



文章栏目: 水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.201912179

中图分类号 X522

文献标识码 A

李燕, 杨建花, 李宝库, 等. 漆酶-介体系统对多种不同结构染料的脱色效果[J]. 环境工程学报, 2020, 14(12): 3308-3316.

LI Yan, YANG Jianhua, LI Baoku, et al. Decolorization of dyes with different structures by laccase-mediator system[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2020, 14(12): 3308-3316.

漆酶-介体系统对多种不同结构染料的脱色效果

李燕^{1,2}, 杨建花², 李宝库¹, 朱蕾蕾^{2,*}

1. 河北大学药学院, 保定 071002

2. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 工业酶国家工程实验室, 天津 300308

第一作者: 李燕(1993—), 女, 硕士研究生。研究方向: 工业酶。E-mail: liyan@tib.cas.cn

*通信作者: 朱蕾蕾(1982—), 女, 博士, 研究员。研究方向: 工业酶。E-mail: zhu_ll@tib.cas.cn

摘要 为研究漆酶在染料废水处理方面的潜力, 选用毕赤酵母表达的担子菌 *Moniliophthora roreri* 来源的漆酶 Mr12, 与小分子介体(1-羟基苯并三唑、藜芦醇、对香豆酸、N-羟基邻苯二甲酰亚胺)协同, 用于对 5 类不同结构和类型的染料(偶氮类、三苯甲烷类、蒽醌类、靛蓝类、吩噻嗪类)的脱色效果研究。结果表明: 在小分子介体 1-羟基苯并三唑(HOBT)的帮助下, 漆酶对属于偶氮类、三苯甲烷类、蒽醌类、靛蓝类的 9 种染料脱色率均能达到 95% 以上; 对结构更复杂的杂环吩噻嗪类染料天青 I 的脱色效率均较低, 在最佳介体对香豆酸辅助下可达 40% 的脱色率。进一步对天青 I 染料脱色体系优化发现, 在 pH 为 6.0、对香豆酸浓度为 2 mmol·L⁻¹、漆酶浓度为 125 U·L⁻¹ 时, Mr12 对天青 I 的脱色率可达到 81%。以上结果表明该重组漆酶在染料废水处理和环境保护等方面具有较好的应用价值和前景。

关键词 漆酶; 染料脱色; 介体; 毕赤酵母

我国印染废水排放量占纺织工业废水排放量的 80%, 已成为污水排放量较大的行业之一^[1]。大部分纺织染料具有复杂的化学结构和高化学稳定性, 因此其生物可降解性比较低。多数染料(三苯甲烷类、靛蓝类、偶氮类、蒽醌类等)及其中间代谢产物具有毒性和致癌性, 对水体和周边生态环境影响巨大, 对人类的生命健康产生威胁和隐患^[2-3]。传统的物化方法降解效率较低且成本高, 易造成二次污染^[4-5]。而利用微生物和酶对染料废水进行处理则具有较高的安全性, 因此成为染料废水处理技术的研究热点^[6]。

漆酶(Laccase, EC 1.10.3.2)是一种多酚氧化酶。漆酶广泛存在于真菌和植物中^[7], 一般含 4 个铜离子, 负责传递电子行使催化功能。漆酶一般具有较高的氧化还原能力, 能氧化多种底物, 如: 木质素、胺类化合物、芳香化合物等^[8]。漆酶的氧化反应的唯一副产物是水, 因此被称为绿色催化剂^[9-12]。漆酶有比较宽泛的底物谱、无有毒副产物, 这些特点使其在食品、造纸、纺织、合成化学环境修复及纳米生物技术等领域均具有较好的应用前景^[13-16]。研究者对多种不同来源的漆酶及其酶学特性进行了比较, 并利用漆酶对不同结构的染料进行脱色实验, 取得了比较好的脱色效果。COUTO 等^[17]用 *Trametes hirsuta* 漆酶对 6 种偶氮染料进行脱色实验, 其中 4 种染料在反应 4 h

收稿日期: 2019-12-30; 录用日期: 2020-03-17

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2018YFA0901200); 国家自然科学基金资助项目(21708046); 天津市海外留学择优资助项目(JH-20180070802)

后的脱色率达到 50%。ZHANG 等^[18]将 *Trametes versicolor* 来源的漆酶 Lac 进行聚乙烯亚胺修饰获得 LacPG 酶, 具有高稳定性和催化性能。该酶在介体 HOBT 的协同作用下, 对偶氮染料酸性橙 7 的脱色率比未经修饰的 Lac 高 3 倍。CAMARERO 等^[19]评估了 *Pycnoporus cinnabarinus* 来源的漆酶协同 44 种小分子介体对 5 类不同分子结构的染料的脱色能力, 发现木质素降解衍生物丁香醛和乙酰丁香酮具有与合成介体相当的辅助漆酶染料脱色的能力。余昭琴等^[20]采用杂色云芝菌发酵产生漆酶, 并试用该漆酶对溴酚蓝染料进行脱色实验, 其脱色率在反应 4 h 可达 94.5%。谭小珊等^[21]将含有漆酶的刺芹侧耳粗酶液对典型偶氮染料甲基橙进行脱色实验, 28 h 后的脱色率达到 90%。马倩倩等^[22]研究了漆酶对中性红、刚果红、碱性品红、甲基橙、孔雀石绿、次甲基蓝、茜素红 7 种染料进行脱色, 该漆酶对其中 5 种染料脱色率均达到 80% 以上。

本研究将 *Moniliophthora roreri* 来源的漆酶 Mrl2 用毕赤酵母进行异源表达, 检测其活性并对 Mrl2 的酶学性质进行了研究, 考察了该漆酶-介体体系对 5 类 11 种广泛应用染料的脱色作用^[23-25], 以期漆酶在染料污水处理方面的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

重组毕赤酵母菌株 X-33/pPICZ α -A-mrl2 为本实验室构建并保藏。

BCA 法微量蛋白质浓度测定试剂盒购自 Sangon Biotech; 2,2'-联氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)购自 Coolaber 公司; 博来霉素购自广州晶欣生物科技有限公司; 亮蓝 R、活性黑 5 购自 Sigma Aldrich; 活性艳蓝 KN-R 购自天津希恩思生化科技有限公司; 考马斯亮蓝 R250 购自 Aladdin 公司; 结晶紫、靛蓝购自 Macklin 公司; 溴酚蓝、刚果红、藜芦醇购自 Solarbio 公司; 靛蓝胭脂红、对香豆酸购自上海源叶生物公司; 天青 I 购自美仑生物公司; 苯酚红购自西陇科学有限公司; N-羟基邻苯二甲酰亚胺 (NOP) 购自艾览化工科技有限公司; 1-羟基苯并三唑 (HOBT) 购自 Damas-beta 公司。其他常规试剂均为国产分析纯。

PCR 仪购自 Bio-Rad 公司; VersaMax 酶标仪购自美国 MD 公司; 蛋白质层析仪 AKTA Purifier 10 购自 Takasage 公司; QuixStand™ benchtop system 购自 Watson Marlow; 摇床购自上海知楚仪器有限公司。

1.2 实验方法

毕赤酵母表达漆酶 Mrl2, 将重组毕赤酵母菌株 X-33/pPICZ α -A-mrl2 划线于 YPD 固体平板 (含 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博来霉素), 挑取单克隆接种于 3 mL (含 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博来霉素) YPD 培养基中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$, 220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下过夜培养 16~20 h。转接 YPD 培养液至 25 mL BMG 培养基 (250 mL 三角瓶) 中, 调节初始 OD₆₀₀ 为 0.2, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下过夜培养 16~20 h。转接 BMG 培养液至 50 mL BMM 培养基中 (500 mL 三角瓶), 调节初始 OD₆₀₀ 为 1.0, 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 220 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养, 每天添加 1% 的无水甲醇诱导漆酶表达。培养 5 d 后, 4 $^{\circ}\text{C}$, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 收集上清液。接下来对漆酶 Mrl2 进行纯化, 利用 0.22 μm 孔径过滤器对 200 mL 上清液进行过滤, 并用 QuixStand benchtop system 将过滤后溶液浓缩为 50 mL, 浓缩的上清液再用 0.22 μm 孔径过滤器过滤后, 最后利用 DEAE FF 阴离子交换层析柱在 AKTA Purifier10 仪器下对漆酶进行纯化。蛋白质处理后, 用 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液 pH 6.0 和 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 对柱进行洗涤, 用 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液 pH 6.0 和 250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱 Mrl2, 洗脱出的 Mrl2 蛋白利用浓缩管浓缩后进行脱盐, 将 Mrl2 保存在 pH 6.0 的 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液中。以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定纯化后 Mrl2 的蛋白浓度。并将纯化后的酶进行冷冻干燥, 冻干粉保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$, 待进一步使用。

实验还进行了漆酶 Mrl2 酶学性质研究。在检测最适 pH 时, 取 0.08 mU 纯酶, 在 120 μL pH

2.0 的 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Britton-Robinson 和 pH 3.0~8.0 的 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸-磷酸盐缓冲液中, 以 $40 \mu\text{L}$ $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABTS 为底物, 于波长 420 nm 处室温下测定吸光光度, 以最高酶活为 100%, 计算其相对酶活力。在检测最适温度时, 取 0.08 mU 纯酶, 加入 $120 \mu\text{L}$ 最适 pH 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液, 以 $40 \mu\text{L}$ $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABTS 为底物, 在 20、30、40、50、60 °C 反应条件下, 于 420 nm 波长下测定吸光度, 计算其相对酶活力。在进行米氏常数 K_m 和最大速度 V_{\max} 的测定实验时, 以 ABTS 为底物, 在 pH 3.0 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液中, 室温下, 测定出不同底物 ABTS 浓度 (0、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 时的酶活, 计算酶反应的初始反应速率, 作 Lineweaver-Burk 双倒数图, 得出 K_m 和 V_{\max} 值, 并计算出 K_{cat} 和 K_{cat}/K_m 值。

在进行漆酶介体系统对 11 种染料的脱色效果比较时, 由于 Mr12 属于中等氧化还原电势漆酶^[1], 添加氧化还原电势相对较高的小分子介体能辅助其实现对顽固性染料的脱色。本研究考察了 Mr12 在 4 个氧化还原电势均高于 0.7 V 的小分子介体 (NOP、HOBT、对香豆酸、藜芦醇) 辅助下对 11 种染料 (刚果红、天青 I、考马斯亮蓝 R250、苯酚红、结晶紫、靛蓝、亮蓝 R、活性艳蓝 KN-R、活性黑、溴酚蓝、靛蓝胭脂红) 的脱色作用。脱色反应在 96 孔板中进行, 反应体系为 200 μL 。

1.3 酶活的测定与脱色率的计算

称取 0.01 g Mr12 漆酶冻干粉, 溶于 ddH₂O 中, 以 ABTS 为底物, 在 200 μL 反应体系中, 含有 $40 \mu\text{L}$ $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABTS、 $40 \mu\text{L}$ 稀释 1 000 倍的漆酶酶液、 $120 \mu\text{L}$ pH 3.0 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液, 在 420 nm 处测定吸光度。酶活力单位定义为: 1 min 催化氧化 1 μmol 底物的酶量为 1 个酶活力单位。

设定波长为 300~700 nm, 利用酶标仪分别对上述 11 种染料进行全波长扫描, 确定每种染料的最大吸收峰。配置 20 000 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 的漆酶母液和 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的染料母液, 同时精确配置 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的介体母液。使用酶标仪测定每种染料最大吸收峰处的吸光光度变化。不加介体的体系为对照, 观察染料脱色情况, 计算脱色率, 计算方法见式 (1)。

$$R = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: R 为染料脱色率; A_0 、 A_1 分别为脱色反应前后溶液的吸光度值。

2 结果与讨论

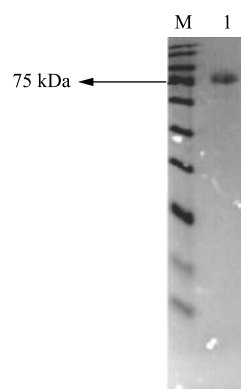
2.1 漆酶 Mr12 的表达纯化

对毕赤酵母菌株 X-33/pPICZ α -A-mr12 进行表达培养 5 d 后, 收集菌液, 检测菌体浓度和上清液的酶活力。通过阴离子交换层析对上清液进行了纯化, 经 SDS-PAGE 检测, 纯化产物分子质量为 80 kDa 左右 (图 1), 而理论分子质量应为 54 kDa, 可能是因为毕赤酵母中表达过程中蛋白糖基化所致。

2.2 纯化后漆酶 Mr12 蛋白浓度和酶学性质检测

利用 BCA 蛋白检测试剂盒, 对纯化后的漆酶进行检测, 确定漆酶 Mr12 的蛋白浓度为 $0.71 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。检测漆酶 Mr12 在 pH 2.0~8.0 时的酶活力, 发现 Mr12 在 pH 为 3.0 时活力最高 (图 2)。

如图 3 所示, 漆酶 Mr12 最适反应温度为 30 °C, 在 30 °C 以下具有较好的稳定性, 在 40 °C 时半衰期较短, 仅为 1 h。根据 Michaels-Menten 方程式 (2) 的变形方程式 (3), 通过双倒数作图法, 测得反应



注: M 为 DNA 分子质量标准; 1 为漆酶 Mr12 纯酶。

图 1 纯化后漆酶 Mr12 SDS-PAGE 检测结果

Fig. 1 Purified laccase Mr12 verified by SDS-PAGE

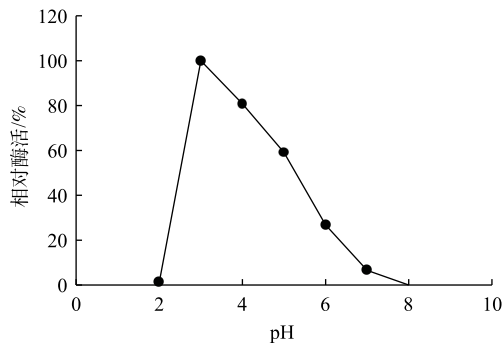


图 2 最适反应 pH 检测 (以 ABTS 为底物)

Fig. 2 Measurement of optimum pH for laccase Mrl2 (using ABTS as substrate)

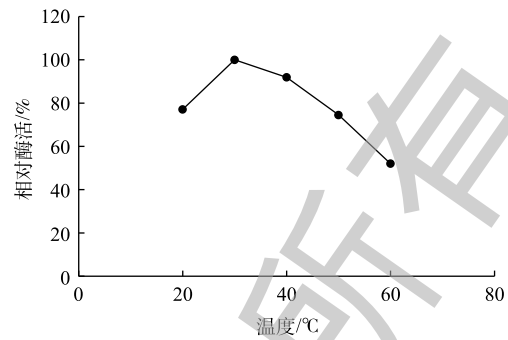


图 3 最适反应温度检测 (以 ABTS 为底物)

Fig. 3 Measurement of optimum temperature for laccase Mrl2 (using ABTS as substrate)

的 V_{\max} 值为 $172.8 \mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$, K_m 为 $37.61 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, K_{cat} 为 138.12 s^{-1} , K_{cat}/K_m 为 $3.67 \text{ L} \cdot (\mu\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$ 。

$$V = \frac{V_{\max} \cdot C_s}{K_m + C_s} \quad (2)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot C_s} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (3)$$

式中: C_s 为底物浓度; K_m 为米氏常数; V 为反应速率; V_{\max} 为酶被底物饱和时的反应速率。

2.3 漆酶 Mrl2 对 4 类染料脱色研究

根据发色基团的分子结构,染料可被分为蒽醌类、偶氮类、靛蓝类、三苯甲烷类、二苯甲烷类、吩噻嗪类、硝基亚硝基类、硫化类染料等。目前使用比较广泛的 4 类染料为偶氮类、三苯甲烷类、蒽醌类、靛蓝类。偶氮类和蒽醌类染料为使用最广的 2 类染料,每年生产的染料中,70% 为偶氮类染料。20% 为蒽醌类染料。三苯甲烷类染料在印染行业中应用较广泛,也是一种重要的用于痕量分析的光度显色剂,用量目前排名第 3 位。靛蓝类染料可用在生化药剂、着色剂、印染工业中。与上述 4 大类染料相比,吩噻嗪类染料具有特殊的杂环结构,因此很难脱色。为验证本研究中选择的漆酶 Mrl2 的广谱适用性,本研究选择了用量较多的 5 类染料为漆酶作用对象(表 1)。

在以上 5 类染料中,除蒽醌类染料为漆酶底物类似物,其他几类染料均为非酶底物类染料,漆酶对其脱色率较低^[1]。但是,漆酶-介体系统可明显提高其对非酶底物类染料的脱色效率,极大的扩展了漆酶的染料底物谱。由于 Mrl2 是中等氧化还原电势漆酶,因此选择了 4 个氧化还原电势^[26]高于 0.7 V 的小分子介体(表 2)来加强漆酶 Mrl2 的氧化作用,从而提高对各类染料的脱色效果。

在研究漆酶-介体系统对各类染料的脱色效果时,首先利用 Mrl2 对第一大类染料偶氮类染料进行脱色,结果如图 4 所示, NOP、藜芦醇、HOBT、对香豆酸分别代表 NOP、藜芦醇、HOBT、对香豆酸介体辅助下漆酶 Mrl2 对染料的脱色;对照为无介体参与下漆酶 Mrl2

表 1 染料名称及其最大吸收波长

Table 1 Dye name and its maximum absorption wavelength

名称	相对分子质量	波长/nm	染料类型
刚果红	696.7	434	偶氮类
活性黑5	991.82	596	偶氮类
活性艳蓝KN-R	626.54	608	蒽醌类
苯酚红	354.38	434	三苯甲烷类
考马斯亮蓝(R250)	825.97	562	三苯甲烷类
结晶紫	407.98	584	三苯甲烷类
溴酚蓝	670.0	590	三苯甲烷类
亮蓝R	825.97	556	三苯甲烷类
靛蓝	262.26	676	靛蓝类
靛蓝胭脂红	466.35	610	靛蓝类
天青I	305.83	598	吩噻嗪类

对染料的脱色。结果表明：在无介体参与下，漆酶 Mrl2 对于偶氮类染料脱色率较低，而介体的加入强化了漆酶 Mrl2 对偶氮类染料的脱色能力。在 HOBT 辅助下，漆酶对刚果红和活性黑 5 染料的脱色率明显提高，对活性黑 5 的脱色能力高于刚果红 (脱色率分别为 96% 和 83%)，可能跟染料的分子质量、水溶性、分子结构及所带基团不同有关^[27]。

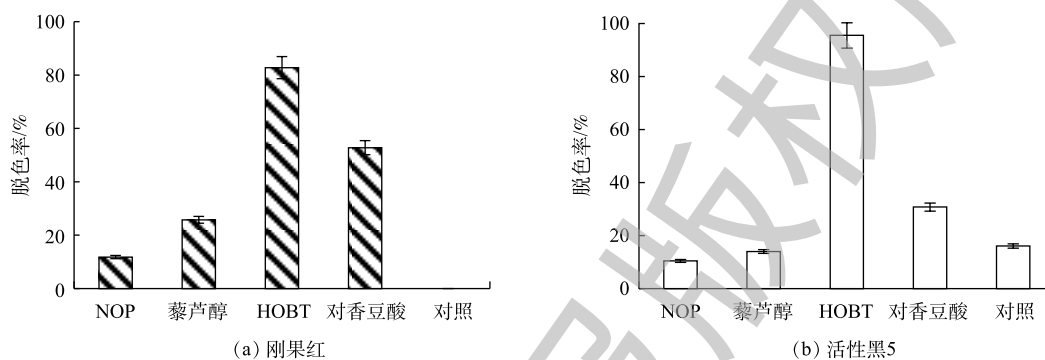


图4 漆酶-介体系统对偶氮类染料反应 50 h 的脱色影响

Fig. 4 Effect of laccase-mediator systems on the decolorization of azo dyes after 50 h reaction

如图 5 所示，漆酶可直接对蒽醌类染料脱色，反应 50 h 后脱色率可达 68.75%。这可能是因为蒽醌类染料具有蒽醌官能团，是漆酶的底物类似物，能够被漆酶直接氧化脱色，脱色程度均同漆酶的酶活力成正相关^[28]。在 HOBT 辅助下，漆酶 Mrl2 对此类染料的脱色有较大促进作用，脱色率为 95% 以上。对香豆酸仅有较小的促进作用，而 NOP、藜芦醇则显示抑制作用，这可能与染料、介体的结构有关。

虽然漆酶 Mrl2 可直接对三苯甲烷类染料 (图 6) 进行脱色，但效果不显著。相比于其他 4 种三苯甲烷类染料，漆酶 Mrl2 对结晶紫的脱色效果较明显，可能是因为其分子结构较小所致。有研究者认为，三苯甲烷类染料的脱色与其分子结构有一定关系，二甲胺基的存在有助于染料分子的脱色，而磺酸基、卤素原子、酮基等的存在会使染料分子更难脱色，这与本实验的结果一致^[29-31]。在 HOBT 辅助下，漆酶 Mrl2 对三苯甲烷脱色率均能达到 95% 以上。而 Mrl2 与 NOP、藜芦醇或对香豆酸组成的漆酶-介体系统对三苯甲烷类染料脱色效果没有明显提高。

如图 7 所示，在无介体辅助情况下，50 h 内，漆酶对靛蓝胭脂红染料脱色 72.7%，但不能直接对靛蓝进行脱色。在 HOBT 辅助下，漆酶 Mrl2 对这 2 种染料脱色均有较大促进作用，脱色率均在 95% 以上。已有研究^[32]发现，云芝 1126 漆酶不能对靛蓝“溶液”进行脱色，但漆酶-HOBT 介体系统对其脱色效果显著，在最优条件下，脱色率可达 90.1%。在染料降解中，像 HOBT 这样含有 N—OH 基团的 N-杂环化合物是行之有效的介体^[1]。藜芦醇、NOP 和对香豆酸对靛蓝脱色都有促进

表 2 4 种小分子介体的名称及结构

Table 2 Names and structures of four small molecular mediators

品名	简称	相对分子质量
N-羟基邻苯二甲酰亚胺	NOP	163.13
1-羟基苯并三唑	HOBT	135.12
藜芦醇	VA	168.19
对香豆酸	p-CA	164.16

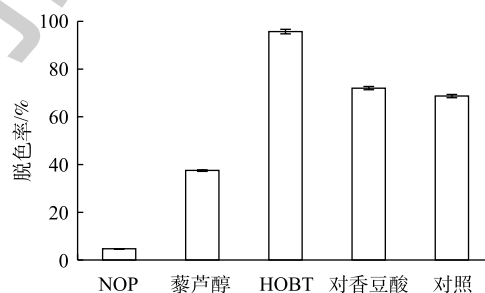


图5 漆酶-介体系统对蒽醌类染料活性艳蓝 KN-R 在反应 50 h 后的脱色影响

Fig. 5 Effect of the laccase-mediator systems on the decolorization of the anthraquinone dye after 50 h reaction

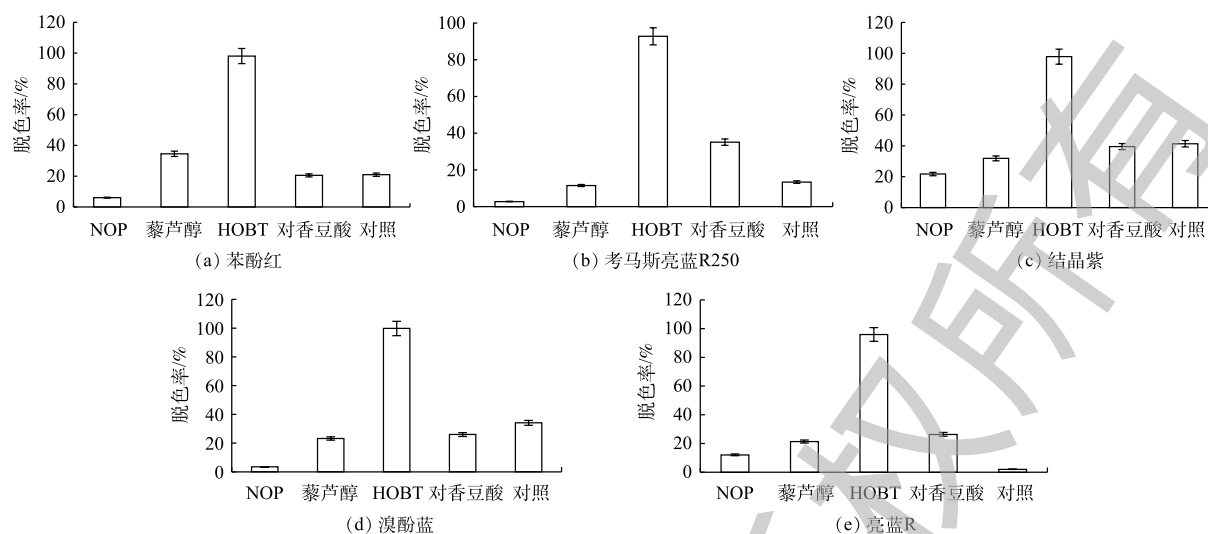


图 6 漆酶-介体系统对三苯甲烷类染料反应 50 h 后的脱色影响

Fig. 6 Effect of the laccase-mediator systems on the decolorization of triphenylmethane dyes after 50 h reaction

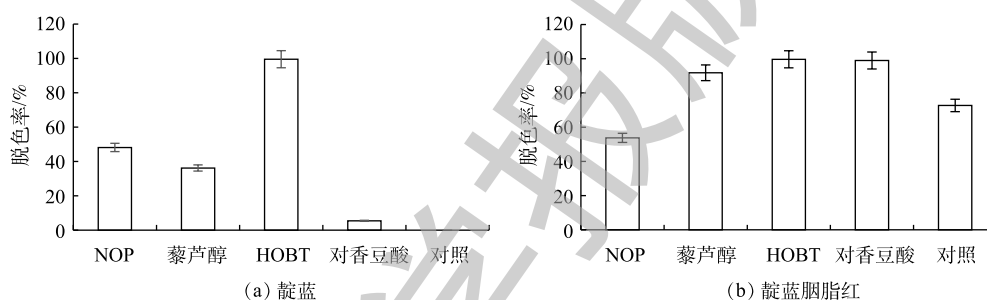


图 7 漆酶-介体系统对靛蓝类染料反应 50 h 的脱色影响

Fig. 7 Effect of laccase-mediator systems on the decolorization of indigo dyes after 50 h reaction

作用。对于靛蓝胭脂红，藜芦醇和对香豆酸的参与对染料脱色有促进作用，但 NOP 有抑制作用。这可能与介体本身结构有关，NOP 可能与真实靛蓝类染料底物存在竞争作用，从而降低了漆酶对染料的脱色效率。

吩噻嗪类染料天青 I，为难脱色染料，在未优化体系中，即使在小分子介体的辅助下漆酶 Mr12 也不易对其脱色 (图 8)。在 4 个介体中，对香豆酸对天青 I 脱色最明显，脱色率可达 40.2%。与其他几类染料相比，漆酶-介体系统对天青 I 染料脱色率较低，需要对脱色条件进行优化，进一步探索漆酶 Mr12 对复杂杂环吩噻嗪类染料的脱色性能。

与此同时，还考察了不同因素对漆酶 Mr12 氧化脱色天青 I 的影响。在常温下、反应 1 h、天青 I 浓度为 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酶浓度为 $4000 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 、对香豆酸浓度为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下，考察了不同 pH 对天青 I 脱色的影响 (图 9)。漆酶在 pH 6.0 条件下对天青 I 的脱色率最高，达到 55%。因此，确定 pH 6.0 为漆酶对天青 I 脱色的最适反应 pH。运用 SPSS 软件对该组数据进行单因素方差分析，结果显示 $P < 0.001$ ，说明差异显著。

在常温、pH 6.0、对香豆酸浓度为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、天青 I 浓度为 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下，考察了不同酶浓度对天青 I 脱色的影响 (图 10)。在漆酶酶浓度为 $125 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下，对天青 I 染料的脱色率最高，13 h 后，脱色率达到 75%，因此，漆酶 Mr12 对天青 I 脱色的反应体系中最适酶浓度为 $125 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 。运用 SPSS 软件对该组数据进行单因素方差分析，结果显示 $P < 0.001$ ，说明差异显著。

在常温、pH 为 6.0、天青 I 浓度为 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酶浓度为 $125 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下，考察了不同香

豆酸浓度对天青 I 脱色的影响 (图 11)。在香豆酸浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下, 20 h 后, 漆酶 Mr12 对天青 I 染料的脱色率最高, 达到 81%。运用 SPSS 软件对该组数据进行单因素方差分析, 结果显示 $P < 0.01$, 说明差异显著。

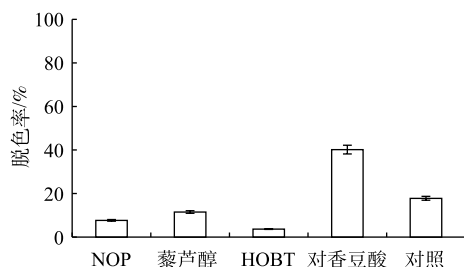


图 8 漆酶-介体系统对吩噻嗪类染料天青 I 反应 50 h 的脱色影响

Fig. 8 Effect of the laccase-mediator systems on the decolorization of phenothiazines dye azure I after 50 h reaction

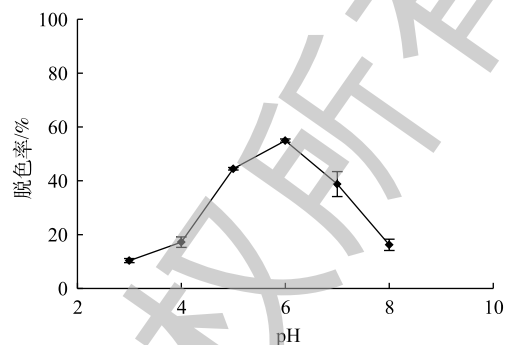


图 9 pH 对天青 I 染料脱色的影响

Fig. 9 Effect of pH on the decolorization of dye azure I

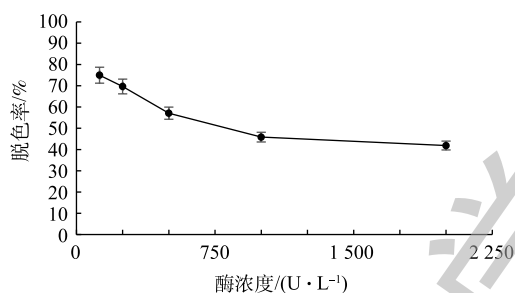


图 10 酶浓度对天青 I 染料脱色的影响

Fig. 10 Effect of enzyme concentration on the decolorization of dye azure I

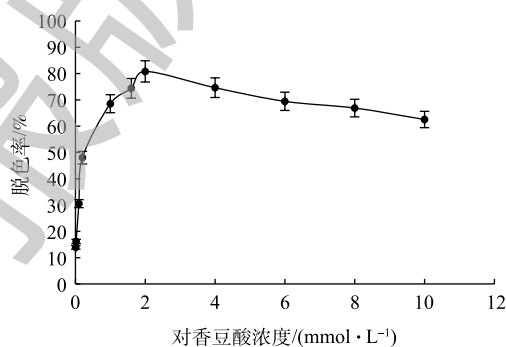


图 11 对香豆酸浓度对天青 I 染料脱色的影响

Fig. 11 Effect of the concentration of p-coumaric acid on the decolorization of dye azure I

3 结论

1) 担子菌漆酶 Mr12 与小分子组成的漆酶-介体系统对偶氮类、蒽醌类、三苯甲烷类、靛蓝类染料均具有较强的脱色能力, 而文中选择的 4 类染料为工业染料废水的主要成分, 因此, 本研究选用的漆酶介体系统可处理大部分的染料废水, 具有一定的广谱适用性。

2) 由于蒽醌类染料具有蒽醌官能团, 为漆酶底物类似物, 能够被漆酶直接催化氧化; 非酶底物类染料则往往难以被漆酶直接氧化脱色, 需要介体辅助来提高其脱色率。

3) 本研究所选用的漆酶 Mr12 具有广谱高效染料废水脱色能力, 能够应用于工业染料废水处理, 提高脱色效率, 降低处理成本, 可为社会带来一定经济效益。

参考文献

- [1] 郭玉敏, 代广辉. 木质素降解酶系染料降解原理概述[J]. 河北建筑工程学院学报, 2019, 37(2): 116-120.
- [2] 许玫英, 郭俊, 岑英华, 等. 染料的生物降解研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 138-143.
- [3] 赵世光, 刘强, 张庆庆, 等. 灵芝漆酶对直接蓝 86 的催化脱色性能[J]. 环境工程学报, 2013, 7(2): 765-770.
- [4] 王天女, 李国富, 赵敏, 等. 重组血红密孔菌漆酶在染料脱色中的应用[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2016, 40(1):

92-96.

- [5] GARG S K, TRIPATHI M. Process parameters for decolorization and biodegradation of orange II (acid orange 7) in dye-simulated minimal salt medium and subsequent textile effluent treatment by *Bacillus cereus* (MTCC 9777) RMLAU1[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2013, 185(11): 8909-8923.
- [6] 张永, 田乔鹏, 任海燕, 等. 杏鲍菇菌渣产漆酶及其在染料脱色中的应用[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(7): 116-121.
- [7] 邓寒梅, 邵可, 梁家豪, 等. 漆酶的来源及固定化漆酶载体研究进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(6): 10-15.
- [8] 张泽雄, 刘红艳, 邢贺, 等. 漆酶可降解底物种类的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(10): 97-102.
- [9] 刘恋, 杨清. 漆酶的研究进展及其应用[J]. *山东化工*, 2019, 48(3): 60-61.
- [10] POLAK J, WILKOLAZKA A J. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(9): 1295-1307.
- [11] RODGERS C J, BLANFORD C F, GIDDENS S R, et al. Designer laccases: A vogue for high-potential fungal enzymes?[J]. *Trends Biotechnology*, 2010, 28(2): 63-72.
- [12] GASSER C A, HOMMES G, SCHAFFER A, et al. Multi-catalysis reactions: New prospects and challenges of biotechnology to valorize lignin[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2012, 95(5): 1115-1134.
- [13] BAJPAJ P, ANAND A, BAJPAJ P K. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes[J]. *Biotechnology Annual Review*, 2006, 12: 349-378.
- [14] MOGHARABI M, FARAMARZI M A. Laccase and laccase-mediated systems in the synthesis of organic compounds[J]. *Advance Synthesis Catalysis*, 2014, 356(5): 897-927.
- [15] BRONIKOWSKI A, HAGEDOOM P, KOSCHORRECK K, et al. Expression of a new laccase from *Moniliophthora roreri* at high levels in *Pichia pastoris* and its potential application in micropollutant degradation[J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 1-13.
- [16] 曹文娟, 袁海生. 桦褶孔菌漆酶固定化及其对染料的降解[J]. *菌物学报*, 2016, 35(3): 343-354.
- [17] COUTO S R. Decolouration of industrial azo dyes by crude laccase from *Trametes hirsuta*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 148(3): 768-770.
- [18] ZHANG X L, HUA M, LV L, et al. Ionic polymer-coated laccase with high activity and enhanced stability: Application in the decolourisation of water containing AO7[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(5): 8253.
- [19] CAMARERO S, IBARRA D, MARTINEZ M J, et al. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 1775-1784.
- [20] 余昭琴, 贾红华, 王婷婷, 等. 杂色云芝漆酶对溴酚蓝的高效降解[J]. *化工环保*, 2015, 35(2): 137-141.
- [21] 谭小珊, 王帅杰, 吴科元, 等. 刺芹侧耳产漆酶条件优化及对偶氮染料甲基橙的脱色[J]. *菌物学报*, 2019, 38(10): 1702-1709.
- [22] 马倩倩, 赵丽红, 聂飞. 糙皮侧耳C1诱变菌株F-13漆酶催化染料脱色[J]. *科学技术与工程*, 2019, 19(6): 304-307.
- [23] 罗爽, 谢天, 刘忠川, 等. 漆酶/介体系统研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(6): 987-995.
- [24] 马利. 白腐真菌及其漆酶对不同结构染料的降解研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [25] 张雪玲, 陈小利, 李荷. 漆酶Lac1338的酶学特性测定及定向突变对其酶解染料影响[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(7): 170-177.

- [26] DU Y W, MA H, HUANG L P, et al. Electrochemical characteristics of the decolorization of three dyes by laccase mediator system (LMS) with synthetic and natural mediators[J]. *Chemosphere*, 2019, 239: 124779.
- [27] 章淑艳, 赵丛波, 郭林, 等. 血红孔菌mk528漆酶对刚果红的脱色研究[J]. *生物学杂志*, 2015, 32(3): 30-36.
- [28] 杨波, 冯利东, 张丽媛. 漆酶对活性艳蓝染料废水脱色[J]. *环境工程学报*, 2012, 6(10): 3514-3518.
- [29] 唐菊. 木质素降解酶对三苯甲烷类染料及竹碱木素降解的初步研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2011.
- [30] 朱建军, 曾抗美. 白腐真菌处理染料废水研究进展[J]. *四川环境*, 2006, 25(6): 86-90.
- [31] 戴坤, 林书欣, 刘洪涛, 等. 白腐真菌裂褐菌F7对甲基橙和结晶紫的脱色研究[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2009, 40(3): 341-344.
- [32] 刘晓波, 闫世梁, 李宗伟, 等. 漆酶/HBT介质系统对靛蓝染料及废水脱色的初步研究[J]. *环境污染与防治*, 2008, 30(6): 27-30.

(本文编辑: 曲娜, 郑晓梅, 张利田)

Decolorization of dyes with different structures by laccase-mediator system

LI Yan^{1,2}, YANG Jianhua², LI Baoku¹, ZHU Leilei^{2,*}

1. School of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002, China

2. National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

*Corresponding author, E-mail: zhu_ll@tib.cas.cn

Abstract For studying the potential of laccase in dye wastewater treatment, laccase Mrl2 from *Moniliophthora roreri* expressed by *Pichia pastoris* cooperating with different small molecule mediators (HOBT, resveratrol, p-coumaric acid, NOP) was employed to decolorize five different types of dyes (azo, triphenylmethane, anthraquinone, indigo, phenothiazine) in this study. The results showed that with the help of small molecule mediator HOBT, Mrl2 could achieve more than 95% decolorization rate for nine dyes respectively belonging to azo, triphenylmethane, anthraquinone and indigo. For the more complex heterocyclic phenothiazine dye azure I, the decolorization efficiency was low, the highest decolorization rate was only up to 40% with the aid of the best mediator of p-coumaric acid. Through further optimization of the reaction system for the azure I decolorization, it was found that at pH 6.0, 2 mmol·L⁻¹ p-coumaric acid and 125 U·L⁻¹ laccase, the decolorization rate of the azure I catalyzed by Mrl2 reached 81%. The above results indicated that the recombinant laccase Mrl2 has a good application potential and prospect in dye wastewater treatment and the environmental protection.

Keywords laccase; dye decolorization; mediator; *Pichia pastoris*