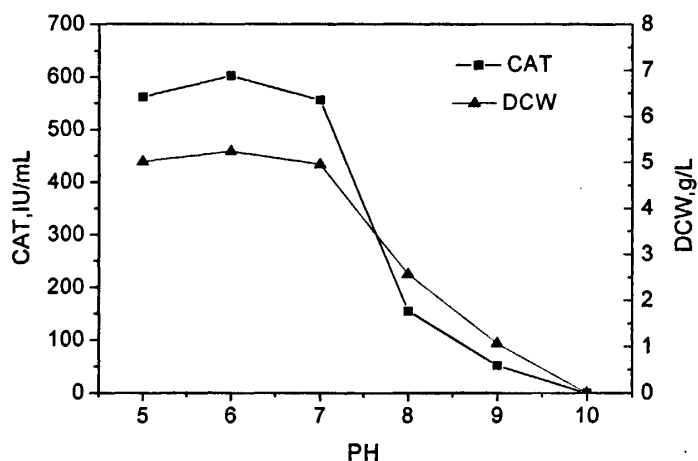


图 2-6 培养基起始 pH 值对产酶和菌体生长的影响

Fig.2-6 Effect of initial PH of medium on enzyme formation and bacteria growth

2.2.2.1.2.4 NaCl 浓度对菌体生长及产酶的影响

试验了一系列不同 NaCl 浓度的发酵培养基在 32℃ 下进行摇瓶产酶，于 72h 时取样测定其生物量和酶活力，结果如图 2-7 所示。NaCl 的浓度对菌体生长有一定的影响，浓度为 2.0~5.0% 时生长最好，大于 5.0% 时表现出抑制现象，同时产酶的最适盐浓度为 4.0~6.0%。

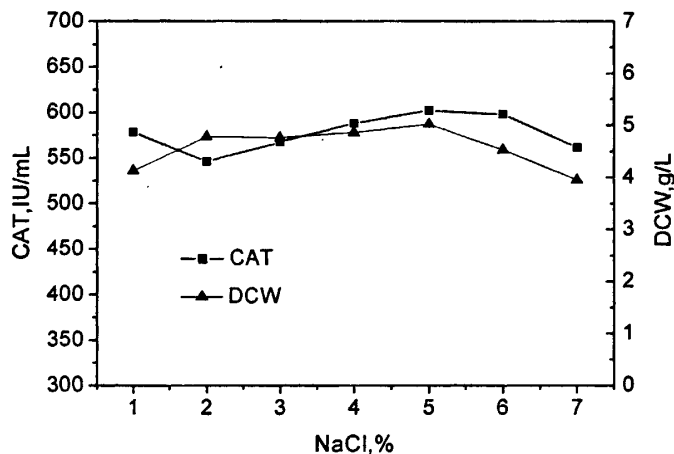


图 2-7 NaCl 浓度对产酶和菌体生长的影响

Fig.2-7 Effect of convention of NaCl on enzyme formation and bacteria growth

2.2.2.2 菌株 B-5、D-6 的菌种鉴定及产酶特性

2.2.2.2.1 菌株 B-5、D-6 的鉴定

2.2.2.2.1.1 菌株 B-5、D-6 的最适生长条件

菌株 B-5、D-6 的最适生长温度、盐浓度及 PH 曲线分别见由图 2-8, 2-9, 2-10 可知，菌株 B-5 的最适生长条件分别为 pH 8.5, 42℃ 及 4%NaCl 浓度，而菌株 D-6 的最适生长条件分别为 pH7.5, 42℃ 及 5%NaCl 浓度。由以上结果可以看出，菌株 B-5、D-6 的最适生长条件很相似，有可能属于同一种菌。

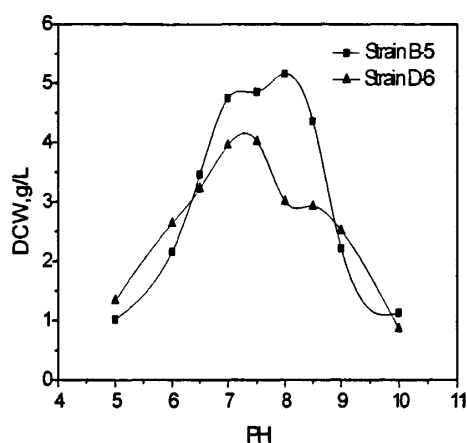


图 2-8 菌株 B-5 及 D-6 的生长 pH 曲线

Fig.2-8 The growth of strain B-5 and strain D-6

at different pH conditions

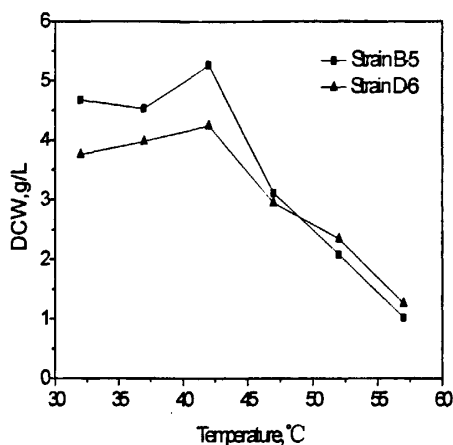


图 2-9 菌株 B-5 及 D-6 的生长温度曲线

Fig.2-9 The growth of strain B-5 and strain D-6

at different temperatures

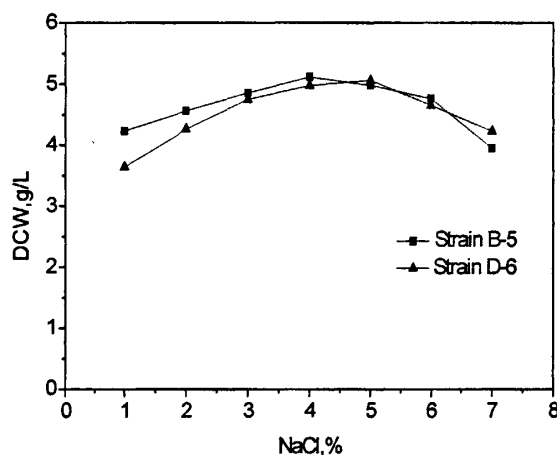


图 2-10 菌株 B-5 及 D-6 的生长 NaCl 浓度曲线

Fig.2-10 The growth of strain B-5 and strain D-6 at different concentrations of NaCl

2.2.2.2.1.2 菌株 B-5 及 D-6 的形态特征及生理生化特征

表 2-2 为菌株 B-5 和 D-6 的形态特征及生理生化特征及其与相近菌种的比较。从中可以看出, 菌株 D-6 与 *Bacillus subtilis* 在形态特征及生理生化特征上基本相似, 因此可以确定菌株 D-6 属于芽孢杆菌属中的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 故将其命名为

表 2-2 菌株 B-5 及 D-6 的形态特征和生理生化特征及其与相近菌种的比较^[41,42]

Tab.2-2 Comparison of morphologic and physiological and biochemical characteristics of stain B-5 and D-6 with those of phylogenetically similar strains

	Bacillus sp.B-5	Bacillus sp.D-6	Bacillus subtilis
菌落特征	不规则，边缘波状，表面粗糙，灰白色，菌落形成红色色素，（如图 2-11 左）	圆，边缘整齐，表面光滑，中间皱褶，白色，（如图 2-11 右）	圆或不规则，表面色暗，可以起皱，奶油色或褐色
个体特征	杆状（ $0.6\sim 0.8\times 1.5\sim 2.0\mu\text{m}$ ）芽孢中生（如图 2-12）	杆状（ $0.8\times 1.5\sim 2.0\mu\text{m}$ ）芽孢中生	杆状（ $0.8\times 1.5\sim 1.8\mu\text{m}$ ）芽孢中生
细胞直径 $> 1.0\mu\text{m}$	-	-	-
芽孢圆形	-	-	-
孢囊膨大	-	-	-
Gram	+	+	+
氧的需要	+	+	+
V-P 测定	+	+	+
产酸：D-葡萄糖	-	+	+
L-阿拉伯糖	-	+	+
D-木糖	-	+	+
D-甘露醇	-	+	+
葡萄糖产气	-	-	-
水解：明胶	+	+	+
淀粉	+	+	+
利用：柠檬酸盐	+	+	+
硝酸盐还原到亚硝酸盐	+	+	+
形成：吲哚	+	-	-
生长温度：			
最高	$50^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$	$55^{\circ}\text{C}\sim 65^{\circ}\text{C}$	$45^{\circ}\text{C}\sim 55^{\circ}\text{C}$
最低	$10^{\circ}\text{C}\sim 20^{\circ}\text{C}$	$10^{\circ}\text{C}\sim 20^{\circ}\text{C}$	$5^{\circ}\text{C}\sim 20^{\circ}\text{C}$

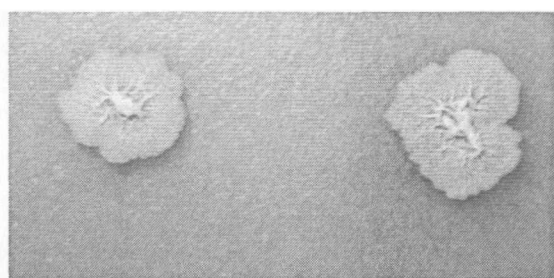


图 2-11 菌株 B-5 (左) 和菌株 D-6 (右) 在平板上的菌落形态

Fig2-11 Colony morphology of stain B-5 (Left) and D-6 (Right) on the plate

B. subtilis D-6; 而菌株 B-5 菌落产生红色色素, 能产生吲哚, 而且不产酸, 这与 *Bacillus subtilis* 在形态特征及生理生化特征上就有很大的差异, 因此需要对菌株 B-5 进行基于 16S rDNA 序列的系统发育分析。

图 2-12 是菌株 B-5 的扫描电镜照片, 从中可清楚地看到中生的椭圆形芽孢。

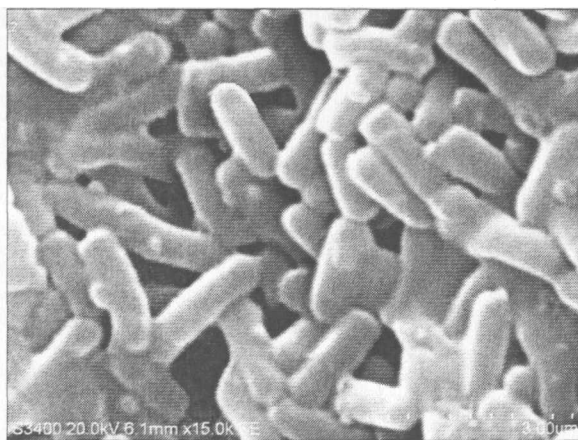
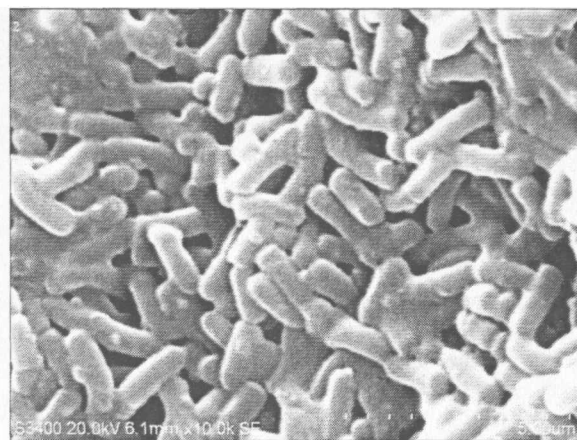


图 2-12 菌株 B-5 的扫描电镜照片 (左: 10000 $\times$; 右: 15000 $\times$)

Fig.2-12 Electron micrograph of bacteria B-5 (Left:10000 $\times$; Right:15000 $\times$)

2.2.2.2.1.3 菌株 B-5 基于 16S rDNA 序列的系统发育分析

测序结果得到了 984bp (菌株 B-5, 见附录) 的 16S rDNA 序列, 经与 GeneBank 数据库中的序列比对后发现, 和菌株 B-5 亲缘关系最近的是枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* Fs32b, *Bacillus subtilis*D53, *Bacillus subtilis* CICC10028 及 *Bacillus subtilis*H-1, 相似性均为 99%。菌株 B-5 与其它相关种的系统发育关系见图 2-13。

从图 2-13 中可以看到, 在该系统发育树上, 菌株 B-5 单独形成一个分枝, 与 *Bacillus subtilis* subsp.*subtilis* Fs32b 遗传分枝距离最近, 结合 16S rDNA 序列的同源性比较判断, 菌株 B-5 应属于 *Bacillus* 属 *Bacillus subtilis* 亚种, 因此本论文中暂时笼统地将菌株 B-5 称为 *B. subtilis*.B-5。

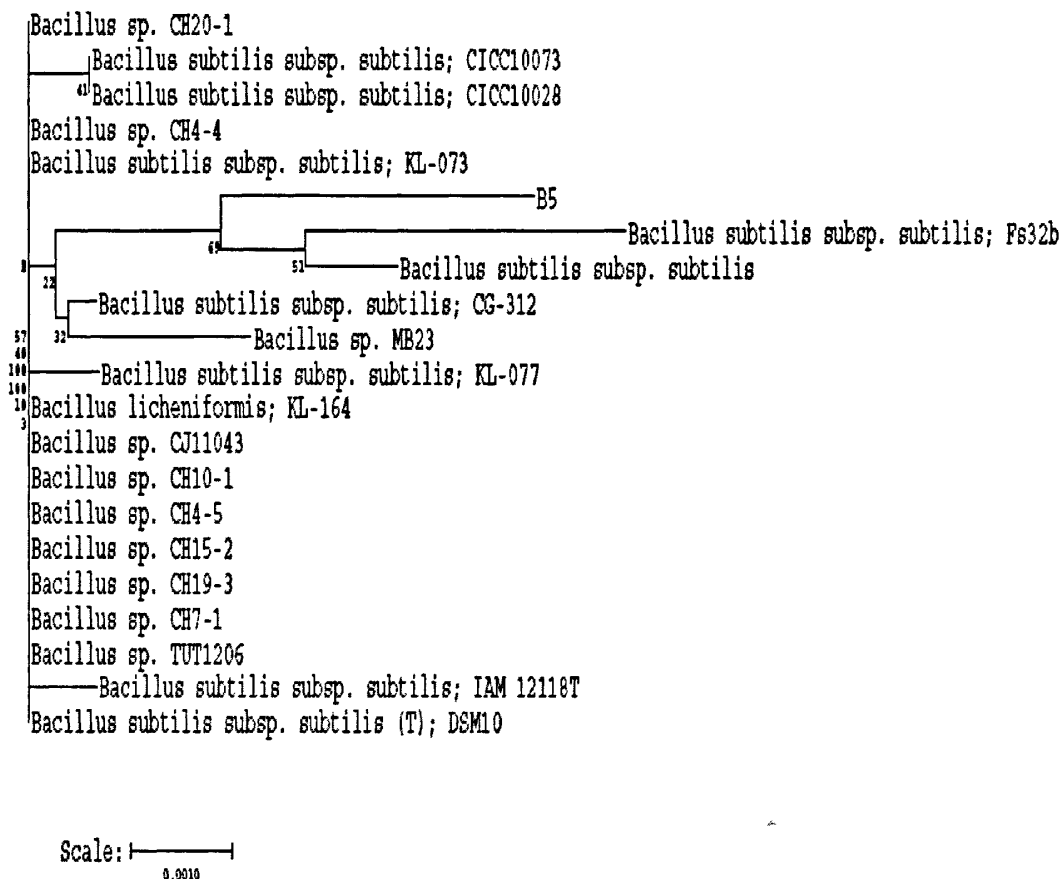


图 2-13 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.2-13 The phylogenetic tree based on the sequences of 16S rDNA

2.2.2.2.2 菌株 B-5 和 D-6 的微生物学特性及产酶条件

2.2.2.2.2.1 培养时间对菌体产酶的影响

测定摇瓶产酶过程在不同时间内的菌液，摇床培养(37℃，225rpm)24h，离心收集菌体，破壁、测定酶活力。结果如图 2-14 所示。结果表明，菌株 B-5 在培养 12h 后便开始产生 CAT，24h 后呈线性趋势增长，48h 左右达到高峰期，72h 后酶量开始下降；而菌株 D-6 也在培养 12h 后便开始产生 CAT，24h 增长迅速，到 48h 左右达到最大值，之后趋于平稳，直到 84h 后酶量才开始骤降。

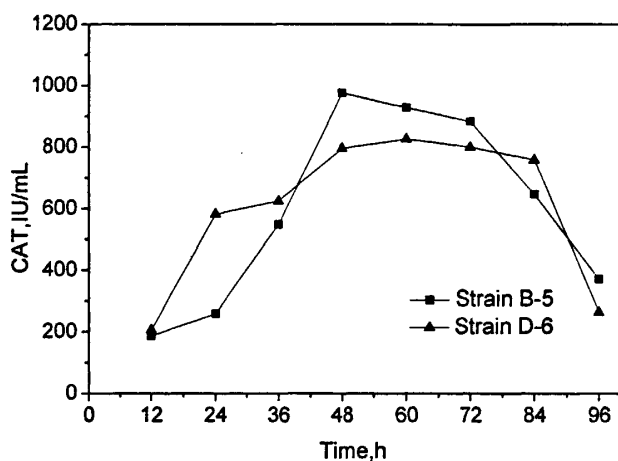


图 2-14 培养时间对产酶的影响

Fig.2-14 Effect of culture time on enzyme formation

2.2.2.2.2 培养基初始 pH 对产酶的影响

培养基 pH 值对微生物的生长繁殖和代谢产物的积累有重要的影响。用 1mol/L 的 HCl 和 NaOH 将发酵培养基的初始 pH 值分别调至 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 和 10.0。摇床培养(37℃, 225rpm)48h, 离心收集菌体, 破壁、测定酶活力。结果如图 2-15 所示, 发酵培养基的起始 pH 为 8.0 时菌株 B-5 产酶最高(986.1 IU/mL), 而在 pH 为 7.5 时菌株 D-6 产酶最高 (821.6 IU/mL)。

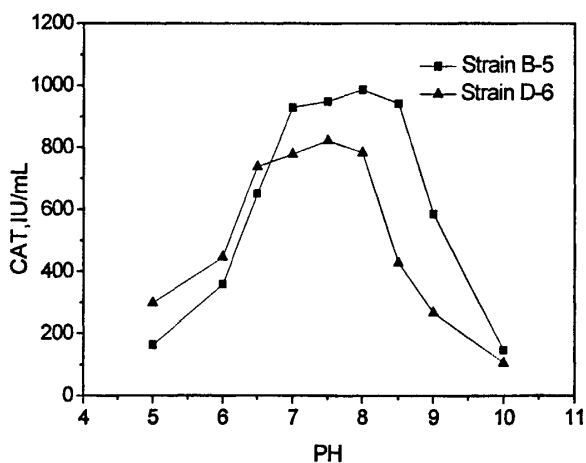


图 2-15 培养基起始 pH 值对产酶的影响

Fig.2-15 Effect of initial pH of medium on enzyme formation

2.2.2.2.3 培养温度对产酶的影响

培养温度对微生物的生长和酶的生成有极大的影响,这是因为微生物的生长和酶的合成都是在酶的催化作用下进行的,温度是保证酶活性的重要条件。接种于发酵培养基,在不同温度(32℃、37℃、42℃、47℃、52℃、57℃)下、250mL摇瓶培养48h,离心收集菌体,破壁测定酶活力,结果如图2-16所示,菌株B-5在42℃下培养产酶最高(1023.3 IU/mL),而菌株D-6在37℃下培养产酶最高(778.3 IU/mL)。

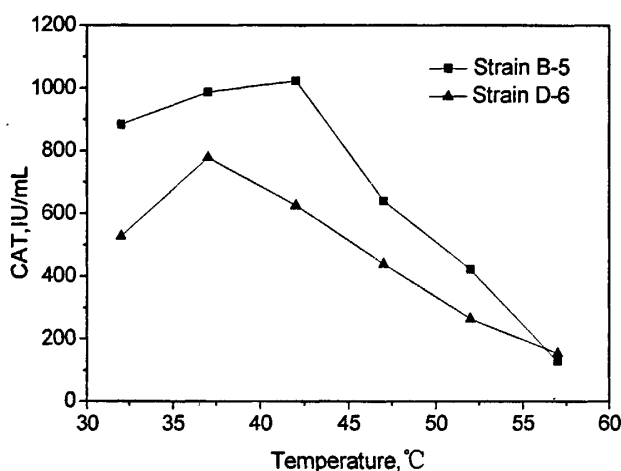


图 2-16 培养温度对产酶的影响

Fig.2-16 Effect of culture temperature on enzyme formation

2.2.2.2.4 NaCl 浓度对产酶的影响

试验了一系列不同 NaCl 浓度的发酵培养基在 37℃下进行摇瓶产酶, 250mL 摇瓶培养 48h, 离心收集菌体, 破壁测定酶活力, 结果如图 2-17 所示。NaCl 的浓度对菌种 B-5 和 D-6 的生长都没有太大的影响, 同时产酶的最适盐浓度为 3~5%, 大于 6%时表现明显抑制现象。

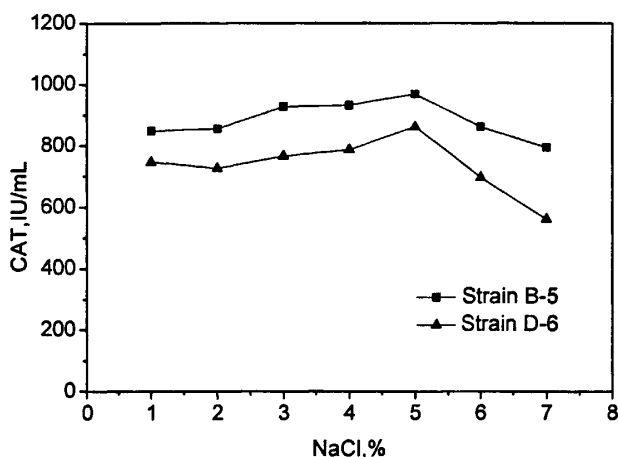


图 2-17 NaCl 浓度对产酶的影响

Fig.2-17 Effect of convention of NaCl on enzyme formation

2.3 本章小结

1. 从腐浆中筛选到一株产酶相对较高的真菌 C-1, 经初步鉴定属于半知菌亚门 (Deuteromycotina) 丝孢纲 (Hyphomycetes) 丛梗孢目 (Moniliales) 丛梗孢科 (Moniliaceae) 曲霉属 (Aspergillus) 黑曲霉类 (Aspergillus niger)。

2. 从腐浆中筛选到两株产酶相对较高的细菌 B-5 和 D-6, 经初步鉴定, 根据培养特征和生理生化特征, 菌株 D-6 属于枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis), 菌株 B-5 属于 Bacillus 属, 与其 16S rDNA 序列相似性最高的菌株有 Bacillus subtilis Fs32b, Bacillus subtilis D53, Bacillus subtilis CICC10028 及 Bacillus subtilis H-1, 相似性均为 99%。

3. 实验结果表明, 菌株 C-1 的最佳生长条件: 时间: 48h; 温度: 32℃; pH: 5~7; NaCl: 2.0~5.0%。最佳产酶条件: 时间: 72h; 温度: 32℃; pH: 6.0; NaCl: 4.0~6.0%。最高产酶量为 602.13 IU/mL。

4. 实验结果表明, 菌株 B-5 的最佳生长条件: 温度: 42℃; pH: 8.5; NaCl: 4.0%。最佳产酶条件: 时间: 48h; 温度: 42℃; pH: 8.0; NaCl: 3.0~5.0%, 最高产酶量为 1023.3 IU/mL。而菌株 D-6 的最佳生长条件: 温度: 42℃; pH: 7.5; NaCl: 5.0%。最佳产酶条件: 时间: 48h; 温度: 37℃; pH: 7.5; NaCl: 3.0~5.0%, 最高产酶量为 778.3 IU/mL。

第三章 B. subtilis.B-5 过氧化氢酶性质的初步研究

过氧化氢酶(Catalase,CAT,EC1.11.1.6) 是一种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。过氧化氢酶属于好氧型微生物,产生于所有的好氧生物细胞。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。国内用工程菌合成的过氧化氢酶,则仅限于性质研究,没有开展生产性的研究^[35]。酵母的 CAT 主要积累于胞内^[43],一些丝状真菌的过氧化氢酶主要分泌于胞外^[44, 45]。而细菌过氧化氢酶的热、碱稳定性可随来源不同而不同,芽孢杆菌的过氧化氢酶主要分泌于胞内,在胞外也含有一定量的过氧化氢酶,而且其所产 CAT 酶活较高。因此选用芽孢杆菌来生产 CAT 在应用和产品提取方面具有较大优势。

本章主要对枯草芽孢杆菌(B. subtilis.B-5)所产过氧化氢酶的最适温度、最适 pH、温度稳定性、pH 稳定性以及金属离子对酶活力的影响等进行研究。

3.1 材料与方法

3.1.1 菌株

采用 B. subtilis.B-5 作为实验用菌株。

3.1.2 培养基

种子培养基(g/L): 葡萄糖 15, 蛋白胨 10, NaNO_3 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, Na_2HPO_4 9.52, KH_2PO_4 0.907, pH 7.5

3.1.3 主要试剂

pH4.0~5.0 的 0.1mol/L 柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液、pH6.0~9.0 的 0.1mol/L 磷酸氢二钠—磷酸氢二钾缓冲液、pH10.0~12.0 的 0.1mol/L 氢氧化钠—氯化钾缓冲液的配制参照文献^[46]。

3.1.4 粗酶液的制备及酶活的测定

参照第二章的方法。

3.2 结果与讨论

3.2.1 温度对 *B. subtilis*.B-5 过氧化氢酶活力的影响

将粗酶液分别在 25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃下，测定过氧化氢酶的活性，以酶活最高者为 100%，计算在各温度下的相对酶活力，结果如图 3-1 所示。从图 3-1 中可以看出 *B. subtilis*.B-5 过氧化氢酶的最适反应温度为 45℃。

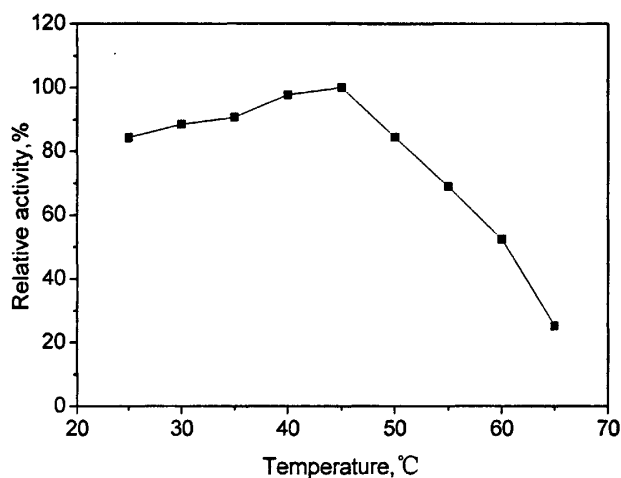


图 3-1 温度对 *B. subtilis*.B-5 过氧化氢酶活力的影响

Fig3-1 Effect of temperature on the CAT activity of *B. subtilis*.B-5

3.2.2 *B. subtilis*.B-5 过氧化氢酶的热稳定性

将粗酶液分别置于 30℃、40℃、50℃、60℃、65℃、70℃和 80℃的水浴中保温 1h，立刻用冰水冷却，测定处理后粗酶液的过氧化氢酶的残余活性，以原酶液的过氧化氢酶活为 100%，计算残余酶活百分比，结果如图 3-2。从图 3-2 中可以看出，*B. subtilis*.B-5 过氧化氢酶在 60℃以下时稳定性较好，60℃保温 1 h 后仍然保留 80% 的活性，高于 60℃时酶活性开始急剧下降，65℃保温 1 h 仍然保留 46% 的活性，70℃保温 1 h 只剩下 18% 的活性。

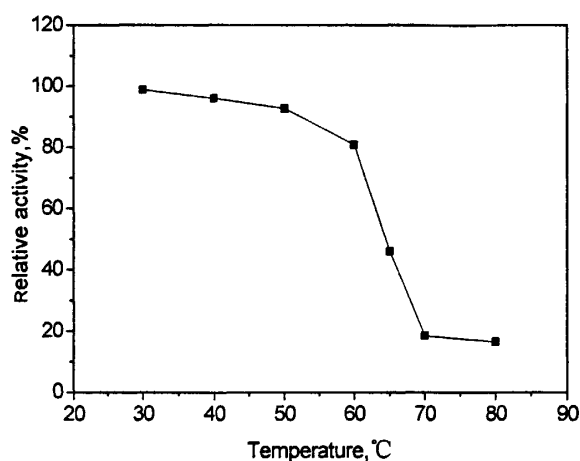


图3-2 温度对*B. subtilis*.B-5过氧化氢酶稳定性的影响

Fig3-2 Effect of temperature on the CAT stability of *B. subtilis*.B-5

3.2.3 pH 值对 *B. subtilis*.B-5 过氧化氢酶活性的影响

分别在pH为4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0的缓冲液中，25℃下测定过氧化氢酶的活性，以酶活最高者为100%，计算在各pH值下过氧化氢酶的相对酶活，结果如图3-3所示。从图3-3中可以看出*B. subtilis*.B-5过氧化氢酶的最适反应pH值为9.0。

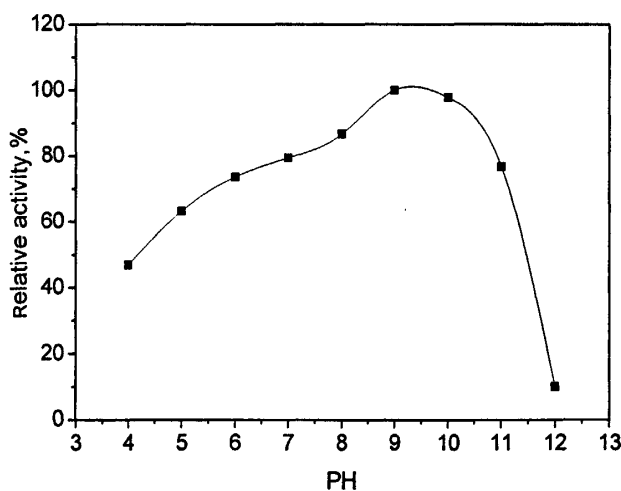


图 3-3 pH 对 *B. subtilis*.B-5 过氧化氢酶活力的影响

Fig3-3 Effect of pH on the CAT activity of *B. subtilis*.B-5

3.2.4 B. subtilis.B-5 过氧化氢酶的 pH 稳定性

将粗酶液在不同pH的缓冲液中60℃保温1 h，将pH调回到7.0，在25℃下测定残余的过氧化氢酶活性，以原酶液的过氧化氢酶的酶活为100%，计算残余的酶活百分比，结果如图3-4所示。B. subtilis.B-5过氧化氢酶在pH值6.0~9.0时有很好的稳定性，说明该酶有较宽的pH稳定范围。

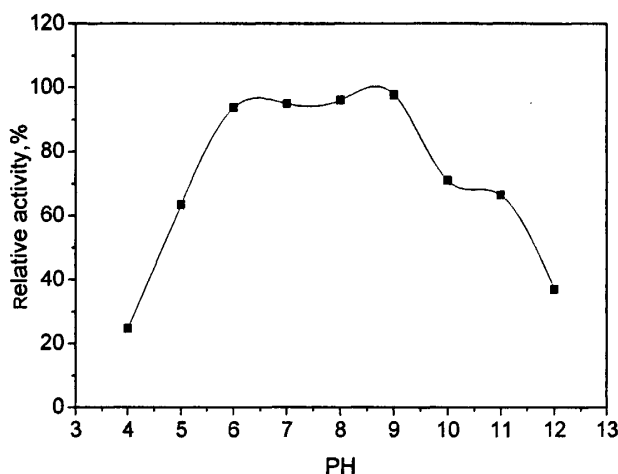
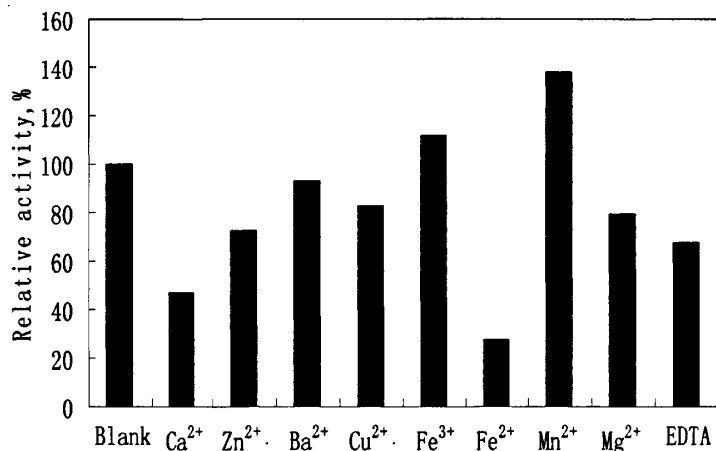


图 3-4 pH 对 B. subtilis.B-5 过氧化氢酶稳定性的影响

Fig3-4 Effect of pH on the CAT stability of B. subtilis.B-5

3.2.5 金属离子对 B. subtilis.B-5 过氧化氢酶活力的影响

将酶液与浓度为 5mmol/L 的金属离子(Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , EDTA)溶液等量混合，置于 42℃水浴中恒温 30min 后，测定酶活力，结果如图 3-5，从图 3-5 可以看出， Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 对该酶有较弱的激活作用， Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 有较强的抑制作用。

图 3-5 金属离子对 *B. subtilis*.B-5 过氧化氢酶活力的影响Fig3-5 Effects of metal ions on the CAT activity of *B. subtilis*.B-5

3.2.6 *B. subtilis*.B-5 及其过氧化氢酶降解 H₂O₂ 的应用实验

3.2.6.1 废纸浆过氧化氢漂白的生物降解试验

3.2.6.1.1 培养基

种子发酵培养基(g/L): 葡萄糖 15, 淀粉 10, 蛋白胨 10, NaNO₃ 5, Na₂HP0₄ 9.52, KH₂PO₄ 0.907, pH 7.5

将菌种 *B. subtilis*.B-5 接入发酵培养基, 37℃、225rpm 下培养 48h, 制成液体菌种。

3.2.6.1.2 降解试验

采用固态发酵法。在 250mL 三角瓶中装入 5g 废纸浆 (以绝干浆计)。其中, 固液比为 1: 1.8, 营养液采用种子发酵培养液。在 121℃ 条件下灭菌 30min 后接入 5% 的液体菌种。培养条件为温度 37℃, 自然 pH, 湿度 90%。

原料经过 *B. subtilis*.B-5 发酵处理到规定时间后, 过滤, 称重, 计算出水分。然后进行纸浆漂白, 主要测定纸浆白度和残余过氧化氢的含量这两个指标, 步骤: 先螯合后加入配制好的药液, 混合均匀, 置于密封聚乙烯袋中, 放入恒温水浴中反应。漂白条件: 浆浓: 10%; H₂O₂: 2.0%; NaOH: 0.3%; Na₂SiO₃: 3.0%; MgSO₄: 0.5%; EDTA: 0.15%; 时间: 1 小时。

漂白终点收集残液测定残余过氧化氢含量; 纸浆洗净后疏解, 抄片, 压榨, 风干, 平衡水分, 测定纸张白度^[47]。

B. subtilis.B-5 对废纸浆过氧化氢漂白的的影响如图 3-6 所示。

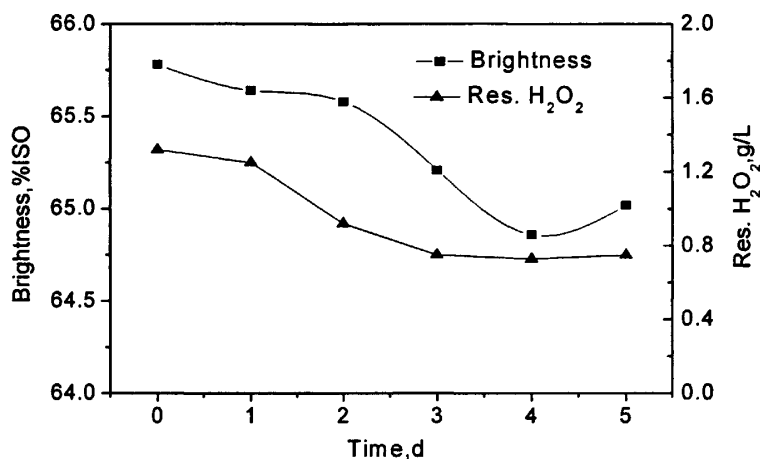


图 3-6 *B. subtilis*.B-5 对废纸浆过氧化氢漂白的的影响

Fig3-6 Effects of *B. subtilis*.B-5 on hydrogen peroxide bleaching of recycled pulp

由图 3-6 可以看出：当发酵天数小于 2 天时，纸浆白度的变化值不大，这可能是细菌正在快速生长，胞外过氧化氢酶分泌得不够多，因此对过氧化氢的降解不是很多；当发酵天数为 3 天时，纸浆白度下降得很快，残余过氧化氢的量也有所下降，到了第 4 天，纸浆白度达到最小值，为 64.86%ISO，比空白浆下降了 0.92%ISO，而残余过氧化氢的量也达到最小值，为 0.73%，比空白浆下降了 0.58%。其原因可能是：细菌胞内过氧化氢酶逐渐转化为胞外酶，使得过氧化氢产生无效分解。但是到了第 5 天，纸浆白度有所升高，这可能是因为细菌生长处于衰退期，产生的胞外过氧化氢酶明显减少。

3.2.6.2 过氧化氢酶粗酶液降解 H_2O_2 实验

3.2.6.2.1 粗酶液的制取

将菌种 *B. subtilis*.B-5 接入种子发酵培养基中 37℃、225rpm 下培养 48h，取一定量培养物 4000g×15min 离心，菌泥以 50 mM Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液 (pH 7.0) 洗涤一次，以适量相同的缓冲液重悬后置冰浴预冷；超声波破碎 (3s×5s×40times, 200W)，然后 6500g×20min 离心，上清液即为过氧化氢酶粗酶液。

3.2.6.2.2 粗酶液降解 H_2O_2 实验

步骤：先整合后加入配制好的漂白药液，最后按比例加入粗酶液，混合均匀，置于密封聚乙烯袋中，放入恒温水浴中反应。漂白条件：浆浓：10%； H_2O_2 ：2.0%；NaOH：0.3%； Na_2SiO_3 ：3.0%； $MgSO_4$ ：0.5%；EDTA：0.15%；时间：1 小时。

过氧化氢酶粗酶液对纸浆过氧化氢漂白的影响如图 3-7 所示。

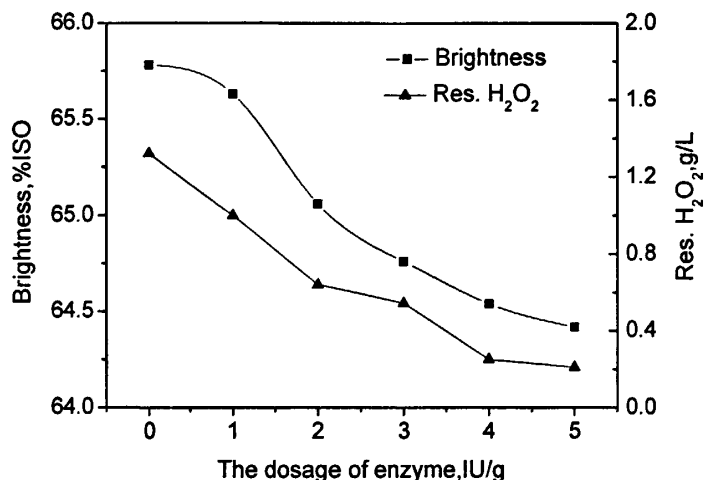


图 3-7 过氧化氢酶粗酶液对纸浆过氧化氢漂白的影响

Fig3-7 Effects of the CAT rough enzyme solution on hydrogen peroxide bleaching of recycled pulp

从上图可知，纸浆白度和残余过氧化氢的量随着过氧化氢酶粗酶液加入量的增加而减少，从未加酶粗液到粗酶液加入量为 5mL，纸浆白度从 65.78%ISO 减低到 64.42%ISO，降低了 1.36%ISO，而残余过氧化氢的量从 1.32%降低到 0.251%，减低了 1.069%，这说明过氧化氢酶粗酶液能降解过氧化氢，对纸浆漂白有一定的影响。

3.3 本章小结

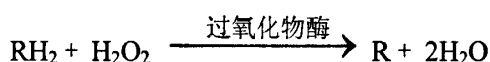
1. *B. subtilis* B-5 所产过氧化氢酶最适反应温度为 45℃，在 60℃以下稳定性较好；最适 pH 值 9.0，在 pH6.0~9.0 有较好的稳定性；金属离子中 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 对酶有较弱的激活作用，而 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 则对酶有较强的抑制作用。

2. 废纸浆过氧化氢漂白的生物降解试验表明，菌株 *B. subtilis*.B-5对废纸浆过氧化氢漂白产生一定的影响，使漂后浆白度降低了0.92%ISO，残余过氧化氢的量降低了0.58%。而菌株 *B. subtilis*.B-5所产过氧化氢酶粗酶液对过氧化氢漂白产生较大的影响，导致漂后浆白度降低了1.36%ISO，残余过氧化氢的量降低了1.069%。

第四章 生物酶对废纸浆过氧化氢漂白的的影响

纸浆过氧化氢漂白具有无污染、白度稳定性好和纸浆得率高等优点。过氧化氢在纸浆漂白中的作用主要是改变木素中有色基团的结构,使之变成无色基团,并在一定程度上使之溶出。但是废纸浆过氧化氢漂白比较难漂,过氧化氢的漂白效率不高,可能是由于纸浆里面的金属离子或是微生物产生的生物酶使过氧化氢发生了无效分解。

生物酶是天然的催化剂,生物体内几乎所有的生化反应都是在酶催化条件下进行的。过氧化氢酶和过氧化物酶都是两种广泛存在于生物体内,含血红素(铁卟啉)辅基的氧化还原酶,而它们作用的底物都有过氧化氢。它们的催化反应简示如下:



从两种酶的反应式可以看出,过氧化氢酶只有一种底物,反应生成水和氧气;而过氧化物酶则要两种底物,其反应的实质是:酶催化共体脱氢(氧化),同时催化脱下的氢使 H_2O_2 还原为 H_2O 。在这个反应中,如果只有 H_2O_2 ,没有供体,反应则不能进行。

在废纸浆过氧化氢漂白过程中,要同时获得过氧化物酶对 H_2O_2 降解所需的两种底物,一般比较难实现。而对于过氧化氢酶,其起催化作用只需一种底物 H_2O_2 ,故比较容易实现。因此我们在研究生物酶对废纸浆漂白的的影响时,用过氧化氢酶做为研究对象。

废纸浆容易产生腐浆,其中生长着大量的好氧微生物,如果这些微生物受到外界 H_2O_2 的激发,会加快过氧化氢酶的产生,即使非常少量的微生物也会产生大量的过氧化氢酶,酶分解过氧化氢时产生的氧气又促进了系统中好氧微生物的繁殖,这样就形成了酶在系统内部的恶性循环,从而导致 H_2O_2 的大量分解,使得漂白浆白度下降^[27]。

本部分通过在废纸浆漂白过程中加入过氧化氢酶,研究其不同条件下对废纸浆过氧化氢漂白的的影响。

4.1 实验材料与方法

4.1.1 实验材料

4.1.1.1 废纸浆

广州造纸厂提供, 未漂浆白度: 60.20%ISO

4.1.1.2 过氧化氢酶

Sigma 公司德国进口, 冷冻保存

4.1.2 主要实验仪器及设备

紫外可见光光度计: UV-Vis spectrophotometer (美国安捷伦公司)

4.1.3 实验方法

4.1.3.1 不同 pH 值下过氧化氢酶对过氧化氢分解的影响

采用分光光度法在 25℃ 下测定。反应总体积为 3 mL, 分别为 0.1 mL 酶液和 2.9 mL 含有 10 mmol/L H_2O_2 不同 pH 的缓冲溶液。过氧化氢的分解速率用 8453 型紫外-可见光分光光度计在 240 nm 下测定。

酶活定义为: 在 25℃ 下, 每分钟分解 $1\mu\text{mol } H_2O_2$ 所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{酶活计算: } \frac{E_{240} \times 3}{0.0436 \times E_w} \text{ IU/mg}$$

E_{240} —240nm 处每分钟内吸光度的降低值

E_w —每 0.10ml 所用酶液中含酶的重量(mg)

0.0436—240nm 处 $1\mu\text{mol}$ 过氧化氢的吸光度

3—反应混合液的总体积

4.1.3.2 不同温度下过氧化氢酶对过氧化氢分解的影响

测定方法同 4.1.3.1。

4.1.3.3 生物酶对废纸浆过氧化氢漂白的的影响

主要通过测定纸浆白度和残余过氧化氢的含量这两个指标考察生物酶对废纸浆过氧化氢漂白的的影响。步骤: 称取 10g 绝干废纸浆, 先整合后加入配制好的酶溶液, 混合均匀, 置于密封聚乙烯袋中, 放入恒温水浴中反应。加酶漂白的工艺条件: 浆浓: 10%; Na_2SiO_3 : 3.0%; $MgSO_4$: 0.5%; EDTA: 0.15%; 时间: 1 小时。

漂白终点收集残液测定残余过氧化氢含量; 纸浆洗净后疏解, 抄片, 压榨, 风干, 平衡水分, 测定纸张白度^[47]。

4.1.3.4 漂白浆性能测定及分析

(1) 浆片制备及白度测定

参照 GB8904.2—88 标准，把浆料打散后在 Φ110mm 的布式漏斗上抄成浆片，用滤纸脱水后压平、风干。在白度测定仪上测定浆片的 R457 蓝光反射值(ISO 白度)。

仪器型号：YQ—Z—48B

生产厂商：杭州轻通仪器开发公司

测定标准：GB7974—87，GB7795—87

(2) 漂白效率的计算

漂白效率= $\frac{\text{白度增值}(\%)}{\text{过氧化氢的实际消耗量}(\%)}$

4.2 实验结果与讨论

4.2.1 不同条件下过氧化氢酶对过氧化氢的分解情况

4.2.1.1 pH 值对过氧化氢酶降解过氧化氢的影响

在研究过氧化氢酶对废纸浆过氧化氢漂白的的影响时，首先应考虑过氧化氢酶在不同 pH 值条件下酶活力的大小，结果如表 4-1 及图 4-1 所示。

表 4-1 pH 值对 H₂O₂ 在 240nm 处吸光度变化和过氧化氢酶酶活的影响

Table4-1 Effect of pH on the absorbeney of H₂O₂ at 240nm and activity of CAT

pH 值	240nm 处吸光度降低值	酶活 IU/mg
3	0.03569	1714.90
4.5	0.04744	2279.48
6.8	0.05026	2414.98
9.18	0.04516	2169.93
10	0.04331	2081.03
12	0.00663	318.57

从表 4-1 和图 4-1 可以看出，过氧化氢酶在 pH 值为 6.8 时酶活力最高，达到 2414.98 IU/mg，但是当 pH 值达到 12 的时候，酶活力降低到 318.57 IU/mg，所以在研究过氧化氢酶对废纸浆过氧化氢漂白的的影响时 pH 值不能超过 12。

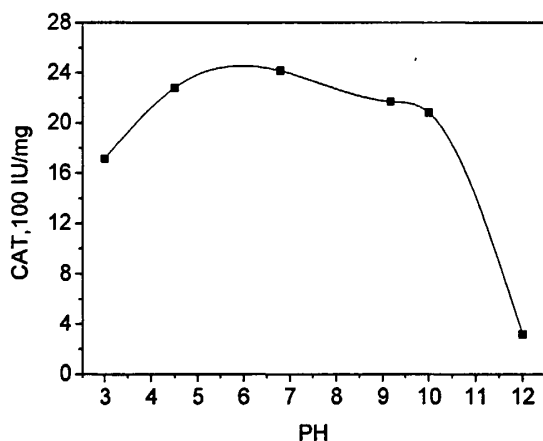


图 4-1 不同 pH 值下过氧化氢酶对过氧化氢分解的影响

Fig.4-1 The effect of CAT on decomposition of H_2O_2 at different pH conditions

4.2.1.2 温度对过氧化氢酶降解过氧化氢的影响

在研究过氧化氢酶对废纸浆过氧化氢漂白的影响时,也要考虑过氧化氢酶在不同温度条件下酶活力的大小,结果如表 4-2 及图 4-2 所示。

表 4-2 温度对 H_2O_2 在 240nm 处吸光度变化和过氧化氢酶酶活的影响Table4-2 Effect of temperature on the absorbeney of H_2O_2 at 240nm and activity of CAT

温度℃	240nm 处吸光度降低值	酶活 IU/mg
25	0.05026	2414.98
40	0.05278	2536.07
50	0.05584	2683.10
60	0.06396	3073.30
80	0.02167	1041.00

从表 4-2 和图 4-2 可以看出过氧化氢酶在 60℃时的活性相对比较大,达到 3073.30 IU/mg,而后随温度升高过氧化氢酶活力下降,当温度上升到 80℃时过氧化氢酶活力下降到 1041.00 IU/mg,因此在研究过氧化氢酶对废纸浆过氧化氢漂白的影响时,漂白温度应不高于 60℃。

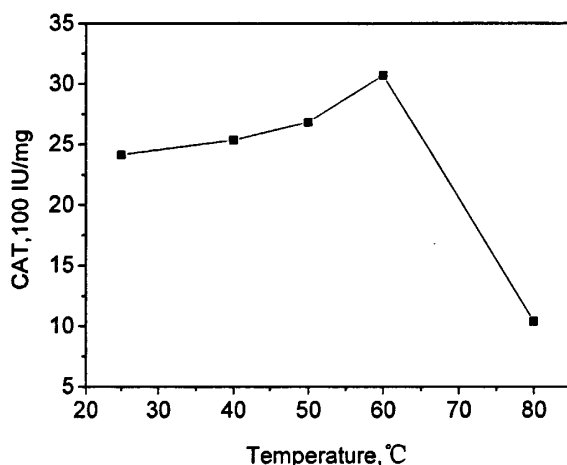


图 4-2 不同温度下过氧化氢酶对过氧化氢分解的影响

Fig.4-2 The effect of CAT on decomposition of H_2O_2 at different temperature conditions

4.2.2 H_2O_2 用量对废纸浆过氧化氢漂白的影响

在其它条件固定不变的情况下,底物浓度对酶反应速度有着很大的影响。米氏学说认为^[48],在底物浓度较低时,酶促反应速度随底物浓度的增加而升高,二者之间近乎成正比关系;在底物浓度较高时,底物浓度增加,酶促反应速度随之升高,但并不显著;当底物浓度很大并达到一定限度时,此时,即使再增加底物浓度,反应速度也不会再上升,只是趋向于某一极限值。但是这种理论只能较好的反映较为简单的酶作用过程,对于较为复杂的酶作用过程则还不能全面的概括和解释。在过氧化氢酶用量、反应时间、反应体系 pH 值和反应温度一定的条件下,底物 H_2O_2 浓度会影响过氧化氢酶在废纸浆 H_2O_2 漂白过程中对 H_2O_2 的降解作用。

反应体系 H_2O_2 用量对过氧化氢酶对废纸浆过氧化氢漂白的影响结果如表 4-3 和图 4-3、图 4-4 所示。

由表 4-3 和图 4-3、图 4-4 可发现,未加底物 H_2O_2 时,由于反应体系中的 NaOH 导致废纸浆存在“碱性发黑”问题,所以白度下降到 58.86%ISO,当底物 H_2O_2 浓度加到 0.5%时,纸浆白度上升的幅度最大,漂白效率也最高。当 H_2O_2 用量逐渐从 0.5%增加到 2.0%时,漂后浆的白度变化不大,而残余 H_2O_2 的量也变化不明显,但是 H_2O_2 实际消耗量却在不断增加,从而造成漂白效率逐渐减少,在 H_2O_2 用量为 2.0%的时候,漂白效率达到

最低,为2.48。随后当 H_2O_2 用量由2.0%增加到5.0%时,纸浆白度升高很快,残余 H_2O_2 的量也增加, H_2O_2 实际消耗量减少,此时漂白效率增加。其原因是高浓度的 H_2O_2 抑制了过氧化氢酶的活性。

表 4-3 在不同 H_2O_2 用量下,过氧化氢酶对过氧化氢漂白的影响

Table4-3 Effects of CAT on hydrogen peroxide bleaching at different H_2O_2 dosage conditions

H_2O_2 浓度(%)	白度(%ISO)	白度增值 (%ISO)	H_2O_2 残余量 (%,对绝干浆)	H_2O_2 实际消耗量 (%,对绝干浆)	漂白效率
0	58.86	0	0	0	0
0.5	62.68	3.82	0.13	0.37	10.32
1	63.16	4.30	0.17	0.83	5.18
2	63.34	4.48	0.19	1.81	2.48
3	64.43	5.57	0.89	2.11	2.64
5	67.14	8.28	3.22	1.78	4.65

注:实验条件为:浆浓:10%; NaOH: 0.3%; Na_2SiO_3 : 3.0%; MgSO_4 : 0.5%; EDTA: 0.15%;
酶用量: 8.37IU/g 绝干浆; 60℃; 1h。

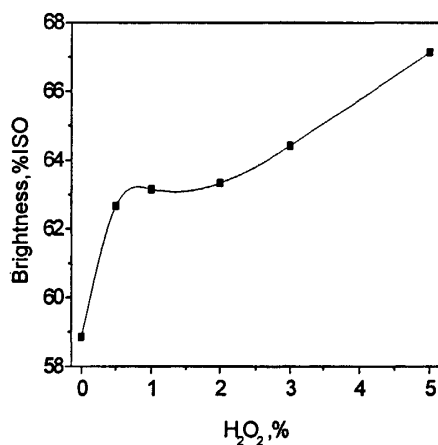


图 4-3 过氧化氢用量对纸浆白度的影响

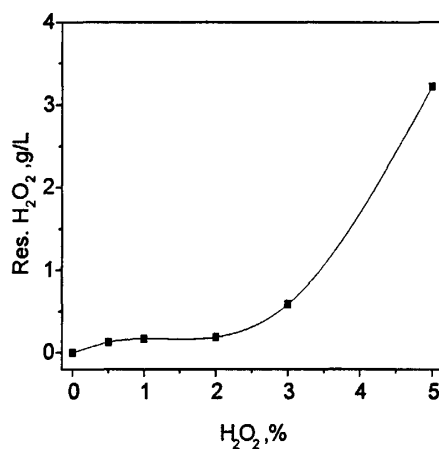


图 4-4 过氧化氢用量对残余过氧化氢的影响

Fig4-3 Effect of H_2O_2 dosage on brightness of pulp

Fig4-4 Effect of H_2O_2 dosage on residual H_2O_2

4.2.3 NaOH 用量对废纸浆过氧化氢漂白的影响

众所周知，H₂O₂ 漂白中有效成分是 H₂O₂ 在碱性条件下离解产生的 HOO⁻，HOO⁻ 的生成速度和数量将直接影响最终的漂白效果，所以必须通过添加 NaOH 用量来提高反应体系的 pH 值。而酶对环境的酸碱度十分敏感，每一种酶只有在一定限度的 pH 值范围内才表现其活性，超过这个范围酶即失活。在 H₂O₂ 漂白中，随着 NaOH 用量逐渐增大，反应体系中的 pH 值也逐渐增大，当 pH 值超过一定范围，就会让过氧化氢酶失活，使其无法降解过氧化氢，从而使纸浆白度增加，提高了漂白效率。

NaOH 用量对废纸浆 H₂O₂ 漂白的影响结果如表 4-4、图 4-5 和图 4-6 所示。

表 4-4 在不同的 NaOH 用量下，过氧化氢酶对过氧化氢漂白的影响

Table4-4 Effects of CAT on hydrogen peroxide bleaching at different NaOH dosage conditions

NaOH 浓度(%)	白度(%ISO)	白度增值 (%ISO)	H ₂ O ₂ 残余量 (%,对绝干浆)	H ₂ O ₂ 实际消耗量 (%,对绝干浆)	漂白效率
0	63.25	0	0.25	1.75	0
0.3	63.34	0.09	0.19	1.81	0.05
0.9	64.03	0.78	0.40	1.60	0.49
1.5	65.02	1.77	0.57	1.43	1.24
3	66.74	3.49	0.88	1.12	3.12
4	67.38	4.13	0.59	1.41	2.93

注：实验条件为：浆浓：10%；H₂O₂：2%；Na₂SiO₃：3.0%；MgSO₄：0.5%；EDTA：0.15%；酶用量：8.37IU/g 绝干浆；60℃；1h。

表 4-4、图 4-5 和图 4-6 表明，当 NaOH 用量逐渐增加时，随着 pH 值的上升，H₂O₂ 消耗量不断减少，但是漂后浆的白度却逐渐升高，漂白效率也随之升高，在 NaOH 用量达到 3.0%时漂白效率最高。当 NaOH 浓度为 0.3%时，H₂O₂ 实际消耗量已高达 1.81%，而白度只提高了 0.09%ISO，漂白效率仅为 0.05，这是因为此时 H₂O₂ 基本上被过氧化氢酶降解完了，未能发挥其漂白作用。当 NaOH 浓度为 3%时，H₂O₂ 实际消耗量为 1.12%，而白度提高了 3.49%ISO，漂白效率为 3.12，这是因为此时 pH 值超过了 12，使过氧化氢酶失活，使其无法降解过氧化氢。当 NaOH 浓度为 4%时，H₂O₂ 实际消耗量却增加了，为 1.41%，这可能是因为 NaOH 用量太高而使 H₂O₂ 产生无效分解，从而导致 H₂O₂ 实际消耗量增加，虽然白度升高了，但是漂白效率减低了。

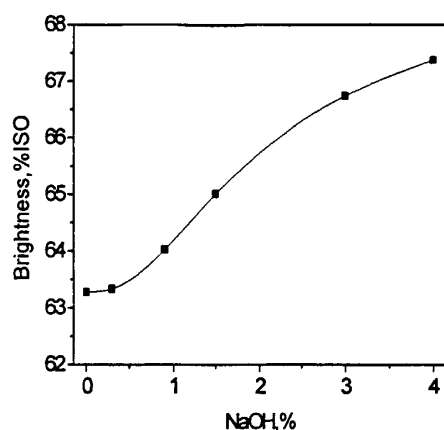


图 4-5 NaOH 用量对纸浆白度的影响

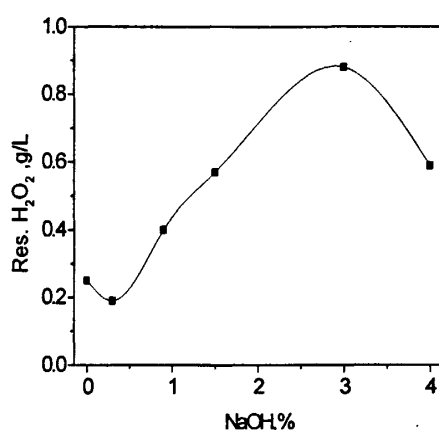


图 4-6 NaOH 用量对残余过氧化氢的影响

Fig4-5 Effect of NaOH dosage on brightness of pulp Fig4-6 Effect of NaOH dosage on residual H_2O_2

4.2.4 过氧化氢酶用量对废纸浆过氧化氢漂白的影响

在反应时间、反应体系 pH 值、反应温度和纸浆浓度一定的情况下，过氧化氢酶用量对废纸浆 H_2O_2 漂白的影响很大，酶用量的大小决定了反应体系中酶的浓度的大小，而酶浓度是决定反应速度的一个重要因素。一般认为，随着酶量的增加，过氧化氢酶对过氧化氢的酶解作用会越来越强烈，时间也会相应减少。当过氧化氢酶用量较低时，其对过氧化氢进行有限酶解，酶解作用主要发生在过氧化氢刚开始加入时，随着过氧化氢加入的增多，高浓度的过氧化氢会使过氧化氢酶失活；但是当过氧化氢酶用量较大时，其对过氧化氢进行强烈的酶解，加入过氧化氢越多，降解越厉害。

过氧化氢酶加入量对废纸浆 H_2O_2 漂白的影响如表 4-5、图 4-7 和图 4-8 所示。

由表 4-5，图 4-7 和图 4-8 可以看出过氧化氢酶用量增加对废纸浆漂白的影响。随着过氧化氢酶用量的增加，纸浆白度和残余过氧化氢均呈现出下降的趋势，漂白效率也随之降低。从未加入酶到酶加入量为 0.84 IU/g 绝干浆，纸浆白度和漂白效率下降幅度最快，而实际消耗过氧化氢的量增加幅度最大，随着酶用量再增加，白度和漂白效率下降渐缓，实际消耗过氧化氢的量增加也渐缓。当酶用量增加到 12.56 IU/g 绝干浆时，纸浆白度由 65.78%ISO 下降为 62.77%ISO，残余过氧化氢由 1.32%降低到 0.1%，漂白效率降低幅度最大。

表 4-5 过氧化氢酶加入量对废纸浆过氧化氢漂白的影响

Table4-5 Effects of CAT dosage on hydrogen peroxide bleaching of recycled pulp

酶用量 (IU/g 绝干浆)	白度(%ISO)	白度增值 (%ISO)	H ₂ O ₂ 残余量 (%,对绝干浆)	H ₂ O ₂ 实际消耗量 (%,对绝干浆)	漂白效率
0	65.78	0	1.32	0.68	0
0.84	65.24	- 0.54	1.02	0.98	- 0.55
1.67	65.00	- 0.78	0.92	1.08	- 0.72
4.19	64.25	- 1.53	0.54	1.46	- 1.05
8.37	63.34	- 2.44	0.19	1.81	- 1.35
12.56	62.77	- 3.01	0.10	1.9	- 1.58

注：实验条件为：浆浓：10%；H₂O₂：2%；NaOH：0.3%；Na₂SiO₃：3.0%；MgSO₄：0.5%；EDTA：0.15%；60℃；1h。

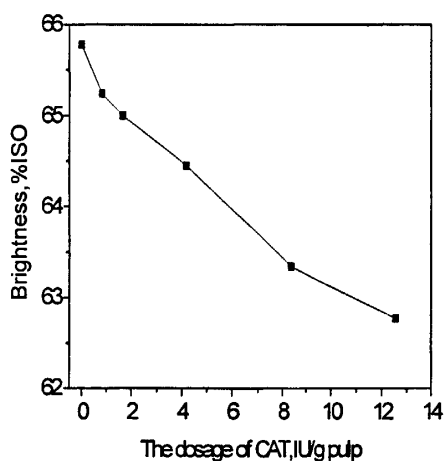


图 4-7 过氧化氢酶用量对白度的影响

Fig4-7 Effect of CAT dosage on brightness of pulp

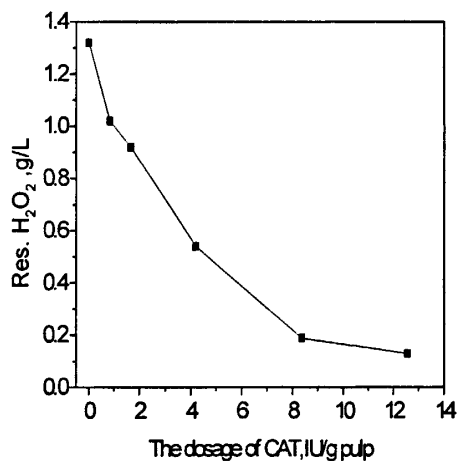


图 4-8 过氧化氢酶用量对残余过氧化氢的影响

Fig4-8 Effect of CAT dosage on residual H₂O₂

4. 2. 5 温度对废纸浆过氧化氢漂白的影响

温度对酶的影响是多方面的。和一般化学反应相似，在较低温度范围内，酶的活力随温度的升高而提高，酶反应速度也随之加快；在较高温度时，随着温度的升高，酶的构象、参与酶反应的功能基团的解离状态、酶与底物的结合力等都要发生变化；在更高的

温度下,酶蛋白的构象发生重大变化,酶变性失去活性。温度升高,酶催化的速度和酶失活的速度同时提高,在某一临界温度,二者之和达到一个最大值,即酶反应速度达到最大值,这个临界温度就是酶的最适温度。每种酶在一定条件下,都有其一定的最适温度,其值受到底物、反应时间等诸多因素的影响。在过氧化氢酶用量、反应时间、反应体系pH值和纸浆浓度一定的情况下,反应温度对废纸浆 H_2O_2 漂白过程中的过氧化氢酶也会产生影响。

漂白温度是 H_2O_2 漂白的重要控制因素,为此探讨了不同漂白温度对废纸浆过氧化氢漂白的影响,结果如表 4-6 和图 1-6、图 4-9、图 4-10 所示。

表 4-6 不同的温度下,过氧化氢酶对过氧化氢漂白的影响

Table4-6 Effects of CAT on hydrogen peroxide bleaching at different temperature conditions

温度℃	白度(%ISO)	白度增值 (%ISO)	H_2O_2 残余量 (%,对绝干浆)	H_2O_2 实际消耗量 (%,对绝干浆)	漂白效率
50	63.16	2.96	0.38	1.62	1.83
60	63.34	3.14	0.19	1.81	1.73
70	64.77	4.57	0.54	1.46	3.13
80	65.78	5.58	0.67	1.33	4.20
90	66.25	6.05	0.72	1.28	4.73

注:实验条件为:浆浓:10%; H_2O_2 : 2%; NaOH: 0.3%; Na_2SiO_3 : 3.0%; $MgSO_4$: 0.5%; EDTA: 0.15%; 酶用量: 8.37IU/g 绝干浆; 60℃; 1h。

从表 4-6,图 4-9 和图 4-10 中可以看出,反应温度由 50℃升至 60℃,纸浆的白度升高幅度不大,只增加 0.18%ISO,而残余过氧化氢量却降低了 0.19%,漂白效率也从 1.83 降低到 1.73。随着温度的升高,纸浆白度随之升高,但升高幅度逐渐降低,到 90℃时,纸浆白度最高为 66.25%ISO,残余过氧化氢量也升 0.72%,实际消耗过氧化氢量降至 1.28%,漂白效率增至 4.73,由此可以看出,温度升高能使过氧化氢酶变性,从而失去降解过氧化氢的能力,使 H_2O_2 的漂白能力提高。其原因是:温度对酶的活性、酶的构象、参与酶反应的功能基团的解离状态、酶与底物的结合力等都会产生影响,在不同的温度下,过氧化氢酶对 H_2O_2 的降解作用的强度略有不同,在低于 60℃时,过氧化氢酶的活性得以表现,60℃是其对 H_2O_2 的降解作用相对最强的温度。

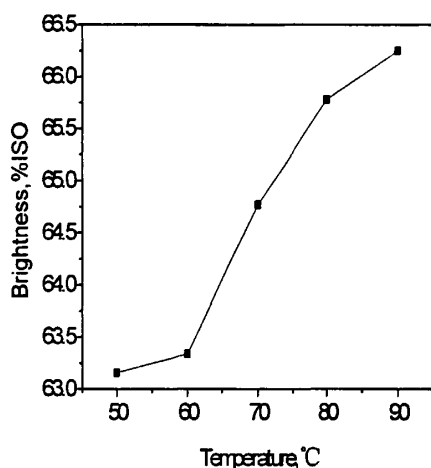


图 4-9 温度对纸浆白度的影响

Fig4-9 Effect of temperature on brightness of pulp

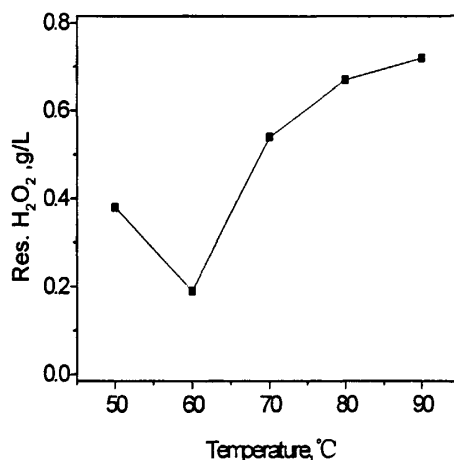


图 4-10 温度对残余过氧化氢的影响

Fig4-10 Effect of temperature on residual H₂O₂

4.2.6 时间对废纸浆过氧化氢漂白的影响

在过氧化氢酶用量、H₂O₂用量、反应体系 pH 值和温度一定的情况下,反应时间对过氧化氢酶降解 H₂O₂ 作用有较大的影响,一般来说,过氧化氢酶降解 H₂O₂ 是非常迅速的。反应时间对废纸浆过氧化氢漂白的的影响,其结果如表 4-7,图 4-11 和图 4-12 所示。

表 4-7 不同的反应时间下,过氧化氢酶对过氧化氢漂白的的影响

Table4-7 Effects of CAT on hydrogen peroxide bleaching at different reaction time

时间 min	白度(%ISO)	白度增值 (%ISO)	H ₂ O ₂ 残余量 (%,对绝干浆)	H ₂ O ₂ 实际消耗量 (%,对绝干浆)	漂白效率
0	60.20	0	2.00	0	0
30	62.62	2.42	0.50	1.50	1.61
60	63.34	3.14	0.19	1.81	1.73
90	63.28	3.08	0.04	1.96	1.57
120	63.31	3.11	0.008	1.992	1.56

注:实验条件为:浆浓: 10%; H₂O₂: 2%; NaOH: 0.3%; Na₂SiO₃: 3.0%; MgSO₄: 0.5%; EDTA: 0.15%; 酶用量: 8.37 IU/g 绝干浆; 60°C; 1h。

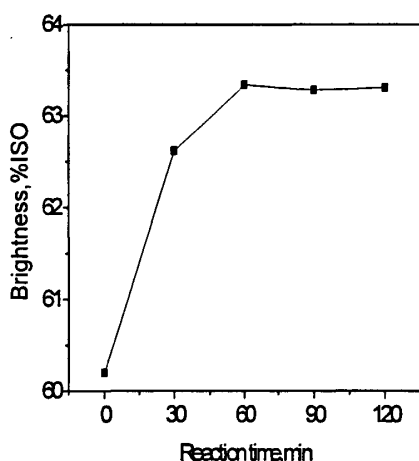


图 4-11 反应时间对纸浆白度的影响

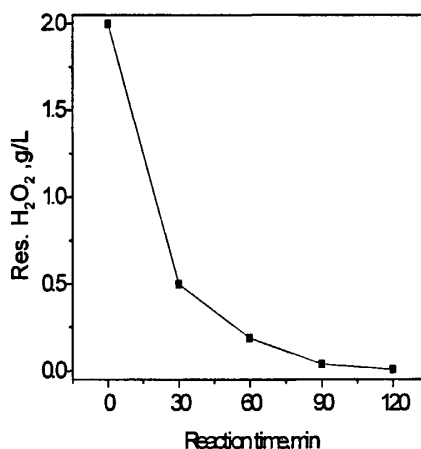


图 4-12 反应时间对残余过氧化氢的影响

Fig4-11 Effect of reaction time on brightness of pulp

Fig4-12 Effect of reaction time on residual H₂O₂

由表 4-7, 图 4-11 和图 4-12 可以看出, 在过氧化氢酶用量不变的情况下, 漂白的前 60min, 随着时间的延长, 纸浆白度增加很快, 而残余 H₂O₂ 的量下降迅速, 漂白效率增加。当时间由 60min 增加至 120min, 纸浆白度变化不大, 而残余 H₂O₂ 的量却在不断减少, 可见漂白效率随时间的增加而减少。其原因是: 随着时间的延长, 过氧化氢酶降解了剩余的 H₂O₂, 使 H₂O₂ 逐渐减少, 故使其无法继续漂白纸浆。

4.2.7 漂前有无预处理对废纸浆过氧化氢漂白的影响

由于原料自身以及化学药品中含有少量的 Mn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺ 等重金属离子, 这些金属离子在 H₂O₂ 漂白时易使 H₂O₂ 在短时间内发生无效分解, 增加 H₂O₂ 消耗。为了更好地了解过氧化氢酶对 H₂O₂ 产生无效分解的效果, 所以要在 H₂O₂ 漂白前对浆料进行预处理。预处理条件为: 浆浓: 10%; EDTA: 0.15%; pH: 3.0; 温度: 70℃; 处理时间: 30min。漂白过程工艺条件为: 浆浓: 10%; H₂O₂: 2%; NaOH: 0.3%; Na₂SiO₃: 3.0%; MgSO₄: 0.5%; EDTA: 0.15%; 酶用量: 8.37 IU/g 绝干浆; 60℃; 1h。

漂前预处理对 H₂O₂ 漂白有很重要的影响, 为此分别就漂前有无预处理及漂白过程中加与不加螯合剂对 H₂O₂ 漂白产生的不同效果进行比较, 其漂白方式如下: (I) 漂白前未经过任何预处理, 漂白时不加螯合剂 EDTA; (II) 漂白前未经过任何预处理, 漂白时加螯合剂 EDTA; (III) 漂白前进行预处理, 漂白时不加螯合剂 EDTA; (IV) 漂白前进

行预处理，漂白时加螯合剂 EDTA；

在上面四种漂白方式下加入过氧化氢酶，以研究过氧化氢酶对过氧化氢漂白的影响，其结果如表 4-8 和图 4-13、图 4-14 所示。

表 4-8 不同漂白方式下，过氧化氢酶对过氧化氢漂白的影响

Table4-8 Effects of CAT on hydrogen peroxide bleaching with different bleaching mothod

漂白方式	未加酶白	加酶白度	白度增值	未加酶 H ₂ O ₂ 残	加酶 H ₂ O ₂ 残	H ₂ O ₂ 残余量变
	度(%ISO)	(%ISO)	(%ISO)	余量(%对 绝干浆)	余量(%对 绝干浆)	化值(%对 绝干浆)
I	64.15	62.77	- 1.38	1.34	0.5	- 0.84
II	65.79	65.02	- 0.77	1.25	0.75	- 0.5
III	65.78	63.34	- 2.44	1.32	0.19	- 1.13
IV	65.86	65.33	- 0.53	1.58	1.1	- 0.48

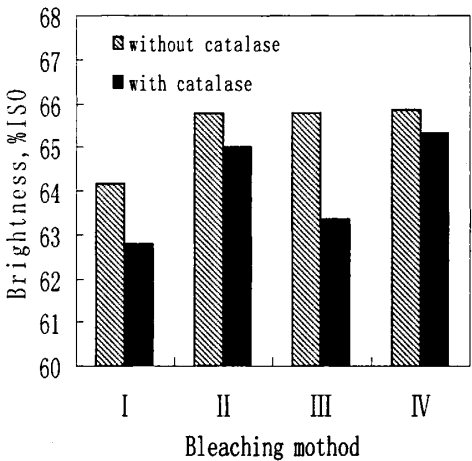


图 4-13 不同漂白方式对纸浆白度的影响
Fig4-13 Effect of different bleaching mothod
on brightness of pulp

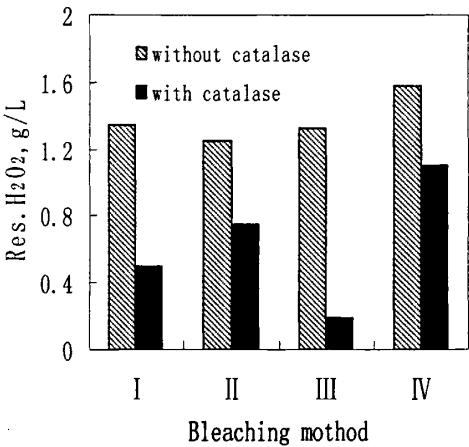


图 4-14 不同漂白方式对残余过氧化氢的量的影响
Fig4-14 Effect of different bleaching mothod
on residual H₂O₂

表 4-8、图 4-13 和图 4-14 表明，漂白前未经过任何预处理，漂白时不加螯合剂 EDTA 情况下，当加入过氧化氢酶时，纸浆白度比不加过氧化氢酶时减少 1.38%ISO，残余过氧化氢的量也减少 0.84%；而在漂白前未经过任何预处理，漂白时加螯合剂 EDTA 的情况下，加入过氧化氢酶纸浆白度比不加时减少 2.44%ISO，残余过氧化氢的量减少了 1.13%；由此可以看出，漂白前未经过任何预处理，漂白时加螯合剂 EDTA 的纸浆白度

和残余过氧化氢的量的减少值都比不加螯合剂 EDTA 要高, 其原因是: 纸浆中的金属离子参与过氧化氢的分解, 从而导致纸浆白度降低; 在漂白前进行预处理, 漂白时不加螯合剂 EDTA 的情况下, 当加入过氧化氢酶时, 纸浆白度比不加过氧化氢酶时减少 0.77%ISO, 残余过氧化氢的量也减少 0.5%; 而在漂白前进行预处理, 漂白时加螯合剂 EDTA 的情况下, 加入过氧化氢酶纸浆白度比不加时减少 0.53%ISO, 残余过氧化氢的量减少了 0.48%; 可见, 加螯合剂 EDTA 的纸浆白度和残余过氧化氢的量的减少值都比未加入加螯合剂 EDTA 的要低, 这说明螯合剂控制了金属离子对过氧化氢的分解, 同时还可能抑制了过氧化氢酶的部分活性; 在漂白过程中加螯合剂的情况下, 漂前是否进行预处理对纸浆白度和残余过氧化氢都没有太大的影响。

4.3 本章小结

1. 过氧化氢酶酶活最适 pH 值为 6.8, pH 值超过 10 时酶活骤降, 最适温度 60℃, 当温度上升至 80℃时, 酶活降低到原来的 1/3 左右。

2. 通过研究不同条件下过氧化氢酶对废纸浆漂白的影响, 可以得到如下结论:

(1) 当 H_2O_2 用量达到 2.0% 时, 纸浆漂白效率最低, 这说明过氧化氢酶降解了 H_2O_2 , 当 H_2O_2 用量大于 2.0% 时, 纸浆漂白效率逐渐增加, 其原因是高浓度的 H_2O_2 抑制了过氧化氢酶的活性。

(2) 当 NaOH 用量小于 0.3% 时, 纸浆漂白效率最低, 这说明 H_2O_2 基本上被过氧化氢酶降解完了, 随着 NaOH 用量的增加, 纸浆漂白效率也随之增加, 当 NaOH 用量达到 3.0% 时, 漂白效率达到最大, 其原因是 pH 值太高使过氧化氢酶失活。

(3) 从未加入酶到酶加入量为 0.84 IU/g 绝干浆, 纸浆白度和漂白效率下降幅度最快, 随着酶用量再增加, 白度和漂白效率下降渐缓, 当酶用量增加到 12.56 IU/g 绝干浆时, 纸浆漂白效率降低幅度最大。

(4) 当温度在 60℃ 以下时, 纸浆漂白效率最差, 当温度大于 60℃ 时, 纸浆白度和漂白效率都增加, 这说明温度高使过氧化氢酶产生蛋白质变性。

(5) 在过氧化氢酶用量不变的情况下, 漂白的 前 60min, 随着时间的延长, 纸浆白度迅速增加, 60min 以后, 纸浆白度增加不大, 但是残余 H_2O_2 的量却在不断减少, 这说明随着时间的延长, 过氧化氢酶降解了剩余的 H_2O_2 , 使其无法继续漂白纸浆。

(6) 漂白前未经过任何预处理, 漂白时加螯合剂 EDTA 的纸浆白度和残余过氧化氢的

量的减少值都比不加螯合剂的要高, 其原因是: 纸浆中的金属离子参与过氧化氢的分解, 从而导致纸浆白度降低; 在漂白前进行预处理, 漂白时加螯合剂 EDTA 的纸浆白度和残余过氧化氢的量的减少值都比未加入加螯合剂的要低, 这说明螯合剂控制了金属离子对过氧化氢的分解, 同时还可能抑制了过氧化氢酶部分活性; 而在漂白过程中加螯合剂的情况下, 漂前是否进行预处理对纸浆白度和残余过氧化氢都没有太大的影响。

第五章 结论

本论文对生物酶对废纸浆过氧化氢漂白的影响进行研究,主要研究包括产过氧化氢酶菌株的筛选、菌种的部分鉴定、产酶特性分析、过氧化氢酶产生菌降解 H_2O_2 应用实验以及过氧化氢酶对废纸浆过氧化氢漂白的影响。主要结论如下:

1. 从腐浆中筛选到一株产酶相对较高的真菌 C-1, 经初步鉴定属于半知菌亚门(Deuteromycotina)丝孢纲(Hyphomycetes)丛梗孢目(Moniliales)丛梗孢科(Moniliaceae)曲霉属(*Aspergillus*)黑曲霉类(*Aspergillus niger*)。

2. 从腐浆中筛选到两株产酶相对较高的细菌 B-5 和 D-6, 经初步鉴定, 根据培养特征和生理生化特征, 菌株 D-6 属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 菌株 B-5 属于 *Bacillus* 属, 与其 16S rDNA 序列相似性最高的菌株有 *Bacillus subtilis* Fs32b, *Bacillus subtilis* D53, *Bacillus subtilis* CICC10028 及 *Bacillus subtilis* H-1, 相似性均为 99%。

3. 实验结果表明, 菌株 C-1 的最佳生长条件: 时间: 48h; 温度: 32℃; pH: 5~7; NaCl: 2.0~5.0%。最佳产酶条件: 时间: 72h; 温度: 32℃; pH: 6.0; NaCl: 4.0~6.0%。最高产酶量为 602.13 IU/mL。

4. 实验结果表明, 菌株 B-5 的最佳生长条件: 温度: 42℃; pH: 8.5; NaCl: 4.0%。最佳产酶条件: 时间: 48h; 温度: 42℃; pH: 8.0; NaCl: 3.0~5.0%, 最高产酶量为 1023.3 IU/mL。而菌株 D-6 的最佳生长条件: 温度: 42℃; pH: 7.5; NaCl: 5.0%。最佳产酶条件: 时间: 48h; 温度: 37℃; pH: 7.5; NaCl: 3.0~5.0%, 最高产酶量为 778.3 IU/mL。

5. *B. subtilis* B-5 所产过氧化氢酶最适反应温度为 45℃, 在 60℃ 以下稳定性较好; 最适 pH 值 9.0, 在 pH 6.0~9.0 有较好的稳定性; 金属离子中 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 对酶有较弱的激活作用, 而 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 则对酶有较强的抑制作用。

6. 废纸浆过氧化氢漂白的生物降解试验表明, 菌株 *B. subtilis* B-5 对废纸浆过氧化氢漂白产生一定的影响, 白度降低了 0.92% ISO, 残余过氧化氢的量降低了 0.58%。而菌株 *B. subtilis* B-5 所产过氧化氢酶粗酶液对过氧化氢漂白产生较大的影响, 白度降低了 1.36% ISO, 残余过氧化氢的量降低了 1.069%。

7. 通过研究不同条件下过氧化氢酶对废纸浆漂白的影响, 可以得到如下结论:

(1) 当 H_2O_2 用量达到 2.0% 时, 纸浆漂白效率最低, 这说明过氧化氢酶降解了 H_2O_2 ,

当 H_2O_2 用量大于 2.0% 时, 纸浆漂白效率逐渐增加, 其原因是高浓度的 H_2O_2 抑制了过氧化氢酶的活性。

(2) 当 NaOH 用量小于 0.3% 时, 纸浆漂白效率最低, 这说明 H_2O_2 基本上被过氧化氢酶降解完了, 随着 NaOH 用量的增加, 纸浆漂白效率也随之增加, 当 NaOH 用量达到 3.0% 时, 漂白效率达到最大, 其原因是 pH 值太高使过氧化氢酶失活。

(3) 从未加入酶到酶加入量为 0.84 IU/g 绝干浆, 纸浆白度和漂白效率下降幅度最快, 随着酶用量再增加, 白度和漂白效率下降渐缓, 当酶用量增加到 12.56 IU/g 绝干浆时, 纸浆漂白效率降低幅度最大。

(4) 当温度在 60°C 以下时, 纸浆漂白效率最差, 当温度大于 60°C 时, 纸浆白度和漂白效率都增加, 这说明温度高使过氧化氢酶产生蛋白质变性。

(5) 在过氧化氢酶用量不变的情况下, 漂白的前 60min, 随着时间的延长, 纸浆白度迅速增加, 60min 以后, 纸浆白度增加不大, 但是残余 H_2O_2 的量却在不断减少, 这说明随着时间的延长, 过氧化氢酶降解了剩余的 H_2O_2 , 使其无法继续漂白纸浆。

(6) 漂白前未经过任何预处理, 漂白时加螯合剂 EDTA 的纸浆白度和残余过氧化氢的量的减少值都比不加螯合剂的要高, 其原因是: 纸浆中的金属离子参与过氧化氢的分解, 从而导致纸浆白度降低; 在漂白前进行预处理, 漂白时加螯合剂 EDTA 的纸浆白度和残余过氧化氢的量的减少值都比未加入加螯合剂的要低, 这说明螯合剂控制了金属离子对过氧化氢的分解, 同时还可能抑制了过氧化氢酶部分活性; 而在漂白过程中加螯合剂的情况下, 漂前是否进行预处理对纸浆白度和残余过氧化氢都没有太大的影响。

对今后工作的建议

1. 对枯草芽孢杆菌所产过氧化氢酶粗酶液进行分离纯化, 以获得纯度比较高的过氧化氢酶, 进一步研究其对废纸浆过氧化氢漂白的影响。

2. 进一步研究过氧化氢酶对过氧化氢的分解机理, 并且通过添加合适的防腐剂和杀菌剂抑制过氧化氢酶对 H_2O_2 的无效分解, 提高漂白效率。

本论文的创新之处

1. 腐浆中过氧化氢酶产生菌的分离鉴定
2. 废纸浆过氧化氢漂白的生物降解研究。

参考文献

- [1] 陈嘉翔, 废纸制浆技术的研究进展, 中国造纸, 2003, 22(2), 43~48
- [2] 王秀英, 废纸回收利用技术的现状与未来发展方向探讨, 林业科技情报, 2006, 38(3), 110~111
- [3] 高玉杰, 废纸再生实用技术, 北京, 化学工业出版社, 2003, 1~2
- [4] 刘昌玲, 王国庆, 细菌过氧化氢酶的分离、结晶及性质, 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(5), 380~383
- [5] Donrd W, Jay R, Photoinduced oxidation of Microperoxidase-8: Generation of Ferryl and Cation-Radical Porphyrins, J Am Chem Soc, 1996, 116, 117
- [6] Sumner J B, Dounce A L, Purification and characterization of a thermostable catalase from culture broth of *Thermoascus aurantiacus*, J Biol Chem, 1937, 121, 417~424
- [7] Göth L, Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture, Clin Chim Acta, 1991, 196, 143
- [8] 张闻, 罗勤慧, 锰过氧化氢酶及其模型物研究进展, 化学通报, 2000, (10), 4~7
- [9] Marcel Z, Franz K, Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis, Progress in bio- physics and molecular biology, 1999, 72, 19~66
- [10] Jacek S, Loewen P C, Diversity of properties among catalases, Archives of biochemistry and biophysics, 2002, 401, 145~154
- [11] 姜厚理, 宋占军, 刘炳玉, 偏最小二乘红外光谱法及其对三种过氧化氢酶二级结构的测定, 光谱学与光谱分析, 1996, 16(2), 29~33
- [12] Benjaphom P, Paiboon V, Skom M, The role of a bifunctional catalase-peroxidase KatA in protection of *Agrobacterium tumefaciens* from menadione toxicity, FEMS Microbiology Letters, 2004, 232, 217~223
- [13] Dismukes G C, Manganese enzymes with binuclear active sites, Chem. Rev, 1996, 96(7), 2909~2926
- [14] Meier A E, Whittaker M M, Whittaker J W, EPR polarization studies on Mn-catalase

- from lactobacillus plantarum, Biochemistry, 1996, 35(1), 348~360
- [15] Frank V, Eva V, James F D, Dirk I, The role of active oxygen species in plant signal transduction, Plant Science, 2001, 161, 405~414
- [16] 陈嘉翔, 废纸回用时发生腐浆问题的来龙去脉, 中华纸业, 2004, 25(1), 30~33
- [17] 高培基, 王祖农, 造纸厂“腐浆”生成原因的分析 and 药物防治试验, 中华纸业, 1998, 4, 39~40
- [18] Safade T L, Tacking the slime problem in a paper mill. Progress in Technology and Industry, Sept. 1988, 280~285
- [19] Vaisanen O H, et al, Structure and composition of biological slimes on paper and board machines, Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(2), 641~655
- [20] Rowbottom R S, Risks of bacterial hydrogen generation in white water systems, Tappi J, 1993, 76, 97~98
- [21] Rochibaud W T, Controlling anaerobic bacteria to improve product quality and mill safety, Tappi J, Feb. 1991, 74(2), 149~153
- [22] David R Jones, Catalase control a review[C], Proceedings of the 92nd PAPTAC Annual Meeting, Montreal(QC), 2006, 156
- [23] Linda R Robertson, et al, Increasing bleach plant efficiency through control of catalase and peroxidase[J], Tappi J. , 1999, 82(6), 137
- [24] Bobby N G, Dan Davies, Methods for controlling catalase in a deink pulp mill[J], Tappi J. , 1997, 80(4), 198
- [25] Prusad D Y, Using catalase activity to measure microbiological activity in pulp and Paper systems[J], Tappi J. , 1989, 72(1), 135
- [26] Sundblad P, Mattila P, Hydrogen peroxide decomposition in deinking mill [J], Pulp and Paper Canada, 2001, 102(5), 46
- [27] 刘洪斌, 杨淑蕙, 过氧化氢酶的检测、控制和应用, 中国造纸, 2007, 26(1), 49~51
- [28] Calland G, Achieving a deinked pulp with high brightness[J], Paper Technology, 1989, 12, 28
- [29] John D Kronis, Methods for controlling catalase in a deinking mill[C], Proceedings of the 82nd PAPTAC Annual Meeting, Montreal(Qc), 1996, 21

- [30] Shashank Bharati, Kevin Ryan, New broine chemistry for efective VFA control, catalase control and bidflm elimination[J], Appita J., 2003, 56(6), 426
- [31] Per Sundblad, Catalase and residual peroxide online mearsurement with CAT-5000 at Sotton Paper mill[C], Proceedings of the 88th PAPTAC Annual Meeting, Montreal(Qc), 2002, 172
- [32] Stewart P S, et al, Analysis of biocide transport limitation in an artificial biofilm system of Applied Microbiology, 1998, 85, 495~500
- [33] Bajpai P, Application of enzymes in the pulp and paper industry Bjotechnology Progress, 1999, 15, 147~157
- [34] 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
- [35] 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, 2002, 28(2), 11~14
- [36] 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, Enzyme and Microb Technol, 1995, 17, 336~339
- [37] Venkateshwaran G, Somashekar D, Prakash M H, et al, Production and utilization of catalase using *Saccharomyces cerevisiae*, Process Biochem, 1999, 34, 187~191
- [38] Nishikawa Y, Kawata Y, Nagai J, Effect of triton X-10 on catalase production by *Aspergillus terreus* IFO 6123[J], J Fermentat Bioeng, 1993, 76, 235~236
- [39] 钱嘉渊 译, 酶的测定方法, 北京, 中国轻工业出版社, 1992, 8, 186~188
- [40] 钱存柔, 黄仪秀 主编, 微生物学实验教程, 北京, 北京大学出版社, 2000, 85~96
- [41] R.E.布坎南, N.E.吉本斯 等 编, 伯杰细菌鉴定手册, 第八版, 北京, 科学出版社, 1984, 12, 722~735
- [42] 东秀珠, 蔡妙英 等 编著, 常见细菌系统鉴定手册, 北京, 科学出版社, 2001, 2, 62~65
- [43] Venkateshwaran G, Somashekar D, Prakash M H, et al, Production and utilization of catalase using *Saccharomyce cerevisiae*, Process Biochem, 1999, 34, 187~191
- [44] Fiedurek J, Gromada A, Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger*

- using unconventional oxygenation of culture, J Appl Microbiol, 2000, 89, 85~89
- [45] Liu J Z, Huang Y Y, Liu J, et al, Effect of metal ions simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger*, Lett in Appl Micro, 2001, 32, 16~19
- [46] 赵亚华, 高向阳, 生物化学与分子生物学实验技术教程, 北京, 高等教育出版社, 2005, 287~297
- [47] 石淑兰, 何福望, 纸浆造纸分析与检测, 北京, 中国轻工业出版社, 2003, 5, 360~361
- [48] 邹国林, 朱汝璠 编著, 酶学, 武汉, 武汉大学出版社, 1997, 1, 74~76, 125

附 录

1. 菌株 B-5 的 16SrDNA 全序（共 984bp）

GGCGATTGCGGGACAGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGC
TCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGA
CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGG
TTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATT
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGA
ATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
GGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAG
GGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC
TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCC
TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC
TGAAACTCAAAGGAATTGACAGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA

2. Results of Blast

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
DQ923482.1	Bacillus subtilis strain D53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1779	1779	98%	0.0	99%	
AY881638.1	Bacillus subtilis strain CICC10028 16S ribosomal RNA gene, partial se	1779	1779	98%	0.0	99%	
EU127297.1	Bacillus subtilis strain H-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	98%	0.0	99%	
AB301009.1	Bacillus subtilis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: GH38	1777	1777	98%	0.0	99%	
EF541143.1	Bacillus subtilis strain Fs32b 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1777	1777	98%	0.0	99%	
EF532601.1	Bacillus subtilis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1777	1777	99%	0.0	99%	

3. 菌株 B-5 与 *Bacillus subtilis* Fs32b 的同源性比较

Bacillus subtilis subsp. *subtilis* Fs32b, complete genome, Length=1016

Score = 1777 bits (962), Expect = 0.0

Identities = 963/964 (99%), Gaps = 0/964 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query	21	ATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT	80
Sbjct	40	ATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT	99
Query	81	GAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT	140
Sbjct	100	GAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT	159
Query	141	ACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGTGCGTTCCGGCTACCACTTA	200
Sbjct	160	ACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGTGCGTTCCGGCTACCACTTA	219
Query	201	CAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG	260
Sbjct	220	CAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG	279
Query	261	CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA	320
Sbjct	280	CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA	339
Query	321	CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG	380
Sbjct	340	CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG	399
Query	381	TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTC	440
Sbjct	400	TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTC	459
Query	441	GAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA	500
Sbjct	460	GAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA	519
Query	501	GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCA	560
Sbjct	520	GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCA	579

Query	561	GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAC	620
Sbjct	580	GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAC	639
Query	621	TGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG	680
Sbjct	640	TGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG	699
Query	681	AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAG	740
Sbjct	700	AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAG	759
Query	741	CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG	800
Sbjct	760	CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG	819
Query	801	TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC	860
Sbjct	820	TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC	879
Query	861	CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACAGGGGCCCGCACAGCGG	920
Sbjct	980	CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACAGGGGCCCGCACAGCGG	939
Query	921	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT	980
Sbjct	940	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT	999
Query	981	GACA	984
Sbjct	1000	GACA	1003

4. 菌株 B-5 与 *Bacillus subtilis* CICC10028 的同源性比较

Bacillus subtilis subsp. *subtilis* CICC10028, complete genome, Length=1050

Score = 1779 bits (964), Expect = 0.0

Identities = 963/964 (99%), Gaps = 0/964 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query	21	ATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT	80
Sbjct	58	ATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT	117

Query	81	GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT	140
Sbjct	118	GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT	177
Query	141	ACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTA	200
Sbjct	178	ACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTA	237
Query	201	CAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG	260
Sbjct	238	CAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG	297
Query	261	CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA	320
Sbjct	298	CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA	357
Query	321	CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG	380
Sbjct	358	CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG	417
Query	381	TGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGAAGAACAAGTACCGTTC	440
Sbjct	418	TGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGAAGAACAAGTACCGTTC	477
Query	441	GAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA	500
Sbjct	478	GAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA	537
Query	501	GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCA	560
Sbjct	538	GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCA	597
Query	561	GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGA AAC	620
Sbjct	598	GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGA AAC	657
Query	621	TGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG	680
Sbjct	658	TGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG	717
Query	681	AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAG	740
Sbjct	718	AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAG	777

Query	741	CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG	800
Sbjct	778	CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG	837
Query	801	TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC	860
Sbjct	838	TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC	897
Query	861	CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACAGGGGCCCGCACAAAGCGG	920
Sbjct	898	CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACAGGGGCCCGCACAAAGCGG	957
Query	921	TGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT	980
Sbjct	958	TGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT	1017
Query	981	GACA	984
Sbjct	1018	GACA	1021

致 谢

年年岁岁花相似，岁岁年年人不同。同样的故事演绎着不同的角色，这一刻终于轮到了自己。

在论文定稿之际，谨向覃程荣副教授致以诚挚的谢意！本论文是在导师覃程荣副教授的精心指导和深切关怀下完成的，从论文的选题、研究、撰写到定稿，无不渗透着导师的心血和汗水。三年来，导师严谨的治学作风，认真的工作态度，崇高的敬业精神，宽容待人的学者风范，给我树立了良好的榜样，使我受益匪浅。在此，谨向导师致以深深的谢意！

衷心感谢院长王双飞教授在课题的研究中给予的大力支持和帮助！

衷心感谢周敬红老师、宋海农老师、杨崎峰老师、黄显南老师、许开绍老师、黄崇杏老师、区克老师以及轻化工程教研室的其他老师给予我的帮助与支持。特别感谢食品教研室的林莹老师，在课题进行中亦给予我许多可贵的指导和建议。

感谢杨丽、陈国宁等师兄师姐给予的建议和帮助！感谢李春燕、张锐、梁辰、卫威、张俊华、龙凌、丁永奎等学友的无私帮助！感谢郑碧、赵国勇、杨滨等师弟师妹们的帮助。郑碧和师弟赵国勇参与了本研究的部分实验工作，他们认真的实验态度对作者帮助很大，再次向他们表示感谢！感谢生物中心实验室的朱晓辉、李日伟两位学友在生物实验部分给予的支持和帮助！

我要深深的感谢多年以来女朋友唐秀梅给予我的精神上的支持，与我共享成功的喜悦、帮助我分析失败的原因，同时也要深深的感谢父母亲给予我的物质上支持和帮助，还有关心帮助我的妹妹及她的家人，正是他们的理解与支持，激励我不断克服困难、超越自我。

此外，感谢国家自然科学基金对本论文的支持，感谢广西大学电镜中心及上海基康生物技术有限公司对本论文提供的帮助。

最后，感谢评阅评审论文和出席论文答辩会的各位专家在百忙之中给予我的悉心指导。

陈元

2008年5月

攻读学位期间发表论文情况

1. 覃程荣, 杨丽, 陈元, 李春燕, 生物酶对废纸浆过氧化氢漂白的影响, 中华纸业, 2008.6
2. 覃程荣, 杨丽, 李春燕, 陈元, 过渡金属离子对废纸浆过氧化氢漂白的影响, 广西大学学报, 2008.6

作者: [陈元](#)
学位授予单位: [广西大学](#)

相似文献(7条)

1. 期刊论文 [黄静, 刘泽华](#) 环境友好型废纸浆漂白技术的研究进展 -[天津造纸](#)2007, 29(4)

总结了废纸漂白的特点;介绍了各种环境友好的漂剂和漂白方法如氧气漂白、臭氧漂白、过氧化氢漂白、生物酶法漂白、二亚硫酸钠漂白、甲脒亚磺酸(FAS)漂白和DBI漂白等;并且对各种漂白方法进行了比较。

2. 期刊论文 [陈嘉翔, CHEN Jia-xiang](#) TAED活化剂用于废纸浆过氧化氢漂白的效果 -[中华纸业](#)2008, 29(24)

介绍了废纸浆过氧化氢漂白时不用硅酸钠和氢氧化钠的常规方法,只用活化剂TAED,结果是漂白效果较常规漂白好,主要表现在废纸浆漂白后白度高和物理性能好。

3. 期刊论文 [李建文](#) 新型螯合剂可以提高纸浆漂白的效果、降低环境污染 -[造纸化学品](#)2007, 19(z1)

在制浆漂白工序中,过氧化氢用于化学浆、机械浆及废纸浆漂白时对螯合剂需求量较大。几项环保研究表明,传统应用的螯合剂乙二胺四乙酸(EDTA)和二乙烯三胺五乙酸(DTPA)生物降解性能较差,导致大量螯合剂进入废水处理系统,这2种药品的生态期已成为争论的话题。最近,应用于制浆漂白工序中的高效、环境友好型的螯合剂系列品种已被成功开发。

4. 期刊论文 [陈嘉翔, CHEN Jia-xiang](#) 有色废纸浆几种漂白方法漂白结果的比较 -[纸和造纸](#)2007, 26(5)

本文介绍了几种漂白方法对有色废纸浆漂白结果的比较。同时介绍了漂前酶预处理和高强混合预处理的作用。结果认为漂前酶预处理对脱除染料无效,漂前高强混合对脱除染料的作用较大。几种漂白方法中,二氧化氯的漂白效果最好,次氯酸钠漂白效果次之,连二亚硫酸钠漂白效果再次之,过氧化氢漂白效果最差。

5. 期刊论文 [黄六莲](#) 甲脒亚磺酸在废纸脱墨浆漂白中的应用 -[造纸化学品](#)2004, 16(6)

介绍了甲脒亚磺酸(FAS)漂白废新闻纸脱墨浆和混合办公废纸脱墨浆的实验情况,探讨了FAS用量、NaOH和FAS比值、浆浓、漂白温度和时间对漂后纸浆白度的影响,同时用过氧化氢、连二亚硫酸钠进行了对比实验,并对废新闻纸脱墨浆进行了H2O2-FAS, FAS-H2O2, H2O2-Na2S2O4和Na2S2O4-H2O2两段漂白研究。研究结果表明,纸浆白度随FAS用量、漂白温度和时间增加而提高,FAS与NaOH的质量比在2:1左右,漂白效果较好。H2O2-FAS用作废新闻纸脱墨浆的两段漂白,其效果优于H2O2-Na2S2O4, FAS-H2O2又比Na2S2O4-H2O2效果好,说明FAS是一种有效的废纸浆漂白剂和脱色剂。

6. 期刊论文 [王萍, 詹怀宇, 黄方, 岳保珍, 刘清洁, 李兴, Wang Ping, Zhan Huaiyu, Huang Fang, Yue Baozhen, Liu](#)

[Qingjie, Li Xing](#) 废纸脱墨浆的甲脒亚磺酸漂白 -[中国造纸](#)2000, 19(6)

介绍了用甲脒亚磺酸(FAS)漂白彩色混合废纸脱墨浆和高白度办公废纸脱墨浆的实验情况,探讨了FAS用量、NaOH和FAS用量比、浆浓、漂白温度和时间对漂后纸浆白度的影响,并进行了H2O2-FAS两段漂白,比较了FAS、H2O2单段漂白和H2O2-FAS、FAS-H2O2两段漂白的效果。实验结果表明,FAS是一种有效的废纸浆漂白剂和脱色剂。

7. 学位论文 [韩丽丽](#) 过氧碳酸钠用于废纸浆漂白的研究 2009

随着人们环保意识的增强,造纸工业纸浆的漂白逐渐转向ECF(无元素氯)和TCF(全无氯)漂白等无污染漂白技术。目前,已开发的无污染漂白剂有氧化性的O2、H2O2、O3和还原性的连二亚硫酸钠,甲脒亚磺酸等。过氧碳酸钠(SPC)是一种可用于纸浆漂白的新型氧系漂白剂,是一种强氧化性的无氯漂白剂。本文主要研究过氧碳酸钠漂白废旧新闻纸浆(ONP)的漂白效果及基本工艺条件。本论文首先以废纸脱墨浆为原料,研究了过碳酸钠漂白废纸脱墨浆的工艺条件并进行了主要因素的优化,并在此基础上进一步研究了螯合剂EDTA和硅酸钠在过碳酸钠漂白废纸脱墨浆时对提高白度的影响。其次研究了在过碳酸钠漂白溶液中加入活化剂四乙酰乙二胺(TAED),组成过碳酸钠/TAED活化体系,并进行了此体系对过碳酸钠漂白时降低漂白温度、缩短漂白时间方面的研究,最后对过碳酸钠和过氧化氢漂白废纸脱墨浆的单段漂工艺进行了对比研究。

对过氧碳酸钠漂白的最佳漂白工艺条件实验研究表明:影响纸浆白度的主要因素是漂白剂过氧碳酸钠的用量,其次是漂白时间,漂白浓度,漂白温度等。过碳酸钠漂白废纸浆的最佳工艺条件为:过碳酸钠用量为9%,漂白浓度为12%,漂白时间为90min,漂白温度为60℃。在此条件下,漂白白度值达到63.24%ISO,白度增值为8.97个单位。

实验证明漂白过程中加入螯合剂EDTA进行漂前预处理对过碳酸钠漂白废纸脱墨浆有积极的促进作用及保护作用,可以消除废纸浆中的金属离子对漂白剂的无效分解,且经过实验研究得出EDTA预处理时的最佳用量为0.2%,在这个用量下漂白可以使白度值在原来最佳条件漂白值的基础上增加2个单位。

通过对碳酸钠/TAED活化体系进行研究发现:酰胺助剂TAED对过碳酸钠漂白具有明显的改善效果。与单纯的过碳酸钠漂白段相比,在过碳酸钠漂白时添加酰胺助剂TAED可以有效地提高漂白浆的白度,过碳酸钠单独漂白废纸浆达到63.87%ISO的白度需要时间为60分钟,但应用过碳酸钠/TAED活化体系漂白45分钟即可,漂白温度可以在一定白度要求下比原过碳酸钠单独漂时的温度低。因此,在满足一定纸浆白度的条件下,可以降低漂白温度,缩短漂白时间,减少能耗,降低生产成本。

通过对过氧碳酸钠和过氧化氢单段漂白进行比较研究发现:在相同漂白剂用量的情况下,过碳酸钠漂白与过氧化氢相比漂白能力稍差,在纸张的物理性能方面,很多地方却也优于过氧化氢,例如成纸不透明度比过氧化氢高等;另外,过碳酸钠是固体漂白剂,有运输方便,节约成本等优点,漂白时不需要添加氢氧化钠来提供碱性。

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis_Y1317945.aspx

授权使用: 浙江大学(wfzjdx), 授权号: 77ff7c72-4a72-4fca-9884-9ea00128c16f

下载时间: 2011年3月8日