

灵芝漆酶催化直接耐晒翠蓝 GL 脱色条件的优化

陈琼华¹ 周玉萍² 杨桃芳¹ 程惠贞² 田长恩^{1,2*}

(1. 广州大学生命科学学院 广东 广州 510006)

(2. 广州大学植物抗逆基因功能研究广州市重点实验室 广东 广州 510006)

摘要: 采用灵芝菌株发酵所得的漆酶, 对酞菁类染料直接耐晒翠蓝 GL 进行了催化脱色实验, 确定了脱色反应的最适条件。结果表明: 单独使用灵芝漆酶粗酶液对直接耐晒翠蓝 GL 具有很好的脱色效果。其最适脱色 pH 为 3.0, 最适脱色温度为 40°C, 最适漆酶用量是 40 U/mL, 最适染料浓度为 60 mg/L。以上述最适脱色条件对直接耐晒翠蓝 GL 进行脱色实验, 反应 70 min, 脱色率可达 94.3%。研究结果显示, 所试灵芝漆酶在印染废水治理方面具有良好的应用前景。

关键词: 漆酶, 直接耐晒翠蓝 GL, 脱色, 灵芝

Optimization of Conditions in Decolorization of Direct Fast Turquoise Blue GL Catalyzed by Laccase from *Ganoderma lucidum*

CHEN Qiong-Hua¹ ZHOU Yu-Ping² YANG Tao-Fang¹
CHENG Hui-Zhen² TIAN Chang-En^{1,2*}

(1. School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

(2. Guangzhou Key Laboratory for Functional Studies on Plant Stress-Resistant Genes, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: The decolorization experiments of direct fast turquoise blue GL were conducted with the crude laccase from *Ganoderma lucidum* in submerged fermentation. The optimum decolorization conditions were determined. The results showed that the crude laccase from *Ganoderma lucidum* had distinct decolorization efficiency on direct fast turquoise blue GL. The optimum pH was 3.0, The optimum temperature was 40°C, The optimum enzyme dosage was 40 U/mL, the optimum dye concentrations was 60 mg/L. Under the best conditions optimized above, the decolorization rate of direct fast turquoise blue GL was 94.3% after 70 min catalyzation with the laccase from *G. lucidum*. Our results suggested that the laccase from *Ganoderma lucidum* could be very useful in the textile-dye decolorization and waste-water purification.

Keywords: Laccase, Direct fast turquoise blue GL, Decolorization, *Ganoderma lucidum*

基金项目: 广东省自然科学基金项目(No. 8151009101000013); 广东省科技计划项目(No. 2007B080701008); 广州市高校科学技术研究项目(No. 62031); 广州大学植物抗逆基因功能研究广州市重点实验室开放基金项目(No. 200801)

* 通讯作者: Tel: 86-20-39366911; ✉: changentian@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-04-28; 接受日期: 2009-07-09

漆酶是一类含铜的多酚氧化酶, 能催化多种芳香族化合物的降解, 在染料脱色、印染废水处理、环境污染物脱毒与降解等方面具有巨大的应用潜力^[1-5]。近年来, 越来越多的学者开始把研究的焦点集中在采用漆酶催化染料脱色^[6-11]和处理印染废水^[12]等领域。本研究组前期筛选获得一个高产漆酶的灵芝菌株, 并利用所优化的培养基发酵, 得到活性高达 10^7 U/L (ABTS 法) 的漆酶。同时, 酶学性质研究表明, 该漆酶能在较广的温度和 pH 值范围内保持较高的活性。由于不同来源的漆酶具有不同的性质和不同的底物专一性^[13], 所以探究该漆酶在染料脱色及废水处理等方面的应用潜力十分必要。直接耐晒翠蓝 GL 属于酞菁类染料, 由于具有稳定的分子结构, 降解比较困难。目前仅见王成国等^[14]采用悬浮态纳米级 TiO_2 通过光催化氧化法对该染料进行过脱色处理, 未见采用漆酶催化直接耐晒翠蓝 GL 脱色的研究报道。因此, 本研究通过单因子实验方法, 探讨上述灵芝漆酶对直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响因素及效果, 确定包括 pH、温度、漆酶用量和染料浓度在内的主要脱色条件, 为该漆酶在印染废水脱色净化方面的大规模应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种

灵芝(*Ganoderma lucidum*)菌株 QMC-01, 由本实验室采自广东花都芙蓉影后经分离纯化所得。依据《中国真菌志·第十八卷·灵芝科》(2000)、《中国药用真菌图鉴》(1987)和《中国灵芝图鉴》(2005)对该菌株进行形态学检验, 其宏观和显微特征符合灵芝种(*Ganoderma lucidum*)的特征范围。

1.2 染料

直接耐晒翠蓝 GL (Direct fast turquoise blue GL), 是一种酞菁类染料, 由广州市华年染料化工有限公司提供。

1.3 化学试剂

ABTS[2,2'-连氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)]为 Sigma 公司分析纯产品; 其它试剂均为国产分析纯产品。

1.4 实验仪器

低温高速离心机, Beckam coulter allegraTM X-22R; 常温高速离心机, Beckam coulter microfuge[®]

18; 核酸蛋白分析仪, Beckam coulter DU[®] 800; 电子天平, Precisa XS 365M 和 XT 120A; 酸度计, 上海宇隆 PHS-3C; 电热恒温水槽, 上海森信 DKB-600A。

1.5 灵芝漆酶粗酶液的制备

取产酶高峰期适量的发酵液, 在 12000 r/min、常温条件下离心 10 min, 上清液即为漆酶粗酶液。

1.6 漆酶酶活的测定

采用 ABTS 法: 反应体系总体积 3 mL, 包括 1.5 mL 0.2 mol/L pH 5.0 醋酸-醋酸钠缓冲液、0.5 mL 0.5 mmol/L ABTS 及 1 mL 适当稀释的酶液 (以缓冲液稀释), 测定反应前 3 min 内反应液在 420 nm 处吸光度(A)的增加量, 每 15 s 记录数据, 以灭活酶液为空白对照。定义每分钟转化 $1 \mu\text{mol}$ 底物所需的酶量为一个酶活力单位(U)。其计算公式:

$$\text{漆酶活力(U)} = \frac{V_1 \times \Delta A}{V_2 \times \varepsilon_{420} \times \Delta t \times 10^{-6}} \times \text{酶液稀释倍数}$$

其中, $\varepsilon_{420} = 3.6 \times 10^4$ L/mol·cm; Δt : 3 min; ΔA : 3 min 内吸光度(A)的变化值; V_1 : 酶反应中, 反应液的总体积; V_2 : 酶反应中, 酶液的体积。试验重复 3 次, 取平均值。

1.7 直接耐晒翠蓝 GL 吸收光谱的测定

用 0.2 mol/L pH 5.0 醋酸-醋酸钠缓冲液配制 100 mg/L 直接耐晒翠蓝 GL 母液。测定时, 稀释到线性范围内, 以醋酸-醋酸钠缓冲液为参比, 进行波长扫描, 如图 1 所示, 直接耐晒翠蓝 GL 的最大吸收峰在 612 nm 处。因此, 本研究中所有脱色率均以在 612 nm 处所测的吸光度(A)值来计算。

1.8 脱色处理及染料脱色率的计算

参照漆酶酶活检测体系设置 3 mL 脱色反应体

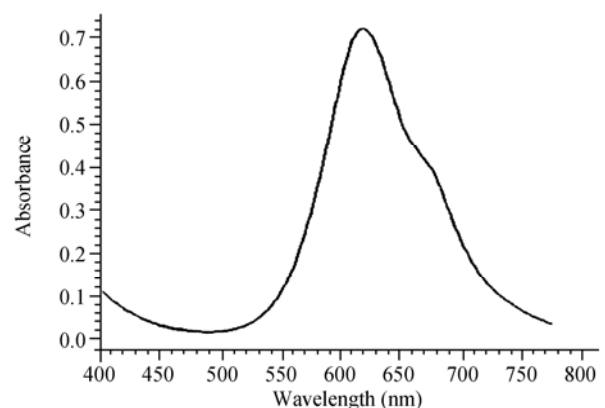


图 1 直接耐晒翠蓝 GL 的吸收光谱

Fig. 1 The absorption spectrogram of direct fast turquoise blue GL

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

系。脱色体系中以 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液配制直接耐晒翠蓝 GL 染料(0~300 mg/L), 最后加入灵芝漆酶粗酶液(0~70 U/mL)启动反应, 在所需温度(20°C~70°C)和 pH(2.5~7)条件下, 静置反应一段时间(0~96 h)后, 测定脱色反应后的溶液在 612 nm 处的吸光度(A_1), 相同实验条件下, 加入等量 100°C 灭活 10 min 的酶液作为空白对照, 测其吸光度(A_0), 按以下公式计算不同脱色条件下的脱色率:

$$\text{脱色率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

实验重复 3 次, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 ABTS 对灵芝漆酶粗酶液催化直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响

在漆酶催化染料脱色的反应中, 往往需要有毒的介体(如 ABTS)参与^[6,12]。为确定 ABTS 对灵芝漆酶粗酶液催化直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响, 比较了粗漆酶、粗漆酶/ABTS 介体系统两种反应体系对直接耐晒翠蓝 GL 的脱色效果。实验所用的脱色反应体系为: 总体积 3 mL, 包括 0.2 mol/L pH 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液, 30 U/mL 的灵芝漆酶粗酶液和 100 mg/L 的直接耐晒翠蓝 GL, 不添加或添加终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABTS, 30°C 进行脱色反应, 结果如图 2。

从图 2 可见, 两种反应体系均在反应初期脱色

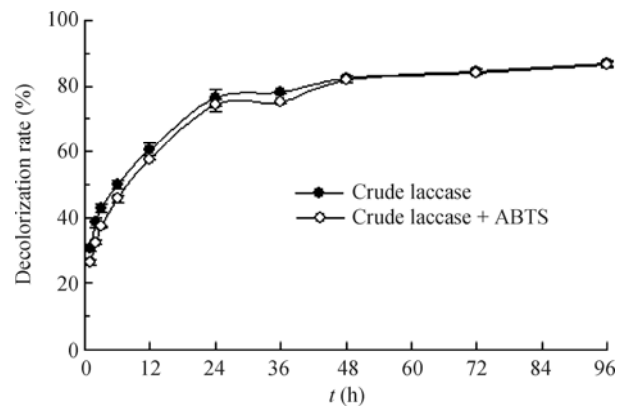


图 2 ABTS 对灵芝漆酶催化直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响

Fig. 2 Effects of ABTS on decolorization of direct fast turquoise blue GL catalyzed by laccase from *Ganoderma lucidum*

速率较快, 但脱色 24 h 后脱色速率减慢, 96 h 后粗漆酶、粗漆酶/ABTS 介体系统脱色率分别达 86.9% 和 86.6%。上述结果表明, 添加 ABTS 与不添加 ABTS 对直接耐晒翠蓝 GL 的脱色效果没有明显差异, 灵芝发酵所得的漆酶粗酶液可直接用于直接耐晒翠蓝 GL 染料的脱色。因此, 在后续优化实验中, 均不再添加 ABTS。

为进一步证明脱色处理过程中漆酶对染料分子是否真正起到了降解作用, 每隔一定时间用核酸蛋白分析仪对两种反应体系脱色前后的反应液进行波长扫描, 观察染料特征峰的变化, 结果见图 3。

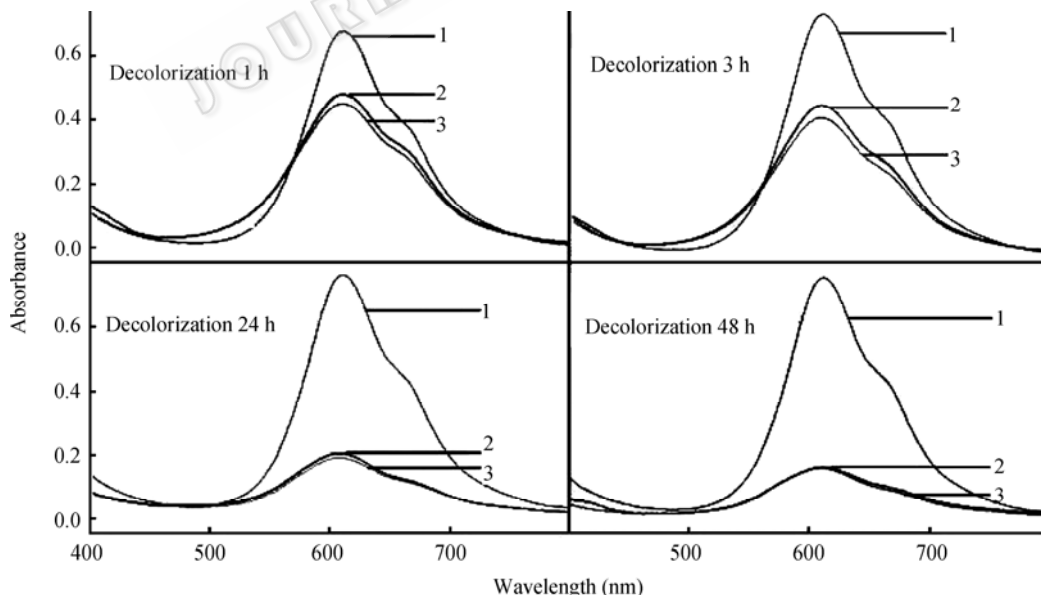


图 3 直接耐晒翠蓝 GL 脱色前后吸收光谱图

Fig. 3 The absorption spectra of direct fast turquoise blue GL before and after decolorization

注: 1: 对照; 2: ABTS+粗酶液; 3: 粗酶液。

Note: 1: CK; 2: ABTS + Crude laccase; 3: Crude laccase.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

由图 3 可见, 脱色处理前, 染料溶液在 612 nm 处有一个明显的吸收峰。而随着脱色时间的延长, 其在 612 nm 处的吸光度逐渐下降, 吸收峰越变越小。这说明漆酶对染料确实起到了降解作用。比较粗漆酶及粗漆酶/ABTS 两个反应体系不同时间的吸收峰, 发现在脱色 24 h 内粗漆酶较粗漆酶/ABTS 体系系统具有稍强的脱色能力。但 48 h 后脱色效果基本一样。

2.2 pH 值对灵芝漆酶粗酶液催化直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响

在脱色反应体系中, 分别用 pH 为 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 和 7.0 的 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠为缓冲液, 保持其它条件不变, 对直接耐晒翠蓝 GL 进行脱色降解 2 h, 结果见图 4。

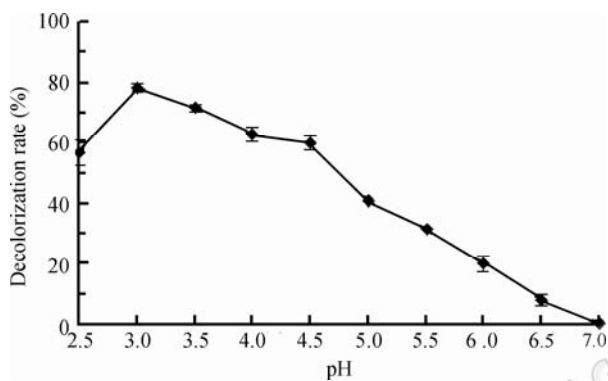


图 4 pH 值对直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响
Fig. 4 Effects of pH on decolorization of direct fast turquoise blue GL

由图 4 可见, pH 在 2.5~4.5 之间脱色效果较好, 脱色率达到 60% 以上。当 pH 值为 3.0 时, 脱色率最高可达 79.2%。因此确定其脱色最适 pH 值为 3.0。

2.3 温度对灵芝漆酶粗酶液催化直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响

采用上述最适 pH 3.0 的醋酸-醋酸钠为缓冲液, 保持其它条件不变, 分别在 20°C、25°C、30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C 不同温度条件下对直接耐晒翠蓝 GL 进行脱色降解 2 h, 结果见图 5。

由图 5 可知, 在 20°C~50°C 之间, 该漆酶对直接耐晒翠蓝 GL 有较好的催化脱色效果, 脱色率均保持在 70% 以上; 40°C 条件下脱色率最高, 达 86.6%; 即使在 60°C 脱色率也能维持在 58.4%。以后随温度的进一步升高, 脱色率迅速下降, 在 70°C 时, 粗酶液对直接耐晒翠蓝 GL 染料的脱色率仅为 6%。

2.4 灵芝漆酶用量对直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响

采用上述最适 pH 3.0 的醋酸-醋酸钠为缓冲液、温度 40°C、分别用 5 U/mL~70 U/mL 的灵芝漆酶处理 100 mg/L 的直接耐晒翠蓝 GL 2 h, 结果见图 6。

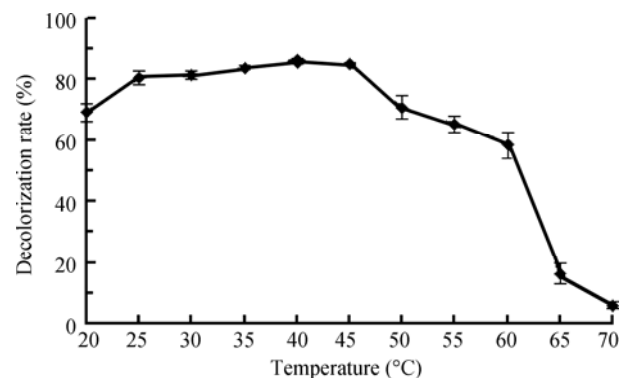


图 5 温度对直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响
Fig. 5 Effects of temperature on decolorization of direct fast turquoise blue GL

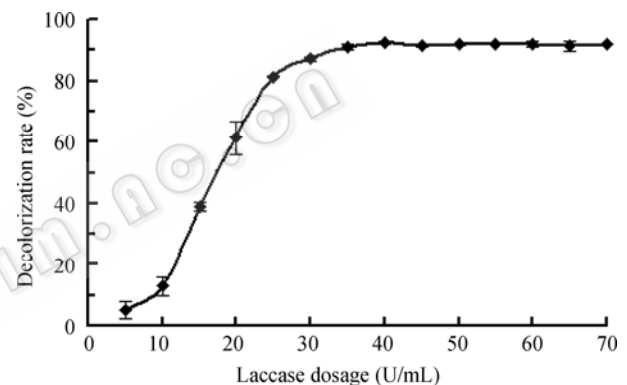


图 6 漆酶用量对直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响
Fig. 6 Effects of laccase dosage on decolorization of direct fast turquoise blue GL

由图 6 看出, 随酶用量的增加, 直接耐晒翠蓝 GL 的脱色率提高。当酶用量在 5 U/mL~25 U/mL 时, 脱色率增加显著, 随后缓慢上升并逐渐趋于平稳; 当酶用量为 40 U/mL 时, 脱色率最高达 92.6%。以后再继续增加酶用量时脱色率不再继续增加。因此, 选取 40 U/mL 作为漆酶粗酶液催化直接耐晒翠蓝 GL 降解的最适酶用量。

2.5 染料浓度对灵芝漆酶粗酶液催化直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响

采用上述最适 pH、温度和漆酶用量, 保持其他条件不变, 分别对浓度为 20 mg/L、40 mg/L、60 mg/L、80 mg/L、100 mg/L、120 mg/L、140 mg/L、160 mg/L、180 mg/L、200 mg/L、250 mg/L 和 300 mg/L 的直接耐晒翠蓝 GL 进行脱色处理 2 h, 结果见图 7。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

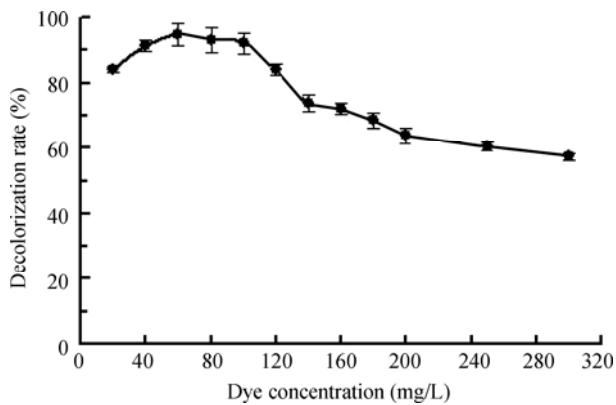


图7 染料浓度对直接耐晒翠蓝 GL 脱色的影响
Fig. 7 Effects of dye concentration on decolorization of direct fast turquoise blue GL

由图7可见,当染料浓度较低(20 mg/L~60 mg/L)时,随着染料浓度的增加,脱色率逐渐上升,其中浓度为60 mg/L时脱色率最高,达94.8%;当浓度超过100 mg/L时,随着浓度的增大,脱色率逐渐降低,浓度为300 mg/L时,脱色率仅为57.4%。说明高浓度的染料对灵芝漆酶催化脱色的能力有一定的抑制作用。图7还显示,浓度在40 mg/L以下时,降低染料的初始浓度,并不能提高染料的脱色率,只有当初始浓度超过一定值时,脱色效果才显著。因此,要达到较好的脱色效果,底物的浓度应控制在最佳的范围内。

2.6 最优反应条件下灵芝漆酶催化直接耐晒翠蓝 GL 脱色的效果

在pH 3.0、40°C、40 U/mL灵芝漆酶、60 mg/L染料浓度的条件下,即在系统优化的最适脱色条件下,对直接耐晒翠蓝 GL 进行催化脱色实验,每隔一段时间测定脱色液在612 nm处的吸光度,结果见图8。

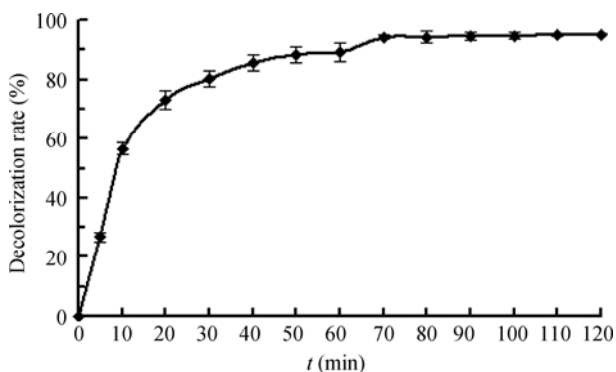


图8 最优反应条件下灵芝漆酶催化直接耐晒翠蓝 GL 的脱色效果
Fig. 8 Decolorization of direct fast turquoise blue GL catalyzed by laccase from *Ganoderma lucidum* under the best reaction condition

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

由图8可知,在优化条件下,反应前30 min,脱色率增加很快,随后缓慢增加。当脱色70 min后,脱色率高达94.3%,以后随时间延长脱色率未见明显增加。与优化前处理24 h后的76.6%的脱色率相比,优化后的脱色率得到很大的提高,脱色时间也大大缩短。可见,优化的脱色反应条件能够大幅度提高灵芝漆酶对直接耐晒翠蓝 GL 的脱色率,以及大大缩短脱色时间。

3 讨论

酞菁类染料由于具有稳定的分子结构,降解比较困难,目前未见采用漆酶对酞菁类染料进行处理的研究报道。故本研究选取酞菁类染料直接耐晒翠蓝 GL 作为漆酶脱色处理对象,研究得到两个有实际参考价值的结论:1)灵芝菌株发酵所得的漆酶粗酶液可直接用于直接耐晒翠蓝 GL 染料的脱色。分析其原因可能是漆酶粗酶液中存在某种小分子介体介导了直接耐晒翠蓝 GL 的氧化脱色;或者直接耐晒翠蓝 GL 染料为该漆酶的直接底物因而不需要小分子介体介导。2)在本研究优化的脱色条件下,利用漆酶粗酶液催化直接耐晒翠蓝 GL 脱色的脱色率高达94.3%。在国内有关的研究中,除了 *Pleurotus ostreatus* 漆酶催化蒽醌染料 SN4R^[8]、彩绒革盖菌漆酶催化酸性橙^[9]、云芝菌漆酶催化靛蓝^[10]、*Coriolus versicolor* 漆酶催化酸性紫 43^[11]以及 *Trametes versicolor* 1126 催化靛蓝^[12]的脱色率在90%以上外,其它脱色率均在90%以下,且这些漆酶往往还需要添加有毒或昂贵的小分子介体如 ABTS、HBT 才能显著的提高脱色率^[12]。本研究采用灵芝菌株发酵所产的粗漆酶直接对耐晒翠蓝 GL 进行脱色实验,不需要小分子介体的介导,且脱色效果好。同时,采用价格相对低廉的灵芝粗漆酶直接降解染料也为最终解决酶制剂处理染料废水成本高及介体有毒昂贵的难题提供一种选择。

参考文献

- [1] 涂宁宇,陈松明.产生木素降解酶的白腐菌的研究进展.造纸科学与技术,2006,25(3):27-31.
- [2] 徐淑霞,宋安东,张世敏,等.杂色云芝漆酶和发酵液降解对苯二酚研究.安全与环境学报,2007,7(6):54-57.
- [3] Balan DSL, Monteiro RTR. Decolorization of textile in-

- indigo dye by ligninolytic fungi. *J Biotechnol*, 2001, **89**: 141-145.
- [4] Hao J, Song F, Huang F. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, **34**(3): 233-240.
- [5] Manu BC, haudhari S. Decolorization of indigo and azo dyes in semicontinuous reactors with long hydraulic retention time. *Process Biochem*, 2003, **38**: 1213-1221.
- [6] Soares GMB, de Amorim ATP, Costa-Ferreira M. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *J Biotechnol*, 2001, **89**(2/3): 123-129.
- [7] Umesh U Jadhav, Vishal V Dawkar, Gajanan S Ghodake. Biodegradation of direct red 5B, a textile dye by newly isolated *Comamonas* sp. UVS. *J Hazard Mater*, 2008, **158** (2/3): 507-516.
- [8] 侯红漫, 周集体, 王 竟, 等. 白腐菌 *Pleurotus ostreatus* 漆酶对蒽醌染料 SN4R 脱色研究. 大连理工大学学报, 2004, **44**: 640-645.
- [9] 卢 蓉, 沈雪亮, 夏黎明. 彩绒革盖菌产漆酶及其对染料脱色的研究. 林产化学与工业, 2005, **25**: 73-76.
- [10] 高恩丽, 张树江, 夏黎明. 云芝菌发酵产漆酶及其对靛蓝脱色的研究. 高校化学工程学报, 2007, **21**: 111-115.
- [11] 赵林果, 季永新, 李 强, 等. 固定化漆酶对染料酸性紫 43 的脱色和降解. 工业微生物, 2007, **37**(6): 35-40.
- [12] 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. 环境污染与防治, 2008, **30**(6): 27-30.
- [13] Rodríguez CS, Toca HJL. Industrial and biotechnological applications of laccases. *Biotechnology Advances*, 2006, **24**: 500-513.
- [14] 王成国, 邓 兵. 纳米 TiO₂ 光催化氧化处理直接耐晒翠蓝染料溶液. 染整技术, 2005, **27**(4): 1-4.

编辑部公告

中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中国科学院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 已取得北京市工商行政管理局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)及《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请汇入以下新账号:

收款单位: 中国科学院微生物研究所

开户银行: 中国工商银行北京分行海淀西区支行

帐 号: 0200004509089117425

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王 闵

电子信箱: gg@im.ac.cn

网 址: <http://journals.im.ac.cn>

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>