

碱性果胶酶的生物制造及其在纺织工业清洁生产中的应用研究进展

刘龙^{1,2}, 汪志浩^{1,2}, 张东旭^{1,2}, 李江华^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{2,3}

1 江南大学生物工程学院, 无锡 214122

2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

3 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

摘要: 以下综述了碱性果胶酶的生物制造及其在纺织工业清洁生产中的应用研究进展。微生物发酵法是目前生产碱性果胶酶的主要方式, 枯草芽孢杆菌是碱性果胶酶工业发酵生产中效果较好的野生菌株。影响发酵法生产碱性果胶酶的主要因素有: 底物浓度及其流加方式、细胞浓度、搅拌转速、通气速率、pH、温度等。构建基因工程菌为碱性果胶酶的发酵生产开辟了一条有效途径, 其中重组毕赤酵母的产酶水平最高, 在 10 吨发酵罐上酶活达 1305 U/mL。碱性果胶酶可用于棉织物前处理的精练工艺, 与传统高温碱煮相比, 具有保护纤维、提高精练效率、降低能耗和污染的优势。通过分子定向进化技术对碱性果胶酶进行分子改造, 使其催化特性更加适合于纺织精练工艺, 进而实现纺织工业的清洁生产是未来的研究重点和热点。

关键词: 碱性果胶酶, 发酵法生产, 枯草芽孢杆菌, 重组毕赤酵母, 生物精练

Advances in microbial production of alkaline polygalacturonate lyase and its application in clean production of textile industry

Long Liu^{1,2}, Zhihao Wang^{1,2}, Dongxu Zhang^{1,2}, Jianghua Li^{1,2}, Guocheng Du^{1,2}, and Jian Chen^{2,3}

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

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

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

Abstract: We reviewed the microbial production of alkaline polygalacturonate lyase (PGL) and its application in the clean production of textile industry. Currently PGL is mainly produced by microbial fermentation and *Bacillus* sp. is an ideal wild strain for PGL production. Microbial PGL production was affected by many factors including the concentration and feeding mode of substrate, cell concentration, agitation speed, aeration rate, pH and temperature. Constructing the recombinant strain provided an effective alternative for PGL production, and the concentration of PGL produced by the recombinant *Pichia pastoris* reached 1305 U/mL in 10 m³ fermentor. The recombinant *Pichia pastoris* had the potential to reach the industrial production of PGL. PGL can be applied in

Received: September 25, 2009; **Accepted:** November 3, 2009

Supported by: National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 20625619), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-05-0488), National High Technology Research and Development Program of China (No. 2009AA02Z204), Key Technology Research and Development Program of Jiangsu Province, China (No. SBE200900022), Key Program of National Natural Science Foundation of China (No. 20836003), Self-determined Research Program of Jiangnan University (No. JUSRP30901).

Corresponding author: Jian Chen. Tel: +86-510-85913661; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

国家杰出青年基金(No. 20625619), 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-05-0488), 863 项目(No. 2009AA02Z204), 江苏省科技支撑计划(No. SBE200900022), 国家自然科学基金重点项目(No. 20836003), 江南大学自主科研计划(No. JUSRP30901)资助。

bio-scouring process in the pre-treatment of cotton. Compared with the traditional alkaline cooking process, the application of PGL can protect fiber, improve the bio-scouring efficiency, decrease energy consumption and alleviate the environmental pollution. The future research focus will be the molecular directed evolution of PGL to make PGL more suitable for the application of PGL in bio-scouring process to realize the clean production of textile industry.

Keywords: alkaline polygalacturonate lyase, microbial fermentation, *Bacillus* sp., recombinant *Pichia pastoris*, bio-scouring

碱性果胶酶一般指聚半乳糖醛酸裂解酶(E.C.4.2.2.2, 简称PGL), 其最适pH在8~10, 可以在高pH条件下以反式消去作用断开果胶聚合物主链, 产生 Δ 4:5不饱和的寡聚半乳糖醛酸。碱性果胶酶来

源广泛, 普遍存在于真菌、细菌、酵母菌、植物和一些寄生线虫内^[1-2]。不同来源的碱性果胶酶生化性质差异较为明显(表1)。

1972年, Horikoshi K发表了第一篇关于 *Bacillus*

表1 碱性果胶酶的生物化学和物理学性质

Table 1 Biochemical and physico-chemical properties of alkaline polygalacturonate lyase

Source	Molecular weight (kD)	Iselectric point	M-M constant	Optimal temperature (°C)	Optimal pH	Temperature stability (°C)	pH stability	Reference
<i>Erwinia carotovora</i>	36-38	10.7	0.12	50	10.0	-		[3]
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	74	7.5	0.04-0.07	-	8.7	-		[4]
<i>Bacillus macerans</i>	35	10.3	-	60	9.0	-		[5]
<i>Penicillium adametzi</i>	-	-	-	60	8.0	40	7.0	[6]
<i>Amycolata</i> sp.	31	10.0	0.019	70	10.3	50	6.0-8.0	
<i>Pythium splendens</i>	23	8.0	-	-	8.0	50		[7]
<i>Bacillus</i> sp.	38	-	-	69	11.0	60	7.0-11.0	[8]
<i>Bacillus</i> sp.TS44	50	5.3	-	70	8.0	70	11.0	
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	-	-	-	65	10.5-11.0	70	4.0	
<i>Fusarium moniliforme</i>	-	-	-	-	8.5	75		[9]

sp. P-4-N 生产碱性果胶酶的论文^[10]。随后, 学术界出现了大量有关不同野生菌株发酵生产碱性果胶裂解酶的报道, 主要包括菜豆炭疽菌 *Colletotrichum lindemuthionum*^[11]、多形拟杆菌 *Bacteroides thetaiotaomicron*^[12]、软腐欧文氏菌 *Erwinia carotovora*^[13]、*Amucala* sp.^[14]、丁香假单胞菌大豆致病变种 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*^[15]、炭疽菌 *Colletotrichum magna*^[16]、软腐细菌 *E. chrysanthemi*^[17]、*Bacillus* sp.^[18]、*Bacillus* sp. DT-7^[19]、荔枝炭疽病菌 *C. gloeosporioides*^[8]。虽然经过发酵优化可以把碱性果胶酶提高到一定的产量, 但野生菌的生产能力普遍处于较低的水平。

随着分子生物学和基因工程技术的迅猛发展, 人们对果胶酶基因开始进行研究。至今共有 58 种来源于植物、细菌和霉菌的果胶酶基因被破译。近十年

来, 来源于 *Erwinia*^[20]、*Pseudomonas*^[21]和 *Bacillus*^[6]等的碱性果胶裂解酶基因已通过基因工程技术得到了表达, 这些表达主要以 *E. coli* 为表达宿主, 其表达方式几乎都以异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)作为诱导剂。唯一被表达体系毕赤酵母表达的碱性果胶酶基因来源于真核生物 *Fusarium solani* f. sp. *pisi*^[22]。

我国从上世纪 90 年代初开始也对碱性果胶酶进行了研究, 一般均停留在野生菌种筛选、诱变及对酶特性研究阶段^[23-24]。诸葛斌等将来源于 *Bacillus* sp. WSHB04-02 的原核碱性果胶裂解酶基因利用穿梭载体 pPIC9K 在 *P. pastoris* GS115 中整合分泌表达^[25-26], 经过发酵过程优化与控制研究, 现在碱性果胶酶产量已达世界领先水平^[27]。

近年来, 由于环境污染和能源危机等问题日益加剧, 而纺织工业本身就是一个高污染、高能耗的

行业, 所以“清洁生产, 绿色纺织”便成为人们关注的话题。生物法处理纺织品比传统的化学法具有节能、节水、低污染等优势。碱性果胶酶可用于纺织品前处理的精练工艺, 从而取代传统的碱煮法, 不但能够降低能耗和废水处理难度, 同时还可以提高产品质量, 提升产品的国际竞争力, 是目前纺织生物技术领域的一个研究热点。

1 碱性果胶酶高产菌种的筛选和构建

通过科研人员 30 多年不断研究, 有十多种碱性果胶酶的产生菌株得到了分离, 主要包括欧文氏菌、螺孢菌、嗜碱芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌等。许多节杆菌、芽孢杆菌、软腐病菌及假单胞菌都能产生果胶酶, 但是这些菌的产酶水平很低, 很难进行工业化生产和进行实际应用研究。李祖明等以吉氏芽孢杆菌(*Bacillus gibsonii*)S-2 为出发菌株, 经紫外线诱变育种, 得到产碱性果胶酶较高的新菌株 2249。该菌株所产碱性果胶酶的最适 pH 为 10.0, 最适作用温度为 55°C^[24]。张健红等从腐烂的水果表皮分离得到一株高产碱性果胶酶菌株 *Bacillus* sp. strain WSHB04-02。*Bacillus* sp. WSHB04-02 所产碱性果胶酶的适宜温度范围为 55°C~66°C, 满足棉织物精练的要求(最适温度 50°C~60°C), 适宜 pH 范围在碱性条件下, 为 9.4~9.8, 同样符合棉织物精练的要求(最适 pH 9~10)^[26]。钟卫鸿等用筛选培养基从芦苇土壤中筛选到 7 株碱性果胶酶产生菌株, 经初筛和复筛得到产酶活性较高的一株菌 ZG9901, 初步鉴定为螺孢菌属 *Spirillospora* spp., 该菌所产碱性果胶酶最适 pH 为 9.0, 最适作用温度为 50°C^[28]。自然界分离的菌种产酶能力一般较低, 通过研究, 科研人员发现野生菌株产碱性果胶酶与其他果胶酶相比, 产量低很多^[29]。一般地, 野生菌经过发酵优化后产碱性果胶酶的水平为 0.01~10 U/mL。

1973 年体外 DNA 的成功重组使酶学的基础研究和应用研究发生了革命性的变化。上世纪 90 年代, 人们对果胶酶基因开始进行研究, 至今共有 58 种来源于植物、细菌和霉菌的果胶酶基因被破译。其中大部分是植物果胶酶, 细菌果胶酶中有 13 种来源于 *Erwinia*, 3 种来源于 *Bacillus*, 值得注意的是在公布的 58 种果胶酶基因中碱性果胶酶基因不超过 5 种。其

中 *Bacillus subtilis* 果胶酶是最具有代表性的一种^[30]。碱性果胶酶基因序列的破译为碱性果胶酶的表达与调控研究奠定了基础。

近十年来, 来源于 *Erwinia*^[20], *Pseudomonas*^[21] 和 *Bacillus*^[6] 等的碱性果胶裂解酶基因已通过基因工程技术得到了表达, 这些表达主要以 *E. coli* 为表达宿主, 其表达方式几乎都以 IPTG 作为诱导剂。虽然 IPTG 广泛地运用于实验室研究, 但由于其价格昂贵, 因此限制了其在工业上的应用。提高碱性果胶酶产量(表达量)是基因工程菌研究的主要目的之一, 但至今所构建的该酶的基因工程菌产酶量一般在每毫升几个酶活力单位。我国从 90 年代初开始也对碱性果胶酶进行了研究, 一般均停留在菌种筛选及对酶特性研究阶段, 国内很少有关于碱性果胶酶基因工程研究的报道。刘连成等通过 PCR 扩增的方法从地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniform* DG-3 菌株中扩增出碱性果胶酶的结构基因 *pelA*, 序列分析表明, 所获 *pelA* 基因与已报道的 *B. licheniform* 14A 菌株的 *pelA* 基因的同源性为 100%。将 *pelA* 基因在大肠杆菌中表达, 发酵液中酶活达 12 U/mL^[31]。诸葛斌等利用 PCR 方法从 *Bacillus subtilis* WSHB04-02 中成功克隆出全长为 1.2 kb 的碱性果胶酶基因 PL, 并将其插入 pET22b(+)表达载体中, 利用载体自身携带的前导序列构建大肠杆菌表达载体 pET22b(+)PL; 以 pET22b(+)PL 为模板利用 PCR 扩增带有载体 pET22b(+)前导序列 *PelB* 的 PL 结构基因, 将其插入温控载体 pHsh, 获得重组质粒 pHsh PL, 最后将重组载体转入大肠杆菌 *E. coli* JM109 中, 成功构建分泌型温控基因工程菌 *E. coli* JM109(pHsh PL)^[32]。研究表明, 虽然该基因工程菌具有目标蛋白可分泌至胞外、重组质粒稳定以及诱导表达廉价等特点, 但碱性果胶酶的表达量仍不能令人满意, 无法进行工业化生产。

利用毕赤酵母表达系统生产碱性果胶酶可以解决这一问题。与其他表达系统相比, 毕赤酵母表达系统具有以下优势: 1) 含有特有的强有力的醇氧化酶基因启动子, 用甲醇可严格地调控外源基因的表达。2) 能高密度发酵培养, 而且营养要求低, 利于工业化放大生产。3) 基因表达的产物可分泌到胞外, 自身分泌的蛋白质非常少, 使高分泌的外源蛋白质

便于纯化。4) 外源基因通过整合型质粒整合于毕赤酵母染色体基因组上, 结构稳定, 不易丢失。5) 作为真核表达系统, 毕赤酵母具有真核生物的亚细胞结构, 具有糖基化、脂肪酰化、蛋白磷酸化等翻译后修饰加工功能。首先从菌株枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* WSHB04-02 中克隆出碱性果胶酶编码基因 PL, 利用载体 pPic9k 构建重组质粒 pPic9k-PL(图 1), 通过重组整合质粒 pPic9k-PL 与宿主染色体的单交换将外源碱性果胶酶编码基因 PL 整合于毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 染色体上, 成功构建碱性果胶酶基因工程菌重组毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115^[25], 同时由抗性可知重组菌整合的 PL 基因的拷贝数为 2~3 个。初步发酵试验显示发酵液中有较高的 PL 酶活性, 其表达水平可达 10.4 U/mL, 证明原核生物碱性果胶酶基因在真核宿主 *Pichia pastoris* 成功正确分泌表达。

2 碱性果胶酶发酵过程优化与控制

为了获得有工业应用价值的菌种和发挥菌种的生产潜力, 一般采用以下 3 种方法: 1) 从自然界筛

选高产的野生菌种; 2) 运用基因工程技术构建重组菌; 3) 优化培养基和培养条件以使菌株充分发挥生产能力。因此, 发酵过程的优化与控制在产品的开发过程中具有重要作用, 通过优化发酵条件, 可以大幅提高目标产物的产量和生产强度, 有利于下游的产品提取和纯化, 降低生产成本。影响碱性果胶酶发酵过程的主要因素有: 培养基、培养温度、pH 和培养方式等, 目前国内外关于碱性果胶酶的发酵优化业主要集中于这几方面。刘曦等对枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* TCCC11286 产碱性果胶酶的条件进行了优化研究, 采用 Plackett-Burman 设计和响应面方法优化了发酵培养基, 优化后酶活得到明显提高, 达到了 14.82 U/mL^[23]。李建洲等对 *Alkalibacterium* sp. F26 发酵产碱性果胶酶的培养基和培养条件进行了优化, 考察了碳源、氮源、无机盐、表面活性剂及起始 pH、发酵时间、温度对发酵条件的影响, 经优化后, 酶活达 1015 U/mL^[33]。张保国等对克劳氏芽胞杆菌 *Bacillus clausii* S-4 产碱性果胶酶的固态发酵条件进行了优化, 结果表明, 以甜菜粕为碳源和酶的诱导物, 酵母膏和麸皮作氮源较适宜。培养

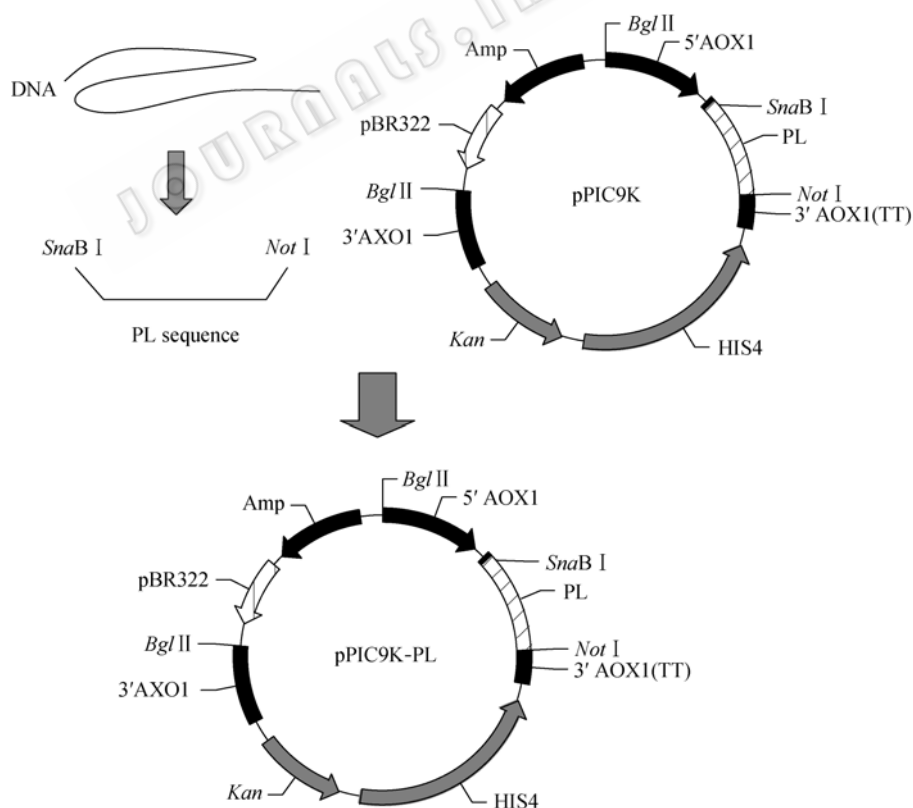


图 1 重组质粒 pPIC9K-PL 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pPIC9K-PL.

温度为 40°C, 发酵时间 72 h, 产酶率可达 2300 U/g (甜菜粕)^[34]。李祖明等对 *Bacillus gibsonii* S-2249 固态发酵生产碱性果胶酶的发酵条件进行了优化, 培养温度为 40°C, 发酵时间 72 h, 酶产率达到 6050 U/g (甜菜粕)^[24]。Sharma 等采用 Plackett-Burman 设计和响应面方法优化了 *Bacillus pumilus* 产碱性果胶酶的发酵条件(碳氮比、K₂HPO₄、pH), 酶活提高了 41 倍, 达到 25 U/mL^[35]。Kuhad 等对链霉菌 *Streptomyces* sp. RCK-SC 发酵生产碱性果胶酶的条件进行优化, 并在最优条件下进行细胞固定化发酵, 产酶水平提高了 32%, 达到了 101 U/mL^[36]。张健红研究发现 *Bacillus* sp. WSHB04-02 的发酵过程为菌体生长和产酶完全偶联型, 不同于一般的次级代谢产物生成规律。野生菌对氧气的的需求量比较高, 当体积溶氧系数为 350 h⁻¹ 时, 菌株 WSHB04-02 的生长旺盛, 在 6 h 就已经达到最大菌体干重, 同时菌体产酶也在 8 h 达到最高值 40 U/mL^[37]。陈晟在 7 L 发酵罐中碱性果胶酶分批发酵实验发现, 后期碳源不足是影响碱性果胶酶产量进一步提高的关键。但简单地增加初糖浓度仅促进菌体大量增长, 而产酶并不能得到大幅度的提高。通过中期补加碳源, 分批补糖可将最终碱性果胶酶产量提升至 49.16 U/mL, 且工艺较为简化, 适合碱性果胶酶的发酵生产^[38]。此外, 温度是另一个影响 PGL 产量和生产强度的主要因素, 刘慧娟等通过温度两阶段控制, 即前期 41°C (0~4 h), 后期 35°C (4 h 以后), 最终碱性果胶酶的酶活达到 53.0 U/mL, 生产强度为 3315 U/(h·L)^[39]。

毕赤酵母作为一个越来越重要的表达系统, 已经成功应用于数百种外源蛋白的高效表达。重组毕赤酵母发酵表达外源目的蛋白一般分为两个阶段: 即细胞生长阶段和蛋白表达阶段。细胞生长阶段的目的是为了达到一定菌体量, 一般能使酵母快速生长的碳源, 为葡萄糖或甘油, 表达阶段以甲醇为碳源和能源进行外源蛋白的表达。*P. pastoris* 在以甲醇作为唯一碳源和能源表达外源目的蛋白时, 细胞生长与蛋白表达是一对尖锐的矛盾, 共同争夺碳源和能源, 致使外源蛋白表达效率降低^[40]。Zhang 等认为可适当抑制细胞的生长来提高产物合成的代谢速率, 如通过控制甲醇浓度, 使细胞处于亚中毒状态, 从

而抑制细胞的生长, 降低菌体的比生长速率, 从而转向提高外源蛋白的表达速率, 使其比产率增加^[41]。基于此, 王芸等对毕赤酵母 GS115 发酵表达 PGL 进行了优化: 在菌体生长阶段采用甘油指数流加策略, 流加 19 h, 菌体浓度可达到 140 g/L; 在诱导阶段采用甲醇分阶段流加策略(图 2), 将甲醇与菌体浓度比例控制在 0.163~0.171 g/g。发酵结束时 PGL 酶活达到 430 U/mL, 生产强度达到 4.34 U/(mL·h), 实现了 PGL 的高产量和高生产强度生产^[42-43]。此外, 温度对 *P. pastoris* 表达外源蛋白有重要影响, 王芸等在表达阶段采用低温策略, 显著降低了细胞死亡率, 削弱了蛋白酶的降解作用, 将碱性果胶酶的产量提升至 930 U/mL^[44]。汪志浩等研究了山梨醇与甲醇混合添加对重组毕赤酵母高密度发酵生产碱性果胶酶的影响。研究发现, 当山梨醇以较低流速加时, 可以显著降低细胞死亡率, 提高醇氧化酶 AOX 的表达量, 并且蛋白酶的降解作用也被削弱, PGL 的产量最高为 1593 U/mL^[45]。

现阶段碱性果胶酶主要是集中于摇瓶和小型发酵罐水平研究, 几乎没有关于碱性果胶酶的中试生产或工业化放大的研究报道。为了实现碱性果胶酶的工业化生产, 陈晟将野生菌 *Bacillus* sp. WSHB04-02 产碱性果胶酶发酵工艺放大到中试规模^[38], 以 $k_L a$ 值相等的原则进行放大。在理论计算的基础上结合

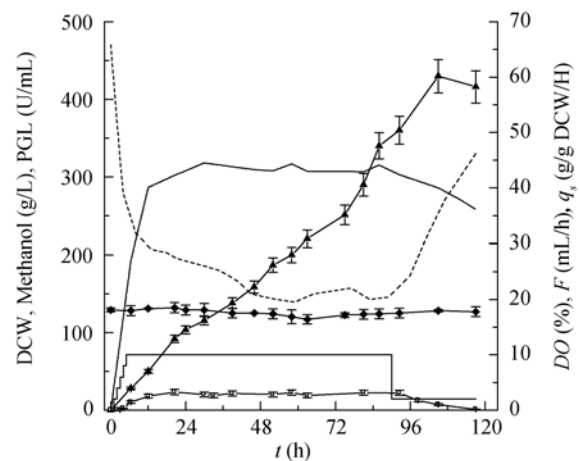


图 2 甲醇流加控制下的发酵过程曲线

Fig. 2 Time-course of PGL production under a proposed methanol-fed control profile. ◆DCW: dried cell weight (g/L); ▲PGL: PGL activity (U/mL); □Methanol: methanol concentration (g/L); —: feeding rate (mL/h); - - : $q_s \times 1000$: specific substrate consumption rate (g/g DCW/h); DO: dissolved oxygen concentration (%).

生产实际, 确定 1 m^3 种子罐采用搅拌转速 300 r/min , 通气量 1 vvm , 罐压 0.05 MPa , 温度 37°C ; 5 m^3 发酵罐采用搅拌转速 220 r/min , 通气量 0.6 vvm , 罐压 0.05 MPa , 温度 37°C 。在 5 m^3 发酵罐中进行碱性果胶酶发酵生产试验, 酶活在 9 h 时达到最高 (14.89 U/mL)。碱性果胶基因整合在重组毕赤酵母染色体上, 具有良好的稳定性, 且毕赤酵母的工艺放大条件比较成熟, 故重组菌的工业化放大研究更为简单。基于对放大过程涉及的气流流量和搅拌转速的计算, 江南大学生物工程学院生物系统与生物加工工程研究室进行了重组毕赤酵母发酵生产碱性果胶酶的逐级放大, 即由 3 L 发酵罐放大至 30 L 、 1 吨 和 10 吨 发酵罐。在 30 L 罐中发酵产酶最高达到 1425 U/mL , 比 3 L 发酵罐中提高了 60.1% 。在 1 吨 发酵罐中进行放大, 酶活水平达到 1315 U/mL , 比 3 L 发酵罐中提高了 47.8% 。在 10 吨 发酵罐中进行工业化研究, 酶活水平达到 1305 U/mL , 比 3 L 发酵罐中提高了 46.6% , 成功实现了碱性果胶酶的中试和工业化生产。

3 碱性果胶酶在纺织工业的应用研究

植物及其果实表面都有一保护层, 以抵御外界对其产生的侵害。作为棉花纤维, 保护层为其初生胞壁。当棉花收获时, 棉纤维与种子分开, 保护层一直附着于种子表面。棉纤维的主要成分是角质层、初生胞壁、次生胞壁和胞腔。棉纤维中的天然杂质主要集中在初生胞壁和角质层中。在初生胞壁中含有 52% 的纤维素、 12% 果胶质、 12% 蛋白质、 7% 蜡质、 3% 灰份及 14% 的其他化合物。在棉织物的精练工艺中, 果胶质及其他一些杂质是主要处理对象。在传统工艺中, 一般用氢氧化钠的强碱溶液在高温下, 有时甚至在超过水沸点情况下, 处理退浆后棉织物, 以除去表面的非纤维素成分。在此过程中, 必须加以仔细控制, 否则棉纤维会形成氧化纤维素而损伤。另一方面, 棉纤维表面因去除了大量起润滑作用的蜡质而失去应有的手感。但更重要的是其对环境产生的负面影响。传统碱精练工艺中除了要加入大量强碱, 还要加入润湿剂、螯合剂、还原剂和软化剂, 并且由于碱精练残液具有很高的 pH , 需要加

入硫酸或二氧化碳进行中和, 无论是用硫酸还是用二氧化碳都会增加排出废水的盐浓度, 使废水具有较高的 COD/BOD , 增加了废水处理的难度。

近年, 越来越多的研究表明, 生物酶处理法可大大改善棉纺织预处理工艺对产品成本及环境的影响。酶精练工艺是指应用酶将纤维表面的杂质去除以提高织物的润湿性和染色性的工艺。酶可以以某种可及度到达棉纤维内部, 且棉纤维表面比纤维主体内部更容易发生酶水解, 为除去剩余的蜡质提供便利。因此在酶精练工艺中不再用到烧碱, 取而代之的是果胶酶。首先, 果胶酶和果胶质生成复合物, 进而将之水解。这样, 原先不溶性的果胶质被分裂, 脱离纤维, 这一过程将连续不断地发生。果胶质从纤维初生胞壁溶解后, 为蜡质的去除提供了便利。与传统的碱精练相比, 酶精练具有以下优势: 1) 显著降低水耗、能耗, 废水量显著减少并且容易处理; 2) 节省染料并获得更稳定的染色效果; 3) 织物的柔软度更好、强度更高; 4) 操作更加安全和简便; 5) 由于用量少, 在使用成本上也具有竞争力, 因而成为纺织工业清洁生产技术的未来发展方向。在碱性条件下, 作为棉纤维主体的纤维素有润胀的趋势。而果胶酶降解果胶, 分散纤维, 又可极大地防止纤维的降解, 同时体系具有天然的抗杂菌污染的能力。与传统工艺相比, 生物法处理后的棉织物更加柔软, 其原因因为处理后的棉织物表面能保留有一定数量的有益蜡质, 而又不影响织物良好的吸水性能。

Hardin 等认为棉蜡和甲酯化的果胶及钙、镁离子交联的果胶酸盐是影响纤维润湿性的主要因素, 并在此基础上提出了果胶酶精练机理假设模型: 果胶酶精练中酶液首先通过表皮层的裂纹或微孔渗透进表皮层, 果胶酶与果胶质接触并将其催化水解, 从而导致部分表皮层被去除或破坏了表皮层的连续性, 从而改善了纤维的润湿性。同时, 他们还认为采用适当浓度的非离子表面活性剂以及适度的机械搅拌作用可提高酶精练效果^[46-48]。

从 20 世纪 90 年代起, 丹麦诺维信公司成功地分离出用于棉精练的碱性果胶酶, 命名该酶为 BioPrep。该酶通过去除棉纤维初生胞壁中的果胶质, 使露出的棉蜡在随后的热水清洗中容易被洗除, 提

高织物的润湿性, 被处理织物的柔软性较传统工艺的好, 并保持较高的强力。该方法使用条件温和, 稳定性好, 最主要的优点是不破坏棉纤维的纤维素结构。Scourzyme L 是诺维信公司于 2003 年最新推出的一款碱性果胶裂解酶, 可用于棉、亚麻、大麻及其混纺织物的生物精练。使用 Scourzyme L 的工艺被称为 Bio-Scouring(生物精练), 其机理为: 果胶质位于蜡质和纤维之间, 类似于“胶水”, 将蜡质粘在纤维上, 先用果胶酶将果胶质去除后, 蜡质被释放出来, 并在随后的含乳化剂、螯合剂的高温处理浴中经乳化去除。经过工厂大量应用实践表明, 利用碱性果胶裂解酶的 Bio-Scouring 的织物润湿性能不亚于常规煮练, 果胶质的游离量近似甚至高于常规煮练。生物精练的织物手感柔软且厚实, 在染色性能等方面酶法与传统法两种方法处理后织物的色泽深度没有明显差异, 而生物处理织物的染色均匀性更好, 生物精练后织物的强力比化学精练高。在与后面的纤维素酶的处理匹配性方面, 生物精练织物用纤维素酶处理的结果比化学精练的缓和。使用 Bio-Scouring 工艺, 与传统工艺相比, 清洗用水至少减少 50%, 不仅节约了大量用水, 同时节约了能源(通常均要用热水清洗)。从某种程度上讲, 利用碱性果胶裂解酶生物精练的成本比传统的化学精练更经济。

Etters 对碱性果胶酶在棉织物精练加工中的应用做了大量工作^[49-51], 发现果胶酶精练后棉织物的毛细管效应值稍高于传统碱精练, 精练织物染色后与传统碱煮练具有相近的染色 K/S 值。Waddell 对棉针织物的碱性果胶酶精练工艺进行了详细论述^[52]。Takagishi 等设计了一套连续式棉织物酶精练设备(包括酶活在线检测装置), 由针刺装置、酶处理浴、J 形堆布箱、湿摩擦装置和水洗装置组成^[53]。Lenting

等研究了连续式精练加工中的影响因素, 认为表面活性剂在酶精练中起到重要作用, 精练的关键在于水洗时有效去除果胶酶降解果胶导致的与纤维结合变得不牢固的表皮层杂质^[54]。Thiry 认为碱性果胶酶对于深色染色棉织物可省去酶精练后的漂白工序^[55]。果胶酶精练还可以与染色同浴进行(一浴三步法: 酶精练→染色→乳化萃取)或与生物抛光整理同浴完成, 实现短流程加工。Yachmenev 发现在超声波(能量强度 0~3 W/cm²)作用下果胶酶精练效率得到提高, 且碱性果胶酶效果好于酸性果胶酶^[56]。超声波增加果胶酶分子通过液体界面层向纤维表面迁移的扩散速率, 有利于果胶酶分子进入纤维内部, 并加速除去反应区域内的果胶酶的水解产物, 提高了反应速率和作用均匀性。需指出的是, 超声波的强化传质作用虽有助于提高加工效率, 达到节能、省时、降低生产成本的功效, 但其工业化因超声波设备昂贵、超声波的方向性以及噪音等问题, 实际上很少应用于工业化生产。如同在其他染整加工中的应用研究一样, 短时间内超声波作用下的酶精练尚不具备工业化应用的条件。此外, Sawada 等研究了果胶酶在双-(2-乙基己基)琥珀酸酯硫酸钠(AOT)/异辛烷反相胶束体系(RMS)中对棉织物的精练效果, 虽取得与常规水相酶精练相近、甚至更好的精练效果, 但需密闭设备, 显然无法应用于现有生产设备^[57]。

一般而言, 棉织物前处理效果的好坏应考察漂白后织物性能。通过测定不同精练加工的织物进行过氧化氢漂白后的各项性能可以发现碱性果胶酶精练织物漂白后在润湿性和白度指标上均达到碱精练织物水平, 但在棉籽壳去除程度上尚略显不足。这是因为碱精练加工时, 强碱和高温条件下棉籽壳虽不能去除, 但会得到充分溶胀, 有利于其在后续漂白时加以去除(表 2)。

表 2 碱精练与酶精练工艺对棉织物性能及加工后废液指标的比较

Table 2 Comparison of the influence of alkaline scouring and enzyme scouring on the quality of cotton and the waste water

Index	Process	
	Alkaline scouring	Enzyme scouring
Whitening degree (%)	92.65	92.66
Removal rate of cotton (%)	100	90
pH of waste solution	>13	9.4
COD _{Cr} of waste solution (mg/L)	2360	1810
BOD ₅	420	1240
BOD ₅ /COD _{Cr}	0.18	0.69

通过研究不同精练法处理后废液的污染物情况(表 2),发现酶精练与传统碱处理相比,其废液的碱性大为降低,有利于生物处理。此外,由于酶法处理的条件比较温和,且专一性地作用于果胶成分,对棉纤维中的其他物质如蛋白质、蜡质等去除较少,使得酶处理后废液中有机物含量较低,表现为 COD_{Cr} 值比较低;另一方面,从废液的 BOD_5 值可以看出,酶精练废液的 BOD_5 值大于碱精练的,其 BOD_5/COD_{Cr} 比也表现出同样结果。一般情况下,当 BOD_5/COD_{Cr} 值大于 0.5 时,表明废水的可生化性较好,即较适合于采用生化处理。因此,综合以上结果可以认为,采用自制酶法精练虽然果胶去除率略低于其他两种方法,但处理后废水的碱性与有机物浓度有较大幅度的降低,且可生化性得到大幅度的提高,有利于降低废水处理环节的能耗与费用,达到较好的环境效益。

虽然,酶制剂在棉织物的精练工艺中的应用和研究已经有了很大的进展,市场上也有多种精练酶制剂出售,但至今未实现大规模的工业化应用。其中酶精练总体效果与碱精练相比尚存在一定的差距是一个主要的原因。与碱煮相比,酶精练效果差主要体现在杂质去除率低、织物润湿性不及碱煮。织物的杂质的残存往往是影响织物质量的重要因素,在批量生产中,织物质量的微小提高就会带来可观的经济效益。因此,提高酶精练效果是实现棉织物精练酶制剂工业化应用的必要前提。棉籽壳是棉织物中最为顽固的杂质,与棉纤维中其他杂质相比,它的降解通常需要更为剧烈的处理条件和更长的时间。因此,棉籽壳的去除是实现棉织物酶精练工艺大规模工业化的关键。

4 结论与展望

综上所述,碱性果胶酶作为一种新型酶制剂,在棉织物的前处理工艺中起着重要的作用,是实现纺织工业清洁生产不可或缺的一部分。就其发酵法生产而言,国内外的研究水平大都停留在对野生菌的筛选诱变阶段,产量停留在 100 U/mL 以下。

目前,具有碱性果胶酶商品化制剂的只有诺维信一家公司,而我国尚未达成工业化生产水平。虽

然较之于化学法煮练,生物精练具有低能耗、低污染等多种优势和长远的生命力,但是仍有大量的问题需要解决,如在实际应用过程中,酶活或稳定性由于催化环境的差异会降低,影响了精练效果。因此,未来的研究重点将围绕以下几个方面进行: 1) 结合现代在线控制与分析技术进一步进行碱性果胶酶发酵过程优化与控制研究,提高产酶水平,降低生产成本,增强产品的市场竞争力; 2) 通过分子定向进化技术对碱性果胶酶进行分子改造,改善其催化特性,使其更好地应用于纺织工业的精练工艺,改善织物品质,降低环境污染; 3) 研究碱性果胶酶与其他纺织用酶如角质酶的复配对棉织物前处理的影响,提高精练效果。

REFERENCES

- [1] Luh BS, Phaff HJ. Studies on polygalacturonase of certain yeasts. *Arch Biochem Biophys*, 1951, **33**(2): 212–227.
- [2] Sakai T, Takaoka A. Purification, crystallization and some properties of endo-polygalacturonase from *Aureobasidium pullulans*. *Agric Biol Chem*, 1985, **49**(2): 449–458.
- [3] Fayyaz A, Asbi BA, Ghazali HM, et al. Pectinesterase extraction from papaya. *Food Chem*, 1993, **47**(2): 183–185.
- [4] Tierny Y, Bechet M, Jonequiert JC, et al. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of genes encoding pectate lyase and pectin methylesterase activities from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J Appl Bacteriol*, 1994, **76**(6): 592–602.
- [5] Miyazaki Y. Purification and characterization of an endo-pectate lyase from *Bacillus macerans*. *Agric Biol Chem*, 1991, **55**(1): 23–30.
- [6] Inan M, Meagher MM. The effect of ethanol and acetate on protein expression. *J Biosci Bioeng*, 2001, **92**(4): 337–341.
- [7] Sapunova LI, Mikhailova RV, Lobanok AG. Properties of pectin lyase preparations from the genus *Penicillium*. *Appl Microbiol Biochem*, 1995, **31**: 435–438.
- [8] Singh SA, Plattner H, Diekmann H. Exopolygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp.. *Enzyme Microbiol Technol*, 1999, **25**(3): 420–425.
- [9] Alana A, Alkorta I, Dominguez JB, et al. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(12): 3755–3759.
- [10] Horikoshi K. Production of alkaline enzymes by alkaliphilic microorganisms. III. Alkaline pectinase of *Bacillus* no. P-4-N. *Agric Biol Chem*, 1972, **36**: 285–293.
- [11] Maceira FIG, Pietro AD, Roncero MIG. Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiol*

- Lett, 1997, **154**(1): 37–43.
- [12] Huang Q, Allen C. An exo-poly-a-D-galacturonosidase, PehB, is required for wild type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol*, 1997, **179**(23): 7369–7378.
- [13] Pressey R, Avants JK. Two forms of polygalacturonase in tomatoes. *Biochim Biophys Acta*, 1973, **309**: 363–369.
- [14] Alonso J, Canet W, Hawell N, et al. Purification and characterization of carrot (*Daucus carota* L) pectinesterase. *J Sci Food Agric*, 2003, **83**(15): 1600–1606.
- [15] Dinnella C, Lanzarini G, Stagni A. Immobilization of an endopectin lyase on g-alumina: study of factors influencing the biocatalytic matrix stability. *J Chem Technol Biotechnol*, 1994, **59**(3): 237–241.
- [16] Wijesundera RLC, Bailey JA, Byrde RJW. Production of pectin lyase by *Colletotrichum lindemuthionum* in culture and in infected bean (*Phaseolus vulgaris*) tissue. *J Gen Microbiol*, 1984, **130**: 285–290.
- [17] Bruhlmann F. Production and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp.. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(10): 3580–3585.
- [18] Wattad C, Freeman S, Dinoor A, et al. A nonpathogenic mutant of *Colletotrichum magna* is deficient in extracellular secretion of pectate lyase. *Mol Plant-Microbe Interac*, 1995, **8**: 621–626.
- [19] Koboyashi T, Koike K, Yoshimatsu T, et al. Purification and properties of a low-molecular weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, **63**(1): 65–72.
- [20] Laurent F, Kotoujansky A, Bertheau Y. Overproduction in *Escherichia coli* of the pectin methylesterase A from *Erwinia chrysanthemi* 3937: one-step purification, biochemical characterization, and production of polyclonal antibodies. *Can J Microbiol*, 2000, **46**(5): 474–480.
- [21] Nikaidou N, Kamio Y, Izaki K. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pectate lyase gene from *Pseudomonas marginalis* N6301. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, **57**(6): 957–960.
- [22] Guo WJ, Lui's Gonza'lez-Candelas, Kolattukudy PE. Cloning of a novel constitutively expressed pectate lyase gene pelB from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, Mating Type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. *J Bacteriol*, 1995, **177**(24): 7070–7077.
- [23] Liu X, Lu FP, Li M, et al. Optimization of culture conditions by a bacterium with high yield of alkaline pectinase. *Biotechnology*, 2008, **16**(6): 71–74.
刘曦, 路福平, 黎明, 等. 碱性果胶酶高产菌株产酶条件的优化. *生物技术*, 2008, **16**(6): 71–74.
- [24] Li ZM, Li HY, Bai ZH, et al. Breeding of *Bacillus gibsonii* for alkaline pectinase production and its solid state cultivation conditions. *Food Sci Technol*, 2008, **9**: 5–9.
李祖明, 李鸿玉, 白志辉, 等. 高产碱性果胶酶吉氏芽孢杆菌的诱变育种与固态培养条件优化. *食品科技*, 2008, **9**: 5–9.
- [25] Zhuge B, Du G, Wei S, et al. Expression of a *Bacillus subtilis* pectate lyase gene in *Pichia pastoris*. *Biochem Eng J*, 2008, **40**(1): 92–98.
- [26] Zhang JH, Li Y, Liu H, et al. Isolation, phylogenetic analysis of a bacterium with high yield of alkaline pectate lyase and optimization of its culture conditions. *Chin J Appl Environ Biol*, 2005, **11**(3): 354–358.
张健红, 李寅, 刘和, 等. 一株碱性果胶酶高产细菌的分离、系统发育分析和产酶条件的初步优化. *应用与环境生物学报*, 2005, **11**(3): 354–358.
- [27] Wang Y, Wang Z, Du G, et al. Enhancement of alkaline polygalacturonate lyase production in recombinant *Pichia pastoris* according to the ratio of methanol to cell concentration. *Bioresour Technol*, 2009, **100**(3): 1343–1349.
- [28] Zhong WH, Wang QJ, Cen PL. Studies on alkaline pectinase producing conditions by *Spirillospora*. *Chin J Appl Environ Biol*, 2000, **6**(5): 468–472.
钟卫鸿, 王启军, 岑沛霖. 螺孢菌 ZG9901 的筛选及其产碱性果胶酶发酵条件研究. *应用与环境生物学报*, 2000, **6**(5): 468–472.
- [29] Sathyanarayana N, Gummadi D, Sunil K. Review microbial pectic transeliminases. *Biotechnol Lett*, 2005, **27**: 451–458.
- [30] Nasser W, Awad AC, Reverchon C, et al. Pectate lyase from *Bacillus subtilis*: molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme. *FEBS Lett*, 1993, **35**(3): 319–326.
- [31] Liu LC, Shen B, Lu J, et al. Cloning and expression of pelA gene from *Bacillus licheniformis* DG-3. *Ind Microbiol*, 2008, **38**(1): 24–29.
刘连成, 沈标, 陆建, 等. 地衣芽孢杆菌碱性果胶酶基因 pelA 的克隆与原核表达. *工业微生物*, 2008, **38**(1): 24–29.
- [32] Zhuge B, Du GC, Shen W, et al. Construction of an engineering strain producing alkaline pectate lyase with pHSh. *Acta Microbiol Sin*, 2006, **46**(4): 657–659.
诸葛斌, 堵国成, 沈微, 等. 利用温控载体构建碱性果胶酯裂解酶工程菌. *微生物学报*, 2006, **46**(4): 657–659.
- [33] Li JZ, Li JH, Xu ZH, et al. Optimizing fermentation of Alkaliphilic and halophilic *Alkalibacterium* sp. F26 for producing alkaline pectinase. *J Food Sci Biotechnol*, 2005, **24**(6): 43–48.
李建洲, 李江华, 许正宏, 等. 嗜盐嗜碱菌 *Alkalibacterium* sp. F26 产碱性果胶酶发酵条件的优化. *食品与生物技术学报*, 2005, **24**(6): 43–48.
- [34] Zhang BG, Bai ZH, Li ZM, et al. Alkaline pectinase production by *Bacillus gibsonii* S-2 with solid state fermentation. *Food Sci Technol*, 2004, **12**: 8–11.
张保国, 白志辉, 李祖明, 等. 吉氏芽孢杆菌 S-2 菌株固态发酵制备碱性果胶酶. *食品科技*, 2004, **12**: 8–11.

- [35] Sharma DC, Satyanarayana T. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumills* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresour Technol*, 2006, **97**(5): 727–733.
- [36] Kuhad RC, Kapoor M, Rustagi R. Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid-state cultivation. *World J Microbiol Biotechnol*, 2004, **20**(3): 257–263.
- [37] Zhang JH. Microbial production of alkaline polygalacturonate lyase by *Bacillus* sp. WSHB04-02. Wuxi: Jiangnan University, 2005.
张健红. 芽孢杆菌 WSHB04-02 发酵法生产碱性果胶酶研究. 无锡: 江南大学, 2005.
- [38] Chen S. Pilot scale production of alkaline polygalacturonate lyase and its stable characteristics. Wuxi: Jiangnan University, 2006.
陈晟. 碱性果胶酶的中试生产和稳定性研究. 无锡: 江南大学, 2006.
- [39] Liu HJ, Hua ZZ, Du GC, *et al.* Temperature controlling strategy for alkaline polygalacturonate lyase production with *Bacillus* sp.. *J Process Eng*, 2007, **7**(4): 786–790.
刘慧娟, 华兆哲, 堵国成, 等. 芽孢杆菌发酵生产碱性果胶酶的温度控制策略. *过程工程学报*, 2007, **7**(4): 786–790.
- [40] Guo MJ, Chu J, Zhuang YP, *et al.* Carbon source metabolism analysis for recombinant *Pichia pastoris* in chemstat based on oxygen and carbon balances. *J Chem Ind Eng*, 2003, **54**(2): 1724–1728.
郭美锦, 储炬, 庄英萍. 基于氧碳平衡的重组巴氏毕赤酵母碳源代谢分析. *化工学报*, 2003, **54**(2): 1724–1728.
- [41] Zhang WH, Bevins MA, Plantz BA *et al.* Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnol Prog*, 2000, **16**(2): 278–284.
- [42] Wang Y, Hua ZZ, Liu LM, *et al.* Key factors of high-level production of polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris*. *Microbiology*, 2008, **35**(3): 341–345.
王芸, 华兆哲, 刘立明, 等. 碱性果胶酶在重组毕赤酵母中高效表达的关键因素研究. *微生物学通报*, 2008, **35**(3): 341–345.
- [43] Wang Y, Hua ZZ, Liu LM, *et al.* High-level production of alkaline polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(4): 635–639.
王芸, 华兆哲, 刘立明, 等. 重组毕赤酵母高密度发酵生产碱性果胶酶的策略. *生物工程学报*, 2008, **24**(4): 635–639.
- [44] Wang Y, Wang ZH, Xu QL, *et al.* Lowering induction temperature for enhanced production of polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, 2009, **44**(9): 949–954.
- [45] Wang ZH, Wang Y, Zhang DX, *et al.* Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia pastoris* fermentation. *Bioresour Technol*, 2009, available online, doi: doi:10.1016/j.biortech.2009.09.025.
- [46] Li Y, Hardin IR. Enzymatic scouring of cotton: effects on structure and properties. *Text Chem Color Am D*, 1997, **29**: 71–76.
- [47] Li Y, Hardin IR. Treating cotton with cellulases and pectinases: effects on cuticle and fiber properties. *Text Res J*, 1998, **68**(9): 671–679.
- [48] Li Y, Hardin IR. Enzymatic scouring of cotton—surfactants, agitation, and selection of enzymes. *Text Chem Color Am D*, 1998, **30**(9): 23–29.
- [49] Ethers JN. Cotton preparation with alkaline pectinase: an environmental advance. *Text Chem Color Am D*, 1999, **1**(3): 33–36.
- [50] Ethers JN, Husain PA, Lange NK. Alkaline pectinase: an eco-friendly approach to cotton preparation. *Text Asia*, 1999, **5**: 83–85.
- [51] Ethers JN, Condon BD, Husain PA, *et al.* Dyeing properties of caustic scoured versus alkaline pectinase prepared fabric. *Color Annual*, 1999, **6**: 41–46.
- [52] Waddell RB. Bioscouring of cotton: commercial applications of alkaline stable pectinase. *AATCC Rev*, 2002, **2**(4): 28–30.
- [53] Takagishi T, Yamamoto R, Kikuyama K, *et al.* Design and application of continuous bioscouring machine. *AATCC Rev*, 2001, **1**(8): 32–34.
- [54] Lenting HBM, Zwier E, Nierstrasz VA. Identifying important parameters for a continuous bioscouring process. *Text Res J*, 2002, **72**(9): 825–831.
- [55] Thiry CM. Enzymes in the toolbox. *AATCC Rev*, 2001, **1**(8): 14–19.
- [56] Yachmenev VG. Effect of sonication on cotton preparation with alkaline pectinase. *Text Res J*, 2001, **71**(6): 527–533.
- [57] Sawada K, Ueda M. Enzyme processing of textile in reverse micellar solution. *J Biotechnol*, 2001, **89**(2): 263–269.