

变色栓菌来源漆酶的酶学性质及对染料脱色性能的研究

邢宇, 王添誉, 陈晓艺, 李苗, 王淑婧, 李金*, 李宪臻

(大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要: 漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,能催化多种酚类化合物和芳香族胺氧化,在食品、造纸、能源、高分子化合物合成等领域有着广阔的应用前景。近年对于漆酶的开发利用逐渐受到重视,作者在变色栓菌摇瓶发酵过程中,通过加入法尼醇诱导调控菌丝形态以提高漆酶产量,结果表明,变色栓菌发酵获得的漆酶活力和蛋白质质量浓度分别达到 (161.37 ± 1.58) U/L和 (29.19 ± 1.30) mg/L,均比对照组提高了10倍以上,其最适反应温度为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,最适pH为4.0,且在 $25\sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 有较好的热稳定性。进一步在酶促反应动力学研究基础上,发现漆酶对伊文思蓝、铬黑T、刚果红3种染料均有一定的脱色效果,其中对伊文思蓝的脱色能力最强,具有较好的应用潜力。

关键词: 漆酶; 变色栓菌; 酶学性质; 染料脱色性能

中图分类号: Q 814.2 文章编号: 1673-1689(2023)01-0075-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.01.006

Study on Enzymatic Properties of Laccase Derived from *Trametes versicolor* and Its Decolorization of Dyes

XING Yu, WANG Tianyu, CHEN Xiaoyi, LI Miao, WANG Shujing, LI Qian*, LI Xianzhen
(School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Laccase is a copper-containing polyphenol oxidase, which can catalyze the oxidation of various phenolic compounds and aromatic amines. It has wide application prospects in food, paper, energy, macromolecular compound synthesis and other fields. In recent years, more and more attention has been focused on the development and utilization of laccase. In this study, during the fermentation via *Trametes versicolor* in flasks, the morphology of mycelium was induced and regulated by adding farnesol, and the yield of laccase was increased. Besides, the activity of laccase fermented from *Trametes versicolor* and the mass concentration of protein reached (161.37 ± 1.58) U/L and (29.19 ± 1.30) mg/L, respectively, which was more than ten times higher than those of the control group. In addition, the optimum reaction temperature was $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, the optimum pH was 4.0, and the laccase had good thermal stability in the range of $25\sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Furthermore, based on the study of enzymatic reaction kinetics, it was found that laccase had a certain decolorization effect on evans blue, congo red, and eriochrome black T dyes, and the decolorization effect of evans blue was the strongest, exhibiting good application potential.

Keywords: laccase, *Trametes versicolor*, enzymatic properties, dye decolorization

收稿日期: 2022-04-08

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31601411,22108024); 辽宁省教育厅科学研究项目(J2020043)。

* 通信作者: 李金(1982—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品酶的发酵、制备和酶学性质研究。

E-mail: liqian19820903@163.com

漆酶是降解多酚类物质的关键酶之一,其能够催化多种酚类、芳香族有机物形成自由基,形成的自由基能够发生聚合或解聚等非酶促次级反应,并且以氧原子为最终受体,产物为水,无其他有害产物。自1883年日本学者首次从日本紫胶漆树中发现漆酶以来^[1],漆酶在食品、造纸、纺织、环保等领域逐渐引起了越来越多的关注^[2-3]。目前,已发现的漆酶种类众多,按照来源可以分为植物漆酶、真菌漆酶和细菌漆酶^[4]。其中,对真菌来源漆酶的研究数量最多,真菌漆酶主要由担子菌和子囊菌产生,常用的菌株是白腐菌和变色栓菌。

变色栓菌是典型的担子菌门真菌,分布在全国21个省份,分泌漆酶的能力较强,且生长速度快,易于培养,并且在降解木质素和染料脱色方面表现出优异的性能,有着极大的工业应用价值^[5]。李灵灵等筛选分离了一种高效降解木质素的菌株BYL-7,并发现了在初始pH 6.7、温度25℃、接种量8%(体积分数)的条件下可明显提高其木质素降解率^[6]。Asgher等发现一种当地白腐真菌IBL-04,通过优化温度和pH等工艺参数,这种真菌处理纺织工业废水的脱色率在3d内显著提高到了84%^[7]。法尼醇是一种低水溶性的非环状半萜醇,被广泛用作化妆品和抗癌药物的原料,是目前发现的真菌中研究最多的群体感应因子^[8-11]。胡建华在5L发酵罐中加入法尼醇改变了变色栓菌的菌丝形态,提高了漆酶的生产,在法尼醇添加浓度为60 μmol/L时,漆酶产量比对照组提高了93%^[12]。在以往的研究中,尚未有关于以法尼醇作为信号分子诱导的变色栓菌发酵体系所产生的漆酶的酶学性质研究,并且对该体系中产生的漆酶在染料脱色方面的探索较少。

作者以土豆培养基为基质,利用变色栓菌进行漆酶的发酵生产,发酵过程中采用法尼醇作为诱导剂^[13],测定了漆酶酶活力和蛋白质质量浓度,进一步研究了漆酶的酶学性质和酶促反应动力学。研究其对伊文思蓝、铬黑T、刚果红3种染料的脱色效果,为揭示漆酶的催化机制提供了基础数据,同时也为进一步深入探索漆酶的催化机制和对漆酶分子在蛋白质水平上进行改造以获得具有工业应用价值的漆酶提供了数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

变色栓菌(*Trametes versicolor*,编号CICC14001):

中国工业微生物菌种保藏管理中心提供。

1.2 实验试剂

邻苯二酚:上海阿拉丁试剂有限公司产品;酒石酸、酒石酸钠:国药集团化学试剂有限公司产品;法尼醇:合肥博美生物科技有限责任公司产品;磷酸二氢钾、CaCl₂·2H₂O、MgSO₄·7H₂O、NH₄H₂PO₄、FeSO₄·7H₂O、葡萄糖、CuSO₄·5H₂O:天津市科密欧化学试剂有限公司产品;CaCl₂·2H₂O、MgSO₄·7H₂O、NH₄Cl:天津市大茂化学试剂厂产品;考马斯亮蓝G250:鼠来宝(武汉)生物科技有限公司产品;刚果红、铬黑T、伊文思蓝:上海源叶生物科技有限公司产品;以上试剂均为分析纯(AR)。

1.3 主要设备

电子天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司产品;立式高压蒸汽灭菌锅:浙江力辰仪器科技有限公司产品;SpectraMax Plus384酶标仪:上海仪电科学仪器股份有限公司产品;紫外-可见分光光度计:铂金埃尔默仪器有限公司产品;微生物培养箱:杭州坤天科技有限公司产品;BILON超声波清洗机:上海比朗仪器制造有限公司产品;PHSJ-3F型pH计:上海雷磁仪器有限公司产品;TDZ5-WS台式低速离心机:上海三崑医疗设备有限公司产品;热风循环烘箱:吴江华飞电热设备有限公司产品;XY-SYG-11恒温水浴锅:上海昕仪恒温水浴锅公司产品;全温型多振幅高速轨道摇床:上海智城分析仪器厂产品。

1.4 菌种培养方法

1.4.1 斜面活化 配制土豆培养基,称取去皮土豆200g,加入适量去离子水,煮沸30min,纱布过滤后定容至1L,然后加入葡萄糖20g、琼脂粉15g,加热融化后分装至试管中,经121℃、20min高温灭菌后制成斜面,将菌接种在斜面上26℃培养7d。

1.4.2 种子扩培 配制土豆培养基,称取去皮土豆200g,加入适量去离子水,煮沸30min,纱布过滤后定容至1L,再加入葡萄糖20g,搅拌至溶解,分装至250mL三角瓶中(100mL/瓶)。将斜面菌丝体接种到种子培养基中,26℃、150r/min培养7d,即形成一级种子培养液;再将一级种子培养液接种到新鲜的种子培养基中,接种量为10%(体积分数),26℃培养5d,即形成二级种子培养液。

1.4.3 摇瓶发酵 发酵培养设置两组,分别为常规发酵体系(即不添加法尼醇的对照组)与以法尼醇

为诱导剂的变色栓菌发酵体系。常规发酵体系的发酵培养基配方为:1 L培养基中含 KH_2PO_4 0.2 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.035 g、葡萄糖 2 g、 NH_4Cl 0.27 g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g,充分溶解后,分装至 250 mL 三角瓶中(50 mL/瓶),随后将二级种子培养液(菌球状培养物)接种于发酵培养基中,26 ℃、150 r/min 培养 7 d,接种量为 10%(体积分数),发酵前期 pH 控制在 4.0 左右。法尼醇为诱导剂的变色栓菌发酵体系则是在接种前将法尼醇经 0.22 μm 无菌滤膜过滤添加到常规发酵培养基中,浓度为 4 mmol/L^[13],26 ℃、150 r/min 培养 7 d,诱导漆酶发酵过程。

1.5 酶活力测定

向 10 mL 离心管中加入 3 mL 0.1 g/dL 邻苯二酚溶液和适量漆酶发酵液,在 25 ℃下反应 5 min,随后利用紫外-可见分光光度计测定 450 nm 处的吸光度,已知摩尔吸光系数为 2 211 L/(mol·cm),漆酶酶活力的计算公式如下式(1):

$$E = \frac{(A_{\text{测}} - A_0) \times V_{\text{总}}}{\varepsilon \times V_{\text{酶}} \times \Delta t} \times 10^6 \quad (1)$$

式中: E 为酶活力,U/L; $V_{\text{酶}}$ 为漆酶溶液体积,mL; $V_{\text{总}}$ 为该反应体系总体积,mL; $A_{\text{测}}$ 为酶液反应后吸光度; A_0 为酶液未反应前吸光度; Δt 为反应时间,min; ε 为摩尔吸光系数,L/(mol·cm)。

酶活力定义为:1 min 氧化 1 μmol 邻苯二酚所需漆酶的量为一个酶活力单位(U)。实验结果为 3 个平行实验的平均值。

1.6 蛋白质质量浓度测定

1.6.1 制作 BSA 标准曲线 根据 Bradford 的原理,配制 1.0 mg/mL 牛血清白蛋白溶液,并稀释为 10、20、30、50、80、100 μg/mL 的标准蛋白质溶液。将 800 μL 考马斯亮蓝 G250 溶液加入 200 μL 标准蛋白质溶液中,混合均匀,在室温下反应 5 min,确定 595 nm 处的吸光度,并绘制吸光度-蛋白质质量浓度标准曲线。

1.6.2 发酵液中蛋白质质量浓度测定 将发酵液在 4 ℃、4 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液,加入 800 μL 考马斯亮蓝 G250 溶液,振荡混合均匀,室温下放置 5 min,测定 595 nm 处吸光度,根据标准曲线计算蛋白质质量浓度。

1.7 漆酶酶学性质研究

1.7.1 最适反应温度与 pH 向各试管中加入 3 mL pH 4.0 的 0.1 g/dL 邻苯二酚溶液和适量漆酶发酵液,分别在 20、30、40、50、60 ℃下反应 5 min,测定 450 nm 处吸光度,每组设置 3 组平行实验,实验结果为 3 组平行实验的平均值。

向小烧杯中加入 3 mL 的 0.1 g/dL 邻苯二酚溶液和适量的漆酶发酵液,用 pH 计调节 pH 到 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0,分别在 25 ℃下反应 5 min,然后于 450 nm 处测定吸光度,每组设置 3 个平行实验,以每组数据中的最大酶活力为 100%,测定漆酶发酵液在各条件下的相对酶活力。

1.7.2 漆酶的热稳定性 将培养好的漆酶发酵液在 25、35、45、55、65、75 ℃下保藏 1 h,而后加入底物,在 25 ℃下反应 5 min,在 450 nm 处测定吸光度,每组设置 3 个平行实验。

1.7.3 酶促反应动力学 分光光度法由于其反应灵敏且步骤简单,因此被广泛应用于生物化学的分析,朗伯-比尔定律是分光光度法的理论基础,该定律描述了当一束平行单色光垂直穿过装有均匀非散射体系溶液的器皿时,在液层厚度保持不变的情况下,溶液吸光度与浓度成正比^[14-15]。将漆酶与邻苯二酚混合后在 25 ℃的条件下反应,分别在反应时间为 2、5、8、10、15、20、25、30、35 min 时,取样并测定吸光度,利用以下公式对酶促反应动力学进行拟合。

朗伯-比尔定律的数学表达式为:

$$A = \lg\left(\frac{1}{T}\right) = \varepsilon bc \quad (2)$$

式中: A 为溶液吸光度; T 为溶液透射比,即为出射光强度与入射光强度之比; ε 为摩尔吸光系数,L/(mol·cm); b 为液层厚度,cm; c 为吸光物质浓度,mol/L。

根据朗伯-比尔定律,可以分析吸光度与产物浓度的关系,通过时间与吸光度的关系可以建立产物浓度与反应时间的动力学方程。一阶动力学方程为:

$$Y_1 = \ln \frac{C_a}{C_a - C_b} = k_1 t \quad (3)$$

式中: C_a 为底物浓度,mol/L; C_b 为产物浓度,mol/L; k_1 为反应速率常数,min⁻¹; t 为反应时间,min。

二阶动力学方程为:

$$Y_2 = \frac{C_b}{C_a \cdot (C_a - C_b)} = k_2 t \quad (4)$$

式中: C_a 为底物浓度, mol/L; C_b 为产物浓度, mol/L; k_2 为反应速率常数, L/(mol·min); t 为反应时间, min。

将不同浓度的邻苯二酚溶液溶解于 pH 为 4.0 的酒石酸缓冲液中, 随后加入适量漆酶发酵液, 在 25 °C 下反应 5 min, 建立吸光度-邻苯二酚浓度标准曲线。随后将一定浓度邻苯二酚溶液与漆酶发酵液混合, 反应过程中定时从反应体系中吸取溶液测定 450 nm 处的吸光度。米氏方程的表达式如下式(5)所示, 进一步计算酶促反应动力学参数。

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

式中: V_0 为产物生成速率, mmol/(L·min); V_{\max} 为漆酶与底物反应达到饱和时的反应速率, mmol/(L·min); $[S]$ 为邻苯二酚浓度, mmol/L; K_m 为米氏常数, mmol/L。

1.8 漆酶对染料脱色性能的研究

为考察漆酶对刚果红、铬黑 T、伊文思蓝 3 种染料的脱色性能, 分别将 3 种染料溶解于 50 mmol/L pH 为 4.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中, 并对伊文思蓝、铬黑 T、刚果红 3 种染料在 400~800 nm 进行了光谱扫描, 确定特征吸收波长^[16]。随后取 10 mL 发酵液上清液, 向溶液中加入 30 mL 的染料, 其中染料质量浓度均为 20 mg/L, 在反应过程中, 保持反应温度为 25 °C, 分别在 3 种染料的特征吸收波长下, 于 0、2、5、7、12、24、28 h 用紫外-可见分光光度计测定吸光度, 并计算染料脱色率, 同时以脱色率为纵坐标, 处理时间为横坐标绘制曲线。脱色率计算公式如式(6)所示:

$$D(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (6)$$

式中: D 为脱色率, %; A_0 为染料脱色前吸光度; A 为染料脱色后吸光度。

2 结果与分析

2.1 漆酶酶活力与蛋白质质量浓度测定

将邻苯二酚溶液和适量漆酶发酵液混合, 测得的漆酶酶活力为 (161.37±1.58) U/L。取 200 μL 离心后的发酵上清液, 向溶液中加入 800 μL 考马斯亮蓝 G250 溶液, 混合后测定 595 nm 处吸光度, 计算

得到加入法尼醇诱导的漆酶发酵体系中的蛋白质质量浓度为 (29.19±1.30) mg/L。而在对照组中, 常规发酵体系中的酶活力与蛋白质质量浓度仅为 (15.73±3.49) U/L 和 (2.78±0.37) mg/L, 远远低于添加法尼醇为诱导剂的变色栓菌发酵体系中的酶活力与蛋白质质量浓度。在 Hu 等的研究中, 利用 60 μmol/L 的法尼醇诱导变色栓菌生产漆酶, 发酵酶活力可达 629.3 U/L, 与对照组相比, 增加了 92.3%^[17]。Wang 等发现, 添加法尼醇诱导的培养体系在培养 6 d 后, 胞外漆酶产量达到最大值, 酶活力达到 (2 189.2±54.7) U/L, 比对照组的漆酶产量提高了 6.8 倍^[18]。作者研究结果进一步证明了法尼醇的加入可以显著提高变色栓菌产漆酶的能力。

2.2 反应温度对漆酶酶活力的影响

将 pH 为 4.0 的 0.1 g/dL 邻苯二酚溶液与适量漆酶发酵液混合, 在 20~60 °C 反应 5 min, 测得吸光度后通过酶活力计算公式得到酶活力。由图 1 所示, 漆酶相对酶活力整体呈现出先增大后减小的趋势, 在 20~40 °C 时, 漆酶酶活力随着温度的上升而提高; 当反应温度为 40 °C 时, 漆酶酶活力达到最大值 (160.32±5.34) U/L, 可能是由于温度增加, 使得邻苯二酚分子间热运动速率加快, 分子间碰撞机会增加, 漆酶的 T1 型 Cu^{2+} 与邻苯二酚碰撞机会也增加, 进而强化了催化邻苯二酚的反应过程。值得注意的是, 当反应温度达到 40~60 °C 时, 虽然此时反应温度更高, 分子间热运动速率更快, 增加了邻苯二酚与漆酶之间的接触机会, 但在高温环境下, 发酵液中漆酶本身结构的稳定性遭到了破坏。并且, 漆酶作为单电子还原酶, 其催化机理本质上是单电子的传递和自由基的形成, 漆酶分子中的 T1 型 Cu^{2+} 首先通过底物吸收单电子, 使底物变成自由基, 自由基可以进行歧化、聚合等非酶促反应, 而被吸收的单电子通过 His-Cys-His 途径从 T1 型 Cu^{2+} 传递到由 T2 型 Cu^{2+} 和 T3 型 Cu^{2+} 组成的三核铜团簇中, 随后氧原子作为最终电子受体经过还原形成水^[12-13], 电子传递的速率影响着自由基的形成, 而高温环境可能会阻碍电子的传递, 导致自由基形成难度增加, 漆酶催化活性减弱。这与其他漆酶产生菌的研究一致, 张初署等研究了食用菌 SJ-1 漆酶在 25~45 °C 时漆酶酶活力的变化, 发现在 25~35 °C 时, 漆酶酶活力与反应温度成正比, 当反应温度为 35 °C 时, 漆酶酶活力达到最大值, 达到峰值后漆酶酶活力下降,

直至 40 °C 后趋于稳定^[19]。Asgher 等通过检测变色栓菌来源漆酶酶活力,发现温度为 45 °C 时的酶活力最高。以上研究表明,变色栓菌来源漆酶的最适反应温度为 35~45 °C^[20],而作者研究在添加法尼醇的情况下,变色栓菌漆酶的最适反应温度未发生明显变化。

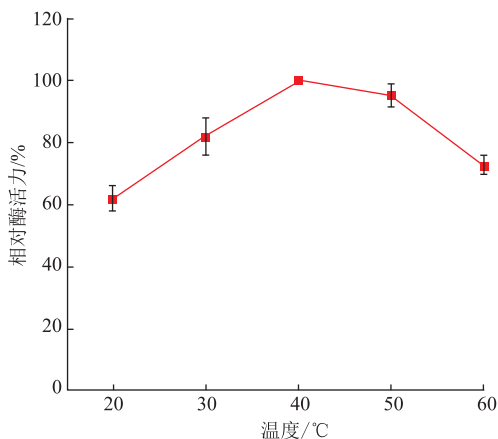


图 1 温度对漆酶酶活力的影响

Fig. 1 Effect of temperature on laccase activity

2.3 热稳定性研究

将漆酶发酵液在不同温度下保持 1 h 后,进行酶活力测定,进一步考察变色栓菌来源漆酶的热稳定性。由图 2 所示,随着保藏温度的升高,在 25~55 °C 的条件下漆酶酶活力缓慢下降,在 55 °C 时,相对酶活力为 94.32%;之后随着保藏温度逐渐升高至 65 °C 时,漆酶酶活力急剧下降,相对酶活力仅为 14.29%;当保藏温度进一步升高至 75 °C 时,几乎检测不到漆酶酶活力,这一现象说明高温完全破坏了漆酶的结构,使漆酶三级结构的稳定性遭到破坏,发生变性。由实验结果可以看出,变色栓菌来源的漆酶在 25~55 °C 时具有较好的热稳定性。Zhang 等的研究发现,变色栓菌来源漆酶在 20~60 °C 时的热稳定性良好^[21]。Wen 等利用变色栓菌来源漆酶在 300~330 K 条件下具有较好的热稳定性^[22]。本研究与文献中的实验规律一致,表明法尼醇诱导的变色栓菌来源漆酶也具有较好的热稳定性。

2.4 pH 对酶活力影响

漆酶的活性中心是催化众多底物的关键部位,而不同的 pH 会通过使漆酶的活性部分或底物处于不同的解离状态,或通过改变漆酶的空间结构从而阻碍漆酶与底物的结合,从而影响漆酶的活性^[23]。如图 3 所示,在酸性条件下,当 pH 由 3.0

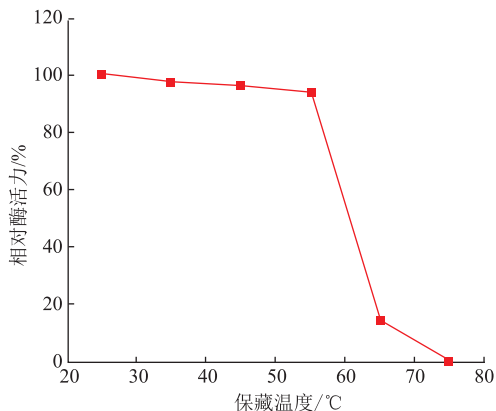


图 2 变色栓菌来源漆酶的热稳定性

Fig. 2 Thermal stability of laccase from *Trametes versicolor*

增加至 4.0 时,漆酶酶活力上升且达到最大值;当 pH 再增加至 5.0 时,漆酶酶活力缓慢下降;而当 pH 为 7.0 时,漆酶相对酶活力迅速下降至 40.69%。由此可知,在偏酸性条件下,更有利于漆酶活性中心与底物结合,漆酶的活性更高,而在 pH 较高的条件下,漆酶与底物的结合受到阻碍,这可能是因为变色栓菌的最适生长 pH 通常为弱酸性^[24],其产生的漆酶同样对偏酸性的条件有一定的适应性。Aydemir 等的研究表明,变色栓菌来源漆酶在 pH 为 4.0 时酶活力最高^[25]。Wen 等发现变色栓菌来源漆酶在 pH 为 4.0 的条件下表现出最大活性^[22]。这与本研究中添加法尼醇诱导的变色栓菌来源漆酶的最适 pH 一致。

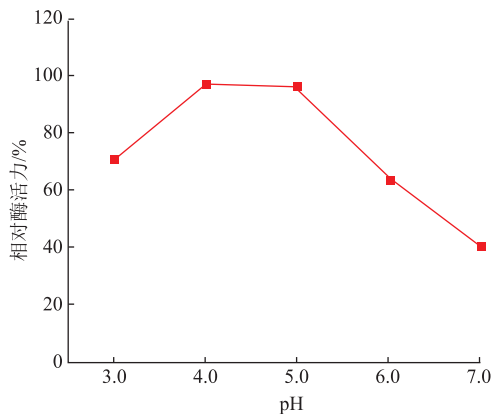


图 3 pH 对漆酶酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH on laccase activity

2.5 酶促反应动力学

由图 4 可以看出,随着漆酶与邻苯二酚反应的进行,在 0~8 min 时,产物浓度随着反应时间的进行

而逐渐增大,几乎成正比关系,在此之后,随着反应时间的进行,产物浓度的增长趋势逐渐减小,直到反应 30 min 后,漆酶与底物反应达到饱和,产物浓度趋于稳定。这证实了在初始 0~8 min 内测定酶活力,能够更好地反映出变色栓菌漆酶酶活力的大小。

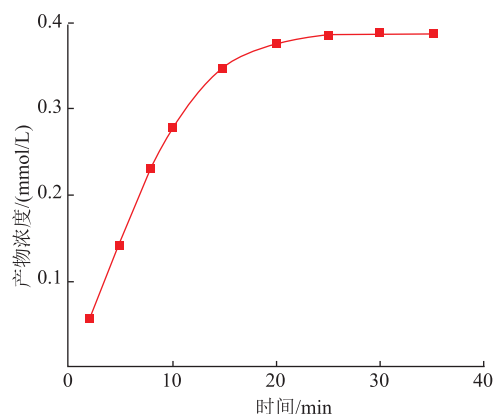


图 4 漆酶反应溶液产物浓度与反应时间的变化关系

Fig. 4 Relationship between product concentration of laccase reaction concentration and reaction time

由图 5 可见,经一阶动力学方程与二阶动力学方程拟合后,得到 R^2 分别为 0.969 4 (见图 5(a)) 和 0.970 9 (见图 5(b)), 证明所拟合的曲线能够反映产物浓度与反应时间的关系,同时, Y_1 (见图 5(a)) 和 Y_2 (见图 5(b)) 与反应时间呈较好的线性关系。

另一方面, K_m 即米氏常数, 是酶促反应的一个重要参数, 反映了酶与底物之间亲和力的强度, K_m 越大, 表明漆酶与底物之间亲和力越弱, K_m 越小, 表明漆酶与底物之间亲和力越强。由图 6 所示, 根据米氏方程 (见公式 (5)), 利用双倒数法, 将得到的坐标拟合得到米氏常数 K_m 为 4.69 mmol/L, V_{max} 为 0.059 mmol/(L·min), 经拟合, 漆酶对底物的酶促反应动力学方程为:

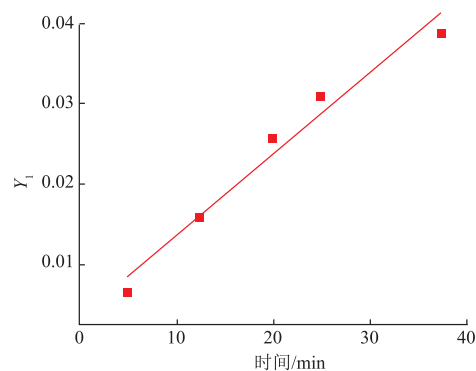
$$y=79.681\ 06x+16.979\ 24 \quad (7)$$

式中: y 为漆酶与底物反应速率的倒数, (L·min)/mmol; x 为邻苯二酚浓度的倒数, L/mmol。

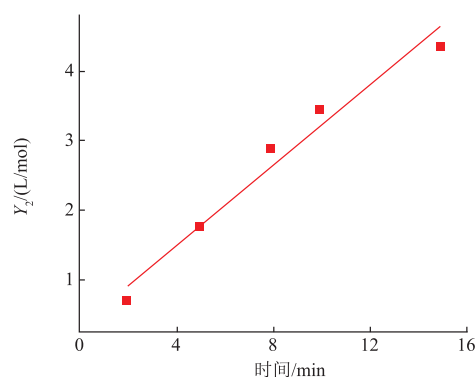
其中 R^2 为 0.991 3, 表明该方程拟合度较好, 能够反映变色栓菌来源漆酶催化过程中速率的变化。

2.6 漆酶对染料脱色性能的研究

作者以偶氮类染料伊文思蓝、铬黑 T 以及酸性染料刚果红为研究对象, 探究了变色栓菌漆酶对不同染料的脱色性能。漆酶对 3 种染料的光谱扫描结果如图 7 所示, 可以在各染料最大吸收波长附近观



(a) 一阶动力学分析



(b) 二阶动力学分析

图 5 一阶动力学分析和二阶动力学分析

Fig. 5 First-order kinetic analysis and second-order kinetic analysis

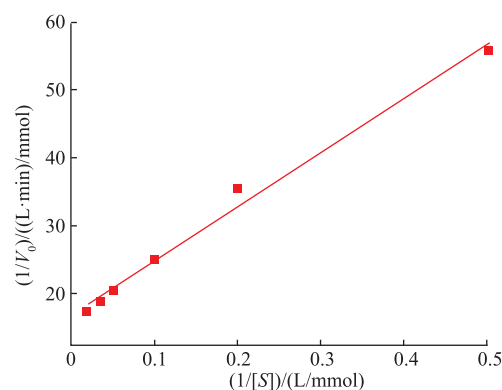


图 6 变色栓菌来源漆酶的 K_m 测定

Fig. 6 Determination of K_m value of laccase from *Trametes versicolor*

察到特征吸收峰, 伊文思蓝、刚果红、铬黑 T 的特征吸收波长分别为 600、555、506 nm。

如图 8 所示, 随着处理时间的增长, 脱色率逐渐上升。伊文思蓝和铬黑 T 在前 2 h 脱色率提高较快, 2~28 h 脱色率变化较为缓慢, 其中伊文思蓝的

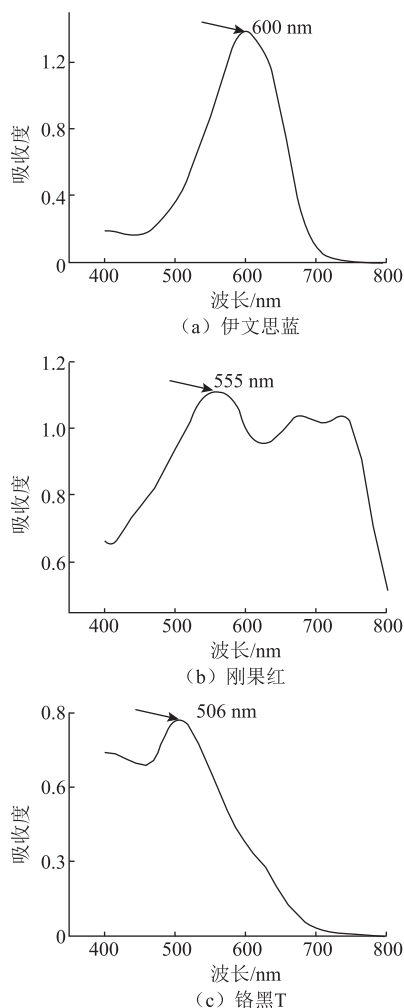


图7 伊文思蓝、刚果红和铬黑 T 的可见吸收光谱图

Fig. 7 Spectrogram of evans blue, congo red and eriochrome black T

脱色效果最佳,处理时间 2 h 时,脱色率为 78.01%, 当时间增加到 28 h 时,脱色率为 86.30%。根据相关文献报道,漆酶能够氧化伊文思蓝中的偶氮基团进而降解伊文思蓝,从而实现染料脱色^[26]。Zhang 等利用变色栓菌来源的漆酶进行伊文思蓝脱色实验,发现在 pH 为 4.6、温度为 40 °C 的条件下,反应 12 h 后,脱色率为 82.8%^[27]。本研究中采用法尼醇诱导变色栓菌发酵生产的漆酶,对伊文思蓝也表现出了良好的脱色性能,在 pH 为 4.0、温度为 25 °C 的条件下反应 12 h,脱色率为 83.34%,略高于文献报道的相关数据。实验结果还表明,漆酶对刚果红的脱色效果较差,处理 28 h 后,脱色率仅为 35.67%。漆酶的氧化还原电位在染料脱色中起着至关重要的作用,由于染料结构的不均匀性会在一定程度上影响染

料的分子密度从而改变氧化还原电位,因此这可能是导致漆酶对酸性染料(如刚果红)降解速率不理想的原因^[28]。因此,变色栓菌来源漆酶对偶氮类染料(如伊文思蓝、铬黑 T)降解效率较高,具有潜在的工业应用价值。

在其他相关研究中,有研究者发现将漆酶固定在载体上,可以有效提高漆酶对蒽醌类染料的脱色能力^[27,29],这将为下一阶段探索提高漆酶脱色性能的方法和拓宽漆酶在食品、化工和纺织等行业中的应用提供技术准备和数据支持。

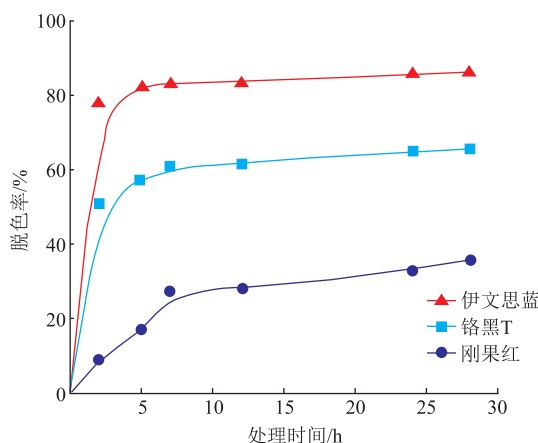


图8 漆酶对伊文思蓝、铬黑 T、刚果红 3 种染料的脱色率

Fig. 8 Decolorization rates of evans blue, congo red and eriochrome black T by laccase

3 结语

通过添加法尼醇作为诱导剂提高了变色栓菌发酵生产漆酶的酶活力和蛋白质质量浓度,分别达到(161.37±1.58) U/L 和(29.19±1.30) mg/L。进一步通过单因素实验探究了用法尼醇诱导变色栓菌产漆酶的酶学性质,结果表明,添加法尼醇诱导的变色栓菌发酵生产的漆酶,其酶学性质并未发生改变,在反应温度为 40 °C、pH 为 4.0 时,漆酶活性最高,且在 25~55 °C 时热稳定性较好。在酶促反应动力学研究的基础上,发现了变色栓菌来源漆酶在染料脱色方面具有良好的工业应用潜力,对伊文思蓝、铬黑 T、刚果红 3 种染料都表现出了一定的脱色效果,其中对伊文思蓝的脱色效果最好,脱色率 2 h 内可以达到 78.01%。本研究对深入探索法尼醇刺激变色栓菌所产漆酶脱色性能的机制有着重要的研究意义,并为进一步拓宽漆酶在食品、化工和纺织等行业中的应用提供了技术基础和数据分析支持。

参考文献:

- [1] 王志新. 血红密孔菌的筛选、鉴定及其发酵产漆酶的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [2] 游月丽, 梁秀贤. 漆酶在食品领域的研究进展[J]. 中国食品, 2021(18): 124-125.
- [3] MORENO A D, IBARRA D, EUGENIO M E, et al. Laccases as versatile enzymes: from industrial uses to novel applications[J]. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2020, 95(3): 481-494.
- [4] BALDRIAN P. Fungal laccases-occurrence and properties[J]. **FEMS Microbiology Reviews**, 2006, 30(2): 215-242.
- [5] 赵文娟, 徐升运, 任平. 变色栓菌产漆酶培养条件优化及酶学特性研究[J]. 食品工业, 2013, 34(3): 162-166.
- [6] 李灵灵, 王敬红, 赵铎, 等. 木质素降解菌 BYL-7 的筛选及降解条件优化[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4059-4071.
- [7] ASGHER M, AZIM N, BHATTI H N. Decolorization of practical textile industry effluents by white rot fungus *Coriolus versicolor* IBL-04[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2009, 47(1): 61-65.
- [8] 郭俊琪, 王征, 张伟欣, 等. 代谢工程改造酿酒酵母提高法尼醇产量[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1257-1268.
- [9] 柯慧慧, 牛永武, 顾頔, 等. 真菌群体感应分子法尼醇及其作用机制[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(3): 862-868.
- [10] 李豪, 吴嘉南, 陈启和. 群体感应分子法尼醇对桦褐孔菌液体发酵过程中三萜及白桦脂酸含量的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(12): 171-176.
- [11] 杨媛宁, 马晓平, 古玉, 等. 群体感应分子—法尼醇与白色念珠菌的相互作用[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(1): 28-36.
- [12] 胡建华. 变色栓菌发酵产漆酶的过程优化[D]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
- [13] 王科峰. 变色栓菌产漆酶和多糖的发酵过程调控[D]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
- [14] 潘中达, 赵保丹, 周进. 水溶液中染料吸光度与浓度的非线性关系[J]. 实验室研究与探索, 2014, 33(2): 22-26.
- [15] 杨晓明, 黄海萍, 程远坤. 一款低含量硅酸盐水质分析仪的设计及应用[J]. 广州化工, 2021, 49(18): 76-78.
- [16] 戴文魁. 白腐菌混合培养产漆酶及其机制和脱色效果研究[D]. 威海: 山东大学, 2008.
- [17] HU J, WANG F, MA A, et al. Farnesol stimulates laccase production in *Trametes versicolor*[J]. **Engineering in Life Sciences**, 2016, 16: 364-370.
- [18] WANG K, GUO C, JU F, et al. Farnesol-induced hyperbranched morphology with short hyphae and bulbous tips of *Coriolus versicolor*[J]. **Scientific Reports**, 2018, 8(1): 1-12.
- [19] 张初署, 孙杰, 毕洁, 等. 食用菌 SJ-1 漆酶酶学性质及降解黄曲霉毒素 B₁ 的研究[J]. 核农学报, 2017, 31(7): 1317-1322.
- [20] ASGHER M, NOREEN S, BILAL M. Enhancing catalytic functionality of *Trametes versicolor* IBL-04 laccase by immobilization on chitosan microspheres[J]. **Chemical Engineering Research & Design**, 2017, 119: 1-11.
- [21] ZHANG S, WU Z, CHEN G, et al. An improved method to encapsulate laccase from *Trametes versicolor* with enhanced stability and catalytic activity[J]. **Catalysts**, 2018, 8(7): 1-11.
- [22] WEN X, ZENG Z, DU C, et al. Immobilized laccase on bentonite-derived mesoporous materials for removal of tetracycline[J]. **Chemosphere**, 2019, 222: 865-871.
- [23] 张阳. pH 值及温度对杂色云芝漆酶活性的影响[J]. 资源节约与环保, 2015(3): 86.
- [24] 张莉. 白腐菌(*Trametes pubescens* MB89)漆酶酶学性质及其在酚类化合物的降解特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
- [25] AYDEMIR T, GVLER S. Characterization and immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetic chitosan-clay composite beads for phenol removal[J]. **Artificial Cells Nanomedicine & Biotechnology**, 2015, 43(6): 425-432.
- [26] ESPINA G, MORENO C, NAVARRET M, et al. A novel and highly active recombinant spore-coat bacterial laccase, able to rapidly biodecolorize azo, triarylmethane and anthraquinonic dyestuffs[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021, 170: 298-306.
- [27] ZHANG M, ZHANG Y, YANG C, et al. Facile synthesis of recyclable laccase-mineral hybrid complexes with enhanced activity and stability for biodegradation of evans blue dye[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021, 188: 783-789.
- [28] NAVAS L E, CARBALLO R, LEVIN L, et al. Fast decolorization of azo dyes in alkaline solutions by a thermostable metal-tolerant bacterial laccase and proposed degradation pathways[J]. **Extremophiles**, 2020, 24(3): 705-719.
- [29] NIKOLINA P, DUNJIA P, MAJA M, et al. Immobilization of yeast cell walls with surface displayed laccase from *Streptomyces cyaneus* within dopamine-alginate beads for dye decolorization[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021, 181: 1072-1080.