文章编号: 1673-1689(2011)03-0410-07

菌株 *Serratia marcescens* SYBC08 产过氧化氢酶液态发酵工艺的优化及酶性质研究

曾化伟[1,2], 张 峰[1,2], 蔡宇杰[1], 廖祥儒*[1,2],
李娇阳[1,2], 邢玉鹏[1,2], 张大兵[3]

(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; 3. 江苏汉邦科技有限公司, 江苏淮安 223001)

摘 要: 利用单因素筛选和正交试验对菌株 *Serratia marcescens* SYBC08 液态发酵产酶的培养基和条件进行了优化, 其最优工艺为: 柠檬酸 25 g/L, 玉米浆粉 36 g/L, 初始 pH 值为 6.75, 接种量为体积分数 4%, 装液量 50 mL, 转速 250 r/min, 35 ℃培养 36 h 产酶活力可达 9 553 U/mL, 是优化前的 5.49 倍。通过对硫酸铵沉淀得到的过氧化氢酶进行酶学性质研究, 该酶在碱性条件(pH 值为 9.0)条件下, 60 ℃下保温 150 min 酶活力几乎不变, 65 ℃半衰期为 150 min, 其比商品化的牛肝过氧化氢酶具有更高的热稳定性。该酶最佳催化温度是 20 ℃, 在 0 ℃依然展示了 78%的活力。这些结果表明该酶具有良好的冷适应和热稳定性, 在高温、碱性条件或极低温条件有应用潜力。

关键词: 冷适应; 热稳定; 过氧化氢酶; 发酵优化
中图分类号: Q 815 文献标识码: A

Optimization of Fermentation Conditions for Catalase by *Serratia marcescens* SYBC08 and Characterization of Its Crude Enzyme

ZENG Hua-wei[1,2], ZHANG Feng[1,2], CAI Yu-jie[1], LIAO Xiang-ru*[1,2],
LI Jiao-yang[1,2], XING Yu-peng[1,2], ZHANG Da-bin[3]

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Hanbon Science & Technology Co. Ltd, Huaian 223001, China)

Abstract: The nutrient and environmental conditions for catalase production by *Serratia marcescens* SYBC08 were optimized with single factor experiment and orthogonal design in this study. The optimum conditions were listed as follows: 25 g/L citric acid, 36 g/L corn steep liquor powder, initial pH 6.75, liquid volume 50 mL/250 mL flask, 4% inoculation, 35 ℃, 250 rpm, for 36 hours. With the optimum conditions, the catalase titer achieved at 9553 U/mL, which was 5.49-fold than that of the control. Properties of the catalase after purification by ammonium

收稿日期: 2010-05-18
基金项目: 国家 863 计划项目(2010AA101501)。
作者简介: 曾化伟(1981-), 男, 江西宁都人, 发酵工程博士研究生, 主要从事酶发酵调控方面的研究。
Email: huaweizeng@163.com
* 通信作者: 廖祥儒(1964-), 男, 江西南康人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物转化的生物化学和分子生物学方面的研究。Email: liaoxiangru@163.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

sulfate precipitation were studied. At 60 ℃ and pH 9.0, the enzyme was stable for 150 min; at 65 ℃ and pH 9, the half-life of the enzyme was approximately 150 min; its thermo stability was higher than that of commercial catalase from bovine. It was also active at 20 ℃ and had 78% of its activity at 0 ℃. These results suggest that the enzyme displays a property with cold adaption and thermo stability, and it has potential applications in high-temperature, alkaline and low-temperature conditions.

Key words: cold-adaption, thermo stability, catalase, fermentation optimization

过氧化氢是一种强氧化剂, 它逐渐替代传统的漂白剂应用在食品、电子、纺织、造纸等工业领域中的废水处理, 其消费量每年以 8~ 10% 的速度逐年增加[1]。过氧化氢酶(Catalase, CAT) 能高效地将过氧化氢分解为无毒的水和氧气[2]。近年来, 世界各国出于对环境和安全问题考虑, 过氧化氢酶逐渐替代化学试剂降解过氧化氢[3]。因此过氧化氢酶的需求量不断增加。

目前, 国际上商品化的过氧化氢酶主要来源于动物肝脏和微生物[4-5]。在国内生产的过氧化氢酶主要从动物肝脏中提取。过氧化氢酶的应用催化条件常会发生在 pH 值为9.0 和温度大于 60 ℃以及不可避免的极低温条件尤其是在寒冷的冬天[6-7]。来源于动物肝脏的过氧化氢酶比来源于一些微生物的热稳定性差, 且酶活低。因此从长远角度, 以微生物生产过氧化氢酶将逐步占据主要地位[8-9]。

本研究对菌株 *Serratia marcescens* SYBC08 所产过氧化氢酶进行了液态发酵条件优化, 提高了酶的产量。研究了其过氧化氢酶主要应用的酶学性质, 其展示出优良的冷适应和热稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 *Serratia marcescens* SYBC08 保存在中国普通微生物保藏管理中心(保藏号: CGMCC 3449)。

1.1.2 培养基

1) 斜面培养基: 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 5 g/L, 酵母膏 5 g/L, pH 值为 7.2。

2) 种子培养基: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 牛肉浸膏 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, pH 值为 7.2。

3) 基础培养基: 葡萄糖 12.5 g/L, 酵母膏 15 g/L, 磷酸二氢钾 0.5 g/L, 初始 pH 值为 8.0。

培养基均在 115 ℃条件下灭菌 20 min。

1.2 培养方法

从斜面中取一环菌体, 接入种子培养基中, 在摇床中培养 12 h。培养条件: 装液量为 50 mL, 转速为 200 r/min, 温度为 30 ℃。以体积分数 2% 接种量接种子于基础培养基, 进行产酶培养。初始培养条件: 250 mL 摇瓶中装液量为 50 mL, 转速为 200 r/min, 温度为 30 ℃。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量测定 取 20 mL 发酵液于 9 000 r/min、4 ℃下离心 10 min, 收集湿菌体, 用蒸馏水洗涤 1 次后, 置于 105 ℃下恒温干燥至恒重, 用电子天平称重。

1.3.2 酶液样品的制备 取 15 mL 发酵液于 9 000 r/min 离心 10 min, 菌体用 50 mmol/L Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 缓冲液(pH 值 7.0) 洗涤 1 次, 以适量相同的缓冲液重悬后置冰浴预冷; 超声波破碎 10 min, 14 500 r/min 离心 15 min, 上清液即为胞内过氧化氢酶测定粗酶液。

1.3.3 过氧化氢酶活性测定 采用分光光度法在 30 ℃下测定。反应总体积为 3 mL(含适量酶液样品, 50 mmol/L 的 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 缓冲液(pH 值为 7.0) 和 30 mmol/L H_2O_2 其分解速率用紫外可见光分光光度计在 240 nm 下测定。酶活定义为: 在 30 ℃下, 分解 H_2O_2 1 μmol/L/min 所需的酶量为一个酶活单位[10]。

1.3.4 蛋白质量的测定 粗酶液中总蛋白质量的测定用考马斯亮兰法, 以牛血清蛋白作为标准[11]。

1.4 酶的部分纯化和部分性质研究

1.4.1 酶的部分纯化 取粗酶液 100 mL, 加入硫酸铵至 35% 的饱和度进行预沉淀, 取上清液调整硫酸铵的饱和度至 60% 并过夜, 使有酶活的蛋白沉淀。将上述液体于 9 000 r/min 离心 10 min 去上清液, 沉淀与 50 mmol/L 的 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 缓冲液(pH 7.0) 充分混合。最终的溶液进行脱盐处理后用于酶学性质的研究。

1.4.2 最适 pH 值及 pH 稳定性 经初步纯化的过氧化氢酶在 50 mmol/L Na_2HPO_4-citrate 缓冲液(pH 4.0~ 6.0) , 50 mmol/L NaH_2PO_4-Na_2HPO_4

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

缓冲液(pH 6.0~8.0), 50 mmol/L Na_2CO_3-$NaHCO_3$ 缓冲液(pH 9.0~11.0)中进行酶促反应以测定其最适 pH 值。在 30 ℃, 将酶液培养在上述缓冲液条件下 180 min 后测定残余酶活性以研究酶的 pH 稳定性。

1.4.3 *酶反应最适温度及热稳定性* 最适温度的测定在 50 mmol/L 的 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 缓冲液(pH 9.0)缓冲体系及不同温度(0~70 ℃) 下进行酶促反应。热稳定性测定为在 50 mmol/L 的 Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 缓冲液(pH 9.0)缓冲体系下的不同温度(60、65、70 ℃)条件下将酶液分别处理一定时间, 再进行酶活性测定以研究酶热稳定性。

2 结果与分析

2.1 不同碳源及最适碳源浓度对菌体生长和酶活力的影响

在基础发酵培养基中, 分别以 12.5 g/L 的环糊精、蔗糖、柠檬酸、乙酸和乙醇为碳源代替葡萄糖, 考察它们对酶活力和菌体生长的影响。由表 1 可知, 柠檬酸的酶产量和比活力最高。蔗糖最有利于生物量的形成。因此柠檬酸作为最佳碳源, 这在以前的文献中未见报道。从图 1 可看出, 柠檬酸质量浓度为 25 g/L 时具有最高的过氧化氢酶产量(3 710 U/mL), 但是比活力随质量浓度升高始终升高。柠檬酸质量浓度为 15 g/L 时具有最高的生物量。

表 1 不同碳源对菌体生长和产酶的影响

Tab. 1 Effect on carbon sources on catalase activity and cell growth

碳源质量浓度/(12.5 g/L)	酶产量/(U/mL)	比活力/(U/mg)	生物量/(g/L)
葡萄糖	1 740±435	3 410±853	5.28±0.38
环糊精	1 455±122	3 973±335	3.73±0.10
蔗糖	2 037±393	4 057±784	6.38±0.20
柠檬酸	2 614±535	5 326±1 092	4.61±0.28
乙酸	2 351±361	4 709±724	4.50±0.22
乙醇	2 146±304	5 261±747	4.70±0.12

2.2 不同氮源及最适氮源浓度对生长和酶活力的影响

在柠檬酸质量浓度为 25 g/L 的发酵培养基中, 以 12.5 g/L 硝酸钠、尿素、硝酸铵、蛋白胨、玉米浆粉为氮源代替酵母浸膏, 考察其对酶活力和菌体生长的影响。由表 2 可知, 有机氮源与无机氮源相比, 其酶产量和生物量明显高于无机氮源, 可能的原因是有机氮源含有丰富的氨基酸等物质, 这与其它报道是一致的[12]。有机氮源中玉米浆粉最有利于酶产量和生物量的形成, 但是无机氮源硝酸钠有最高的比活力。从图 2 可知, 玉米浆粉质量浓度为 32 g/L 具有最高的过氧化氢酶产量(5 647 U/mL)和比活力, 但是生物量始终随质量浓度升高而上升。

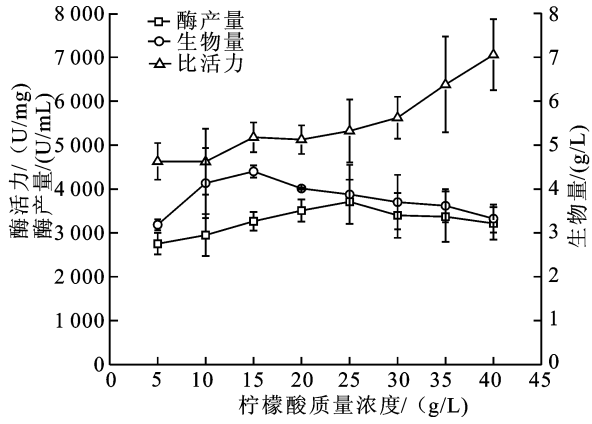


图 1 柠檬酸质量浓度对 *Serratia marcescens* SYBC08 菌体生长和酶活力的影响

Fig. 1 Effect of citric acid concentrations on catalase activity and cell growth

表 2 不同碳源对菌体生长和产酶的影响

Tab. 2 Effect on nitrogen sources on catalase activity and cell growth

氮源质量浓度/(15g/L)	酶产量/(U/mL)	比活力/(U/mg)	生物量/(g/L)
硝酸钠	179±22	6 992±890	1.05±0.05
尿素	90±25	6 799±1 936	0.77±0.15
硝酸胺	462±43	3 951±372	1.28±0.17
酵母浸膏	3 462±481	5 558±773	4.25±0.21
蛋白胨	1 463±265	5191±943	3.70±0.18
玉米浆粉	4 642±493	6 550±696	5.04±0.25

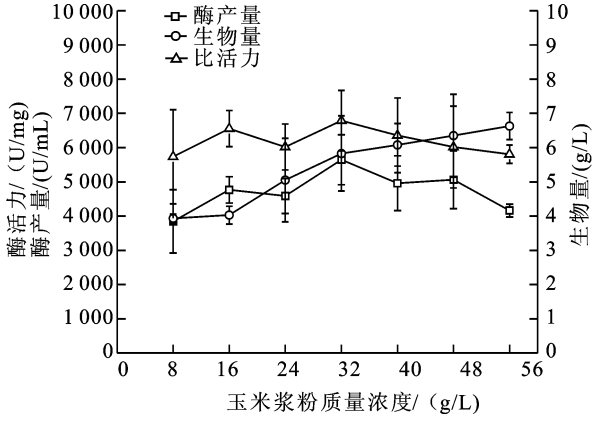


图 2 玉米浆粉质量浓度对 *Serratia marcescens* SYBC08 菌体生长和酶活力的影响

Fig. 2 Effect of corn steep powder on catalase activity and cell growth

2.3 不同金属离子对生长和酶活力的影响

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在最佳碳源和氮源条件下添加不同的金属离子, 考察了金属离子对菌体生长和酶活力的影响。如表 3 所示, 在添加金属离子后均导致酶产量和酶比活力下降, 并抑制了菌体生长, 这可能是玉米浆粉中已含有充足的金属离子, 而过高的金属离子会对菌体生长产生毒害作用。

表 3 不同金属离子对菌体生长和产酶的影响

Tab. 3 Effect on metal ions on catalase activity and cell growth

金属离子 质量浓度/(g/L)	酶产量/(U/mL)	比活力/(U/mg)	生物量/(g/L)
对照(不添加离子)	6 740±1 864	7 769±2 148	6.65±0.57
NaCl(0.5)	4 566±1 072	6 118±1 436	4.83±0.32
KH_2PO_4(0.5)	5 555±1 057	6 076±1 156	4.83±1.53
$MgCl_2$(0.5)	3 513±725	5481±1 131	4.52±0.86
$CaCl_2$(0.5)	3 862±1 204	5 806±1 810	5.32±1.88
$MnCl_2$(0.01)	2 869±738	4 620±1 188	3.18±0.33
$FeCl_2$(0.01)	2 807±375	4 565±610	3.83±0.41
$ZnCl_2$(0.01)	2 554±439	4 251±730	3.63±0.34

2.4 初始 pH 值对生长和酶活力的影响

初始 pH 值对生长和酶活力的影响如图 3 所示。当培养基 pH 值为 6.0 时, 酶产量最高达到 6 810 U/mL, 同时比活力和生物量也达到最大。

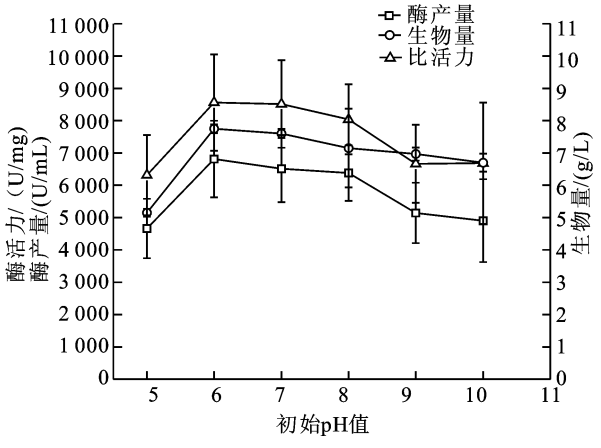


图 3 初始 pH 对 *Serratia marcescens* SYBC08 菌体生长和酶活力的影响

Fig. 3 Effect of initial pH on catalase activity and cell growth

2.5 正交实验

单因素发酵实验结果表明(表 4), 氮、碳源浓度与初始 pH 对酶产量有一定的提高作用, 故设计正交实验来确定适宜的氮、碳浓度和初始 pH。表 4 为 $L_9(3^4)$ 正交实验安排及实验分析, 正交实验结果表明, 发酵最优条件是 $A_2B_2C_2$, 即柠檬酸 25 g/L, 玉米浆粉 36 g/L, 初始 pH 值为 6.75。因为在实验中没有这个组合, 我们在同一条件下重新做了验证试验发现 $A_2B_2C_2$ 比试验号 5 略高(数据没有展示)。

表 4 $L_9(3^4)$ 正交实验与分析

Tab. 4 $L_9(3^4)$ orthogonal array experiment and analysis

试验号	碳源浓度/(g/L)	氮源浓度/(g/L)	初始 pH	酶产量/(U/mL)	生物量/(g/L)	比活力/(U/mg)
1	15	16	5.75	4 530±1 146	5.31±0.72	5 008±1 267
2	25	16	6.75	6 951±941	7.65±0.52	7 484±1 013
3	35	16	7.75	6 215±862	7.66±0.88	7 868±1 091
4	15	36	6.75	6 515±1 380	6.75±0.28	7 242±1 533
5	25	36	7.75	7 232±1 258	7.06±0.70	8 456±1 471
6	35	36	5.75	4 722±1 103	3.98±0.60	7 276±1 699
7	15	56	7.75	5 027±1 025	5.32±0.45	6 546±1 335
8	25	56	6.75	5 181±929	7.18±0.36	5 793±1 039
9	35	56	5.75	3 860±668	3.76±0.62	5 079±879
K_1	16 072	17 696	13 112			
K_2	19 364	18 469	18 647			
K_3	14 797	14 068	18 474			
K_R	4 567	4 401	5 535			

2.6 装液量对产酶的影响

装液量是发酵液溶氧的一个间接指标[13], 溶氧又是影响过氧化氢酶合成的最重要因素之一[14]。在摇瓶发酵培养过程中, 可以通过转速和装液量来考察溶氧对产酶的影响。在 250 mL 摇瓶中分别加入 30、40、50、60、70、80 mL 培养基, 比较不同装液量对菌体生长和酶活力的影响。结果如图 4 所示, 过氧化氢酶在 50 mL 装液量时产酶量和比活力最高, 但是菌体生物量在 30 mL 最大。

2.7 接种量对菌体生长和产酶的影响

不同接种量对菌体生长和产酶的影响如图 5 所示。总的来看接种量对菌体生长和产酶的影响

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

比较小。过氧化氢酶在体积分数 4% 接种量时酶产量和比活力最高, 但体积分数 4% 接种量时生物量略高。

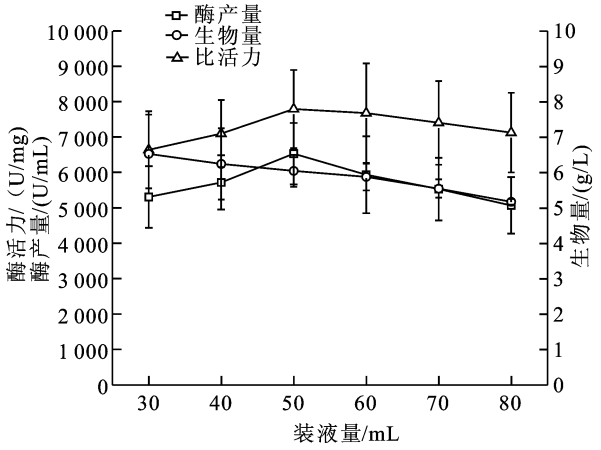


图 4 装液量对 *Serratia marcescens* SYBC08 菌体生长和酶活力的影响

Fig. 4 Effect of loading liquid volume on catalase activity and cell growth

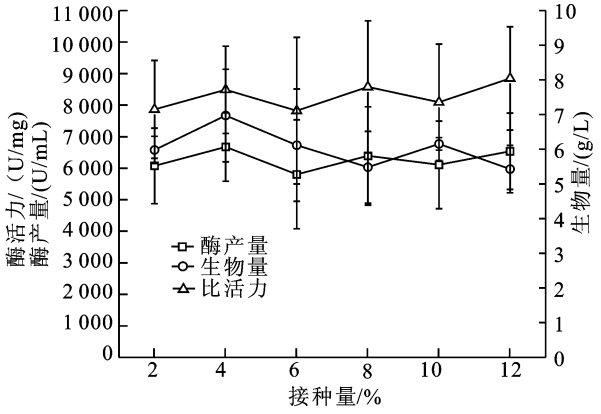


图 5 接种量对 *Serratia marcescens* SYBC08 菌体生长和酶活力的影响

Fig. 5 Effect of inoculation catalase activity and cell growth

2.8 温度对产酶与生长的影响

温度是影响微生物代谢和生长的重要因素之一。在优化实验的基础上, 选取 23、27、31、35、39 ℃ 5 个温度, 其它条件相同, 考察不同温度对生长和产酶的影响。结果如图 6 所示, 过氧化氢酶产量和比活力在 35 ℃最高, 菌体生物量在 23 ℃最高。

2.9 摇床转速对产酶与菌体生长的影响

不同的转速对产酶的影响如图 7 所示。由于摇床受到转速限制, 过氧化氢酶产量和比活力始终增加, 但菌体生物量却先增加后下降。在转速为 250 r/min 时, 酶产量和比活力最高, 但菌体生物量以 190 r/min 最高。

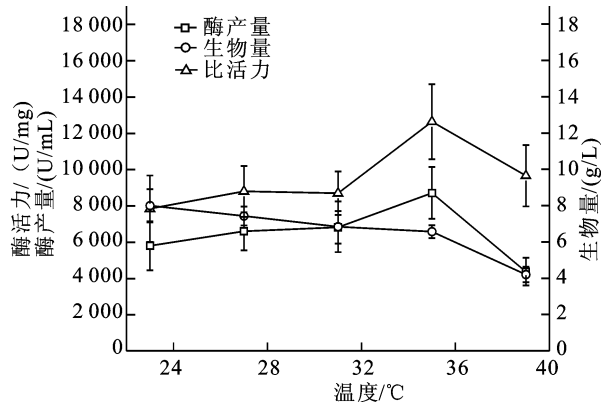


图 6 温度对 *Serratia marcescens* SYBC08 菌体生长和酶活力的影响

Fig. 6 Effect of temperature on catalase activity and cell growth

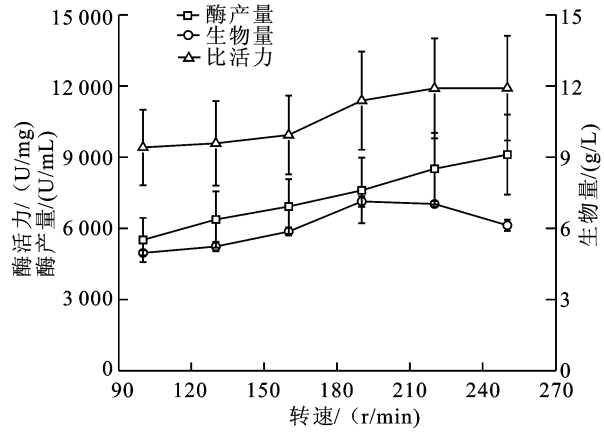


图 7 转速对 *Serratia marcescens* SYBC08 菌体生长和酶活力的影响

Fig. 7 Effect of speed on catalase activity and cell growth

2.10 产酶过程曲线

在优化的培养基和培养条件的基础上, 考察不同的发酵时间对菌体生长和酶产量的影响。发酵曲线如图 8 所示, 过氧化氢酶的合成与菌体生长呈现极大的相关性。0~ 4 h, 过氧化氢酶产量和比活力、菌体 、pH 增加缓慢。4~ 12 h, 这 4 个指标的增加非常迅速, 但 12~ 36 h 后 4 个指标的变化趋于平缓, 增加很缓慢。36 h 以后除 pH 值以外均有下降。

2.11 最适 pH 值及 pH 值的稳定性

初步纯化后的过氧化氢酶在不同 pH 值的缓冲体系、30 ℃时测定的酶活(见图 9) 。结果表明, 即时酶活最高峰出现在 pH 值 7~ 9。过氧化氢酶在一系列不同 pH 值缓冲液中 30 ℃下处理 180 min, 再测定剩余酶活。结果显示该酶在 pH 6~ 10 范围内比较稳定。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

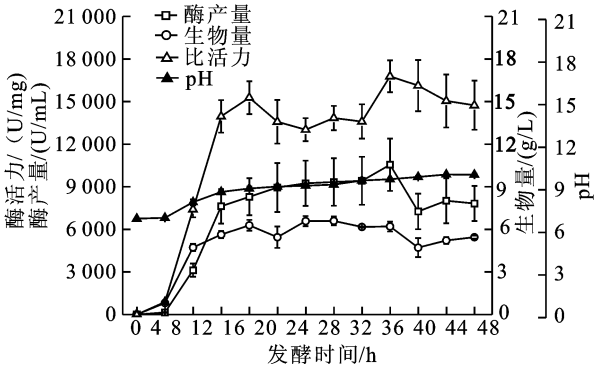


图 **8** 发酵时间对 ***Serratia marcescens*** **SYBC08** 菌体生长、酶活力和 **pH** 的影响

Fig. 8 Effect of fermentation time on catalase activity, cell growth and pH

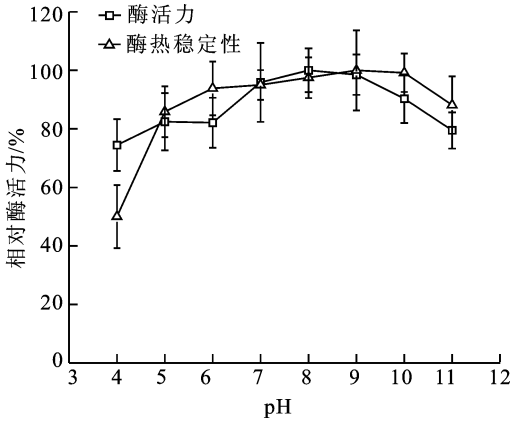


图 **9** **pH** 对 ***Serratia marcescens*** **SYBC08** 酶活力和稳定性的影响

Fig. 9 Effect of pH on catalase catalytic activity and thermal stability

2.12 酶反应的最适温度及热稳定性 酶反应最适温度测定结果表明(见图 10), 最适酶促反应温度为 20 ℃, 酶在 0 ℃依然保持了 78% 的活力。这个结果表明, 该酶具有很好的冷适应性, 能够被应用于在非常低的温度条件下分解过氧化氢。该酶培养在 pH 值 9.0, 温度为 60 ℃的条件下, 酶活力在 150 min 几乎不变; 65 ℃时, 该酶的半衰期大约为 150 min。同样 pH 值条件下, 60 ℃牛肝过氧化氢酶 90 min 后几乎完全失活, 65 ℃时酶活力在 30 min 时几乎完全失活(见图 11)。

由此可见, 该过氧化氢酶较牛肝过氧化氢酶具有更高的热稳定性。因此该酶是热稳定的, 其在纺织工业处理废水有一定的应用潜力。

3 结 语

本实验通过对过氧化氢酶液态发酵条件的优化, 确定了新的碳源。以柠檬酸为碳源, 可提高过

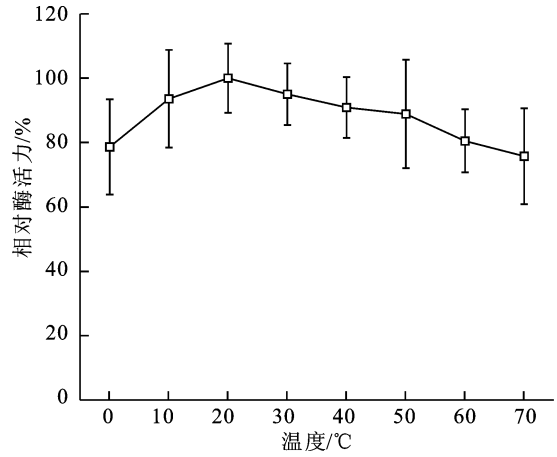


图 **10** 温度对 ***Serratia marcescens*** **SYBC08** 酶活力的影响

Fig. 10 Effect of temperature on catalase catalytic activity

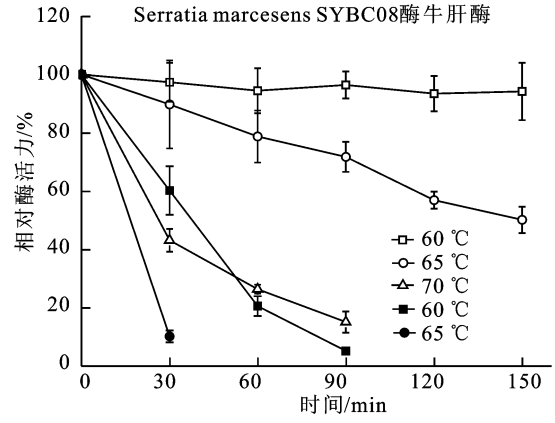


图 **11** 温度对酶热稳定性的影响的影响

Fig. 11 Effect of temperature on catalase thermal stability

氧化氢酶的产量。与以前的培养基相比, 新的培养基中不需添加任何其它离子, 这样就大大简化了培养基配方, 进而在一定程度上降低了操作的工作强度。在这些优化过程结束后, 产量从 1470 U/mL 提高到较高的产量(9 553 U/mL), 产量提高了 5.49 倍。另外比活力和生物量也均有一定的提高。

通过对菌株 *Serratia marcescens* SYBC08 产过氧化氢酶的主要应用酶学特性的研究, 发现该菌株所产过氧化氢酶在碱性条件下(pH 值为 9.0), 其热稳定性明显好于商品化的牛肝过氧化氢酶; 另外在低温条件下有很好的酶活力。该酶的冷适应热稳定性质使它具有更加广泛的应用。结合发酵周期较短而提高了生产强度及节约能耗、酶产量较高、操作强度低等优点, 该菌株和配套发酵工艺具有一定工业价值。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献(References):

[1] 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[J]. 食品与发酵工业, 2001, 28: 11- 14.
Wang Fan-qiang, Wang Zheng-xiang, Shao Wei-lan, et al. Study on culture conditions of engineered strain of thermostable catalase [J]. **Food and Fermentation industries,** 2001, 28: 11- 14. (in Chinese)

[2] Weck M. Hydrogen peroxide an environmentally acceptable textile bleaching agent, Text[J]. **Prax is Int,** 1991, 46: 144- 147.

[3] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21: 223- 232.
Liu Bing, Liang Chun-juan. Recent advances of catalase in organism [J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin,** 2005, 21: 223- 232. (in Chinese)

[4] 华兆哲, 燕国梁, 堵国成, 等. 枯草杆菌 *Bacillussp* F26 产过氧化氢酶的发酵条件[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26: 77- 83.
HUA Zhao-zhe, YAN Guo-liang, DU Guo-cheng, et al. Optimization of catalase production with a halophilic and alkaliphilic bacterium *Bacillussp* F26[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog,** 2007, 26: 77- 83. (in Chinese)

[5] 段绪果, 沈微, 李艳丽, 等. 耐热过氧化氢酶基因工程菌的构建及其发酵条件[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25: 74- 78.
DUAN Xu-guo, SHEN Wei, LI Yan-li, et al. Construction of recombinant thermostable catalase engineering strain and optimization of its fermentation condition[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog,** 2006, 25: 74- 78. (in Chinese)

[6] Fusho Y, Yajima Y. Catalase from *Bacillus subtilis* IAM 1026 (Ferm BP-4844) [P]. US Patent: 5486467. 1996.

[7] Calandrelli V, Gambacorta A, Romano I, et al. A novel thermoalkali stablecatalase-peroxidase from Oceanobacillus oncorhynchi subsp incaldaniensis: purification and characterization [J]. **World J Microb Biot,** 2008, 24: 2269- 2275.

[8] 邓宇, 华兆哲, 赵志军, 等. 氮源对枯草芽孢杆菌 WSH DZ-01 合成过氧化氢酶的影响[J]. 应用与环境微生物学报, 2001, 14: 544- 547.
DENG Yu, HUA Zhao-zhe, ZHAO Zhi-jun, et al. Effect of nitrogen sources on catalase production by *Bacillus subtilis* WSH DZ. 01 [J]. **Chin JAppl Environ Biol,** 2001, 14: 544- 547. (in Chinese)

[9] 冷晒祥, 钱国坻, 华兆哲, 等. 过氧化氢酶的棉针织物漂染工艺研究[J]. 印染, 2006, 14: 544- 547.
LENG Shai-xiang, QIAN Guo-di, HUA Zhao-zhe, et al. Catalase for H_2O_2 removal after cotton knits bleaching[J]. **printing and dying,** 2006, 14: 544- 547. (in Chinese)

[10] Nakayama M, Nakajima-Kambe T, Katayama H, et al. High Catalase Production by Rhizobium radiobacter Strain 2-1 [J]. **J Biosci Bioeng,** 2008, 106: 554- 558.

[11] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. **Anal Biochem,** 1976, 72: 248- 1254.

[12] Caridis K A, Christakopoulos P, Macris J. Simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Alternaria alternata*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol,** 1991, 34: 794- 797.

[13] 王志新, 蔡宇杰, 李颜颜等. 培养基及培养条件对 *Pycnoporus* sp. SYBC-L1 分泌漆酶的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28: 832- 839.
WANG Zhi-xin, Cai Yu-jie, Li Yan-yan, et al. Effect of fermentation medium and conditions on laccase production by *Pycnoporus* sp. SYBC-L1[J]. **Journal of Food Science and Biotechnolog,** 2009, 28: 832- 839. (in Chinese)

[14] 刘建忠, 翁丽萍, 计亮年. 表面响应法优化黑曲霉过氧化氢酶的发酵工艺[J]. 微生物学通报, 2002, 29: 17- 21.
LIU Jian-Zhong, WENG Li-Ping, JI Liang-Nian. optimization of bioprocess of catalase production by *Aspergillusniger* using response surface methodology [J]. **Microbiology China,** 2002, 29: 17- 21. (in Chinese)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net