

# 一株产漆酶细菌的分离鉴定及酶学性质研究

徐腾飞 卢磊 赵敏\* 汪春蕾 李德斌 杨洪一

(东北林业大学 生命科学学院 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:** 【目的】分离获得产漆酶的细菌菌株, 研究漆酶的酶学性质并应用于染料脱色。

【方法】利用含铜的富集培养基筛选产漆酶细菌; 通过形态特征、生理生化试验及 16S rDNA 序列分析等方法进行鉴定; 以丁香醛连氮为底物测定漆酶的酶学性质; 通过测定染料在最大吸收波长下吸光值的变化评价漆酶对染料的脱色效果。【结果】从森林土壤中筛选到一株漆酶高产菌株 LS05, 初步鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*); 菌株 LS05 的芽孢漆酶以丁香醛连氮为底物的最适 pH 为 6.6, 最适温度为 70 °C; 该酶具有较好的稳定性, 经 70 °C 处理 10 h 或在 pH 9.0 条件下放置 10 d 后可保留活性。对抑制剂 SDS 和 EDTA 具有一定的抗性, 在碱性条件下可有效脱色不同的工业染料, RB 亮蓝、活性黑和靛红 1 h 内的脱色率达 93% 以上。【结论】*Bacillus amyloliquefaciens* LS05 的芽孢漆酶在高温和碱性条件下稳定性强, 相对于真菌漆酶具有更好的工业应用特性, 可有效用于工业染料废水的处理。

**关键词:** 漆酶, 解淀粉芽孢杆菌, 鉴定, 酶学性质, 染料脱色

## Isolation, identification of a laccase-producing bacterial strain and enzymatic properties of the laccase

XU Teng-Fei LU Lei ZHAO Min\* WANG Chun-Lei

LI De-Bin YANG Hong-Yi

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

**Abstract: [Objective]** The aim of this study was to screen laccase-producing bacterial strains

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No. 12513039)

\*通讯作者: Tel: 86-451-82191513; 信箱: mllps@yahoo.com

收稿日期: 2012-10-19; 接受日期: 2013-01-04

and to investigate the enzymatic properties as well as decolorization ability of the laccase. [Methods] Enrichment medium supplemented with copper ions was used to isolate bacterial strains exhibiting laccase activity. The isolated strain was identified by morphology observation, physiological and biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis. The enzymatic properties of laccase were investigated with syringaldazine as substrate. Dye decolorization ability of the laccase was tested by determining the change at maximum wavelength of synthetic dyes. [Results] A bacterial strain LS05 with high laccase activity was isolated from forest soil, and was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The spore laccase of strain LS05 demonstrated optimum pH and temperature at pH 6.6 and 70 °C, respectively. It also showed high stability, retaining its activity after incubation at 70 °C for 10 h or at pH 9.0 for 10 d. Resistance towards SDS and EDTA was found for the spore laccase. The enzyme could efficiently decolorize different synthetic dyes at alkaline conditions. More than 93% of remazol brilliant blue R, reactive black 5 and indigo carmine were decolorized within 1 h. [Conclusion] The spore laccase of *Bacillus amyloliquefaciens* LS05 was highly stable at high temperature and alkaline pH, which was more advantageous in industrial application than fungal laccase. It showed high potential in treatment of industrial dye effluents.

**Keywords:** Laccase, *Bacillus amyloliquefaciens*, Identification, Enzymatic properties, Dye decolorization

漆酶(Laccase EC1.10.3.2, 对苯二酚: 氧化还原酶)是一种含铜的多酚氧化酶, 可催化氧化酚类和芳香胺类等多种有机化合物, 同时将分子氧还原成水<sup>[1]</sup>。在小分子介体存在时, 漆酶还可氧化许多非酚类的有机物<sup>[1]</sup>。由于漆酶的底物范围十分广泛, 因此在造纸、食品、污染物降解、生物检测等领域具有较好的应用前景<sup>[2]</sup>。漆酶在自然界中广泛分布于植物、真菌和细菌中<sup>[3]</sup>, 由于真菌漆酶一般位于胞外, 便于鉴定和分离纯化, 因此研究较多的是真菌漆酶。但 Alexandre 等<sup>[4]</sup>通过对蛋白数据库和细菌基因组进行同源性分析, 发现漆酶也广泛存在于原核生物中。目前已在芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)和链霉菌(*Streptomyces* sp.)等一些菌株中发现细菌漆酶的存在<sup>[3]</sup>。

真菌漆酶一般具有较高的酶活, 如漆酶高产菌株 *Trametes* sp. 420 的漆酶活性可达

$7.87 \times 10^3$  U/L<sup>[5]</sup>, 其漆酶基因 *lacD* 在毕赤酵母中重组表达时最高酶活为  $8.3 \times 10^4$  U/L<sup>[6]</sup>, 在高密度发酵条件下, 重组漆酶 rLacDx 产量可进一步增加到  $2.39 \times 10^5$  U/L<sup>[7]</sup>, 是目前报道的漆酶产量最高的工程菌株。虽然真菌漆酶的活性要高于细菌漆酶, 但真菌漆酶一般在酸性或中性条件下催化底物, 在碱性和氯离子等条件下难以发挥作用<sup>[8]</sup>。与真菌漆酶相比, 细菌漆酶在高温和碱性等条件下具有更好的稳定性, 更适合工业应用环境, 近年来受到越来越多的关注<sup>[3]</sup>。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的芽孢外壁蛋白 CotA 是研究最多的细菌漆酶, 其位于芽孢外壁, 可能与芽孢色素合成、抗紫外线及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 有关<sup>[3,9]</sup>。CotA 最显著的特征是具有极好的热稳定性, 在 80 °C 的酶活半衰期在 2 h 以上<sup>[10]</sup>。枯草芽孢杆菌的漆酶已被用于降解酚类物质和工业染料, 但关于其他芽孢杆菌的漆酶研究和应用报道较少。本实验室利

用含铜富集培养基从森林土壤中筛选到一株具有较高漆酶活性的细菌菌株 LS05, 经鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*), 通过研究该菌株芽孢漆酶的性质及染料脱色能力, 为推动细菌漆酶的应用奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要试剂

丁香醛连氮(SGZ), 2,2'-连氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) (ABTS), RB 亮蓝, 活性黑, 靛红, 乙酰丁香酮为 Sigma 公司产品; 细菌基因组提取试剂盒, 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒为 Omega 公司产品; *Escherichia coli* JM109 感受态细胞、引物、*Taq* 酶、dNTP、pMD18-T 载体、IPTG 和 X-Gal 为 TaKaRa 公司产品; 其它常规试剂均为分析纯。

### 1.2 产漆酶菌株的筛选

森林土壤样品来自黑龙江省凉水国家级自然保护区, 将 10 g 土壤样品加入含 0.2 mmol/L  $\text{CuSO}_4$  的 LB 培养基中, 充分混匀后于 37 °C、200 r/min 振荡培养 24–48 h, 将培养液适当稀释后涂布于含 0.2 mmol/L  $\text{CuSO}_4$  的 LB 固体培养基上, 37 °C 倒置培养 3–5 d。在菌落周围滴加 1 mmol/L 的 SGZ 或 ABTS, 若在滴定区域出现粉色或绿色, 表示有漆酶活性存在。挑取能使以上两种底物变色的菌落接种于 LB 固体培养基上, 反复划线分离纯化。

### 1.3 分离菌株形态及生理生化鉴定

分离菌株的生理生化实验参照文献[11]。菌株基因组采用细菌 DNA 提取试剂盒提取, 利用细菌通用引物<sup>[12]</sup>进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用胶回收试剂盒回收目的片段并与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 经蓝白斑筛选得到阳性克隆, 进行 PCR 鉴定并送往上海英骏生物技术公司测

序。将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 同源比对分析, 选取同源性较高的序列经 Clustal 比对后, 用 MEGA 4.0 软件采用邻接法构建系统发育树<sup>[13]</sup>。

### 1.4 粗酶液的制备

筛选到的产漆酶细菌为芽孢杆菌, 具有漆酶活性的蛋白位于芽孢外壁上, 因此, 制备该菌株的芽孢悬液为粗酶液。将菌株划线接种于固体产孢培养基上, 37 °C 倒置培养 4 d, 按照 Goldman 和 Tipper 报道的方法制备芽孢悬液<sup>[14]</sup>。

### 1.5 漆酶活性测定

分别采用 ABTS 和 SGZ 为底物检测漆酶活性<sup>[10]</sup>。采用 ABTS 为底物时, 3 mL 反应体系含一定体积的芽孢漆酶悬液, 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 3.0)和 1 mmol/L 的 ABTS, 30 °C 反应 3 min 后在 420 nm 处测定吸光值。采用 SGZ 为底物时, 3 mL 反应体系含一定体积的芽孢漆酶悬液, 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 7.0), 0.1 mmol/L 的 SGZ, 30 °C 反应 3 min 后在 525 nm 处测定吸光值。以 1 min 内催化氧化 1  $\mu\text{mol}$  底物所需的酶量为 1 个酶活单位(U)。所有测定均重复 3 次取平均值。

### 1.6 漆酶酶学性质研究

**1.6.1 pH 对漆酶活性及稳定性的影响:** 采用不同 pH 的 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH 2.2–7.0), 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0–8.0), 以 SGZ 和 ABTS 作为底物测定。pH 稳定性的研究通过在 30 °C 时将漆酶与 pH 3.0、7.0 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液及 pH 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液中混合放置 1–10 d 后, 测定剩余漆酶活性。所有测定均重复 3 次取平均值。

**1.6.2 温度对漆酶活性及稳定性的影响:** 在最适 pH 下, 以 SGZ 为底物, 测量漆酶在 30 °C–90 °C 内的酶活。同时将漆酶在 50 °C–70 °C 保温 0–10 h 后测定剩余活性。所有测定均重复 3 次取平均值。

**1.6.3 金属离子对漆酶活性的影响:** 选取常见的

金属离子并使其终浓度为 10 mmol/L, 在 30 °C 时加入底物 SGZ 反应 3 min 测定酶活。同时以不加金属离子的反应体系为空白, 所有测量均重复 3 次取平均值。

**1.6.4 抑制剂对漆酶活性的影响:** 将常见的漆酶抑制剂与芽孢漆酶混合均匀后在 30 °C 条件下以 SGZ 为底物测定漆酶剩余活性。空白对照下添加抑制剂, 所有测定均重复 3 次取平均值。

**1.6.5 动力学常数的测定:** 在最适 pH、30 °C 条件下, 分别以 ABTS (20–1000 μmol/L) 和 SGZ (10–100 μmol/L) 为底物, 测定芽孢漆酶在不同底物浓度下的酶活力, 利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 求出  $K_m$  值和  $V_{max}$ , 所有测定均重复 3 次取平均值。

## 1.7 漆酶对染料的脱色

选择不同种类的染料(RB 亮蓝、活性黑、靛红), 研究漆酶在介体乙酰丁香酮的参与下对这些染料的脱色效果。6 mL 脱色体系含有 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0), 染料(终浓度及最大吸收波长见表 1), 0.1 mmol/L 乙酰丁香酮, 芽孢漆酶(终浓度为 25.2 U/L, SGZ 为底物), 同时以不加入漆酶的体系为空白对照。脱色过程在 40 °C 进行, 定时取样, 12 000 r/min、离心 2 min 后测各染料最大吸收波长下的吸光值。染料的脱色率计算公式为:  $(A_0 - A) / A_0 \times 100\%$ , 其中  $A_0$  为初始染料吸

光值,  $A$  为定期取样测的吸光值。所有测定均重复 3 次取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 产漆酶菌株的筛选和鉴定

经含铜培养基富集后, 通过向平板上的菌落中央和边缘滴加漆酶底物 SGZ 和 ABTS 的方法, 从土壤样品中纯化出一株具有较高漆酶活性的细菌菌株 LS05。该菌株在 3 min 内可氧化 SGZ 和 ABTS 分别显现粉红色和绿色。该菌株的漆酶活性随着培养时间的延长逐渐升高, 在第 6 天的最高活性为 79.6 U/g (图 1)。菌株 LS05 呈革兰氏染色阳性, 产芽孢, 在 LB 固体培养基上菌落为微黄色, 扁平呈圆形, 菌落表面干燥, 不透明, 正反面颜色一致。菌株 LS05 芽孢的扫描电镜照片见图 2, 从图 2 中可看出其芽孢呈椭圆形, 大小约为  $0.8 \mu\text{m} \times (1.2 - 1.6) \mu\text{m}$ 。

菌株 LS05 的生理生化特征见表 2。根据生理生化实验结果, 结合形态学观察, 并参考《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[15]</sup>, 初步鉴定该菌株在分类上属于芽孢杆菌属的细菌。将获得的 LS05 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中同源性较高的芽孢杆菌属其他种的 16S rDNA 序列经 Clustal 比对后, 采用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树, 用自展法 (Bootstrap) 检验系统发育树的可靠性, 自展 1 000

表 1 染料终浓度及其最大吸收波长

Table 1 Final concentration and maximum absorbance wavelengths of the tested dyes

染料名称 Dye	终浓度 Final concentration (mg/L)	最大吸收波长 Maximum absorbance wavelength (nm)
RB 亮蓝 Remazol brilliant blue R	100	591
活性黑 Reactive black 5	40	597
靛红 Indigo carmine	25	610

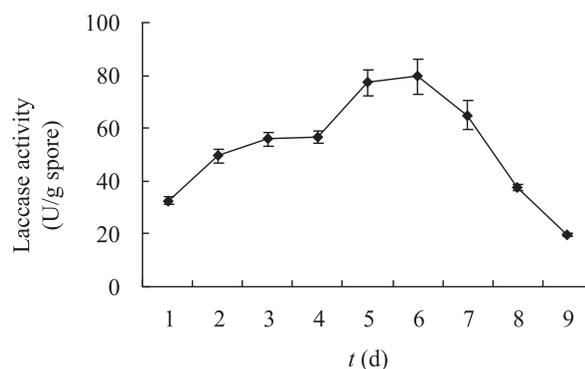


图 1 菌株 LS05 的产漆酶曲线

Fig. 1 Time course of laccase activity of strain LS05

次。结果表明 LS05 菌株在系统发育树上与已报道的解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)亲缘关系最近, 同源性达 98% 以上(图 3), 结合形态学和生理生化特征最终鉴定其为芽孢杆菌属的解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* LS05。

## 2.2 pH 对漆酶活性及稳定性的影响

菌株 LS05 的芽孢漆酶催化 SGZ 和 ABTS 两种底物的最适 pH 有所不同。以 SGZ 为底物时, 在 5.8–7.8 之间催化活性较高, 最适 pH 为 6.6; 而以 ABTS 为底物时, 在酸性条件下活性较高, 最适 pH 为 3.0 (图 4A)。菌株 LS05 芽孢漆酶的 pH 稳定性结果如图 4B 所示, 在酸性条件下(pH 3.0), 漆酶稳定性较差, 1 d 后即丧失 50% 以上的活性; 在中性和碱性的条件下, 芽孢漆酶表现出了较强的稳定性, 10 d 之后仍保留 80% 左右的酶活。

## 2.3 温度对漆酶活性及稳定性的影响

在一定的范围内, 随着温度的升高, 芽孢漆

酶的催化能力也随之升高, 并且在 50 °C–80 °C 活性较强, 最适反应温度为 70 °C, 超过 80 °C 酶活明显降低(图 5A)。

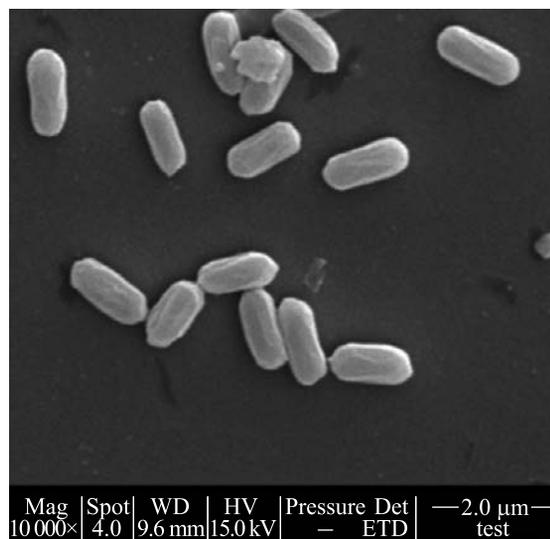


图 2 菌株 LS05 的芽孢电镜照片

Fig. 2 Scanning electron micrograph of spores from strain LS05

表 2 菌株 LS05 的部分生理生化特征

Table 2 Partial physiological and biochemical characteristics of strain LS05

特征 Characteristics	结果 Results	特征 Characteristics	结果 Results
Aerobic	+	Citrate utilization	+
Growth at:		Malonate utilization	-
50 °C	+	Propionate utilization	-
pH 5.0	+	Fermentation of :	
pH 9.0	+	Maltose	-
9% NaCl	+	Rhamnose	-
Catalase	+	Mannose	-
Oxidase	+	Glucose	+
Starch hydrolysis	+	Arabinose	-
Gelatin hydrolysis	+	Lactose	+
Indole test	+	Fructose	+
Nitrate reduction	+	Mannitol	+
Voges proskauer test	+	Inositol	+
Methyl red test	-	Sorbitol	+

注: +: 阳性结果; -: 阴性结果。

Note: +: Positive; -: Negative.

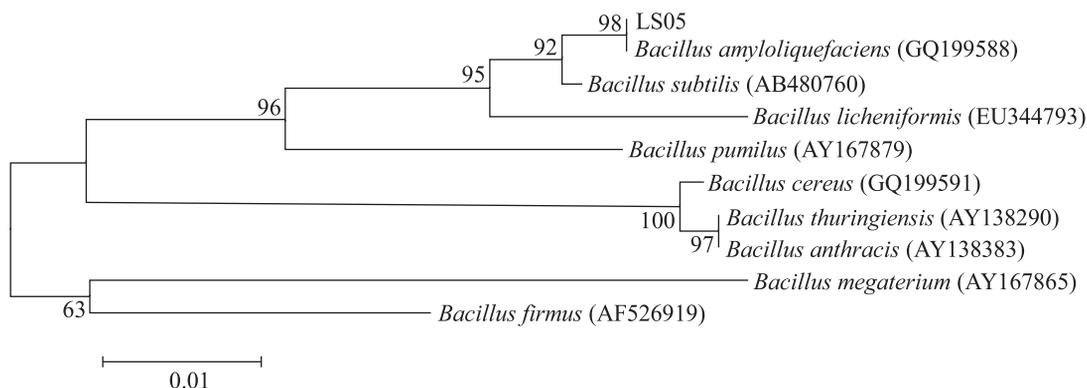


图3 基于16S rDNA序列和邻接法构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences and Neighbor-Joining analysis

注: 括号内为序列的 GenBank 登录号; 分支点数字代表步长值; 标尺代表序列间分歧度。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at each branch points indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.01 represents sequence divergence.

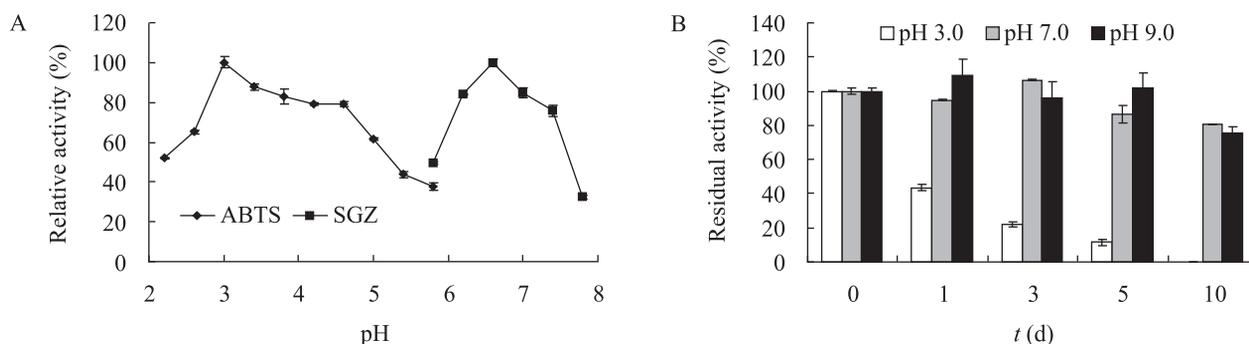


图4 pH对漆酶活性(A)及稳定性(B)的影响

Fig. 4 Effect of pH on activity (A) and stability (B) of the spore laccase

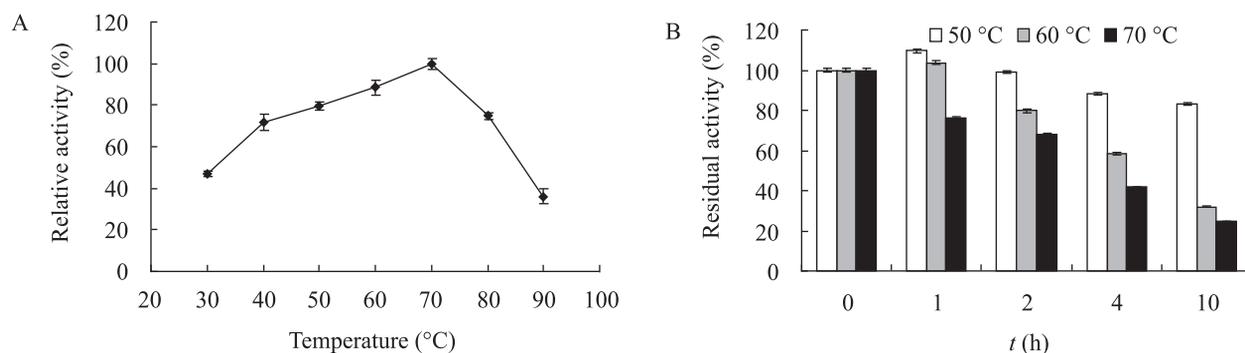


图5 温度对漆酶活性(A)及温度稳定性(B)的影响

Fig. 5 Effect of temperature on activity (A) and stability (B) of the spore laccase

芽孢漆酶的热稳定性测定在 50 °C–70 °C 放置 0–10 h 后测定剩余活性。芽孢漆酶在 50 °C 和 60 °C 下表现出很好的稳定性, 在 50 °C 保温 2 h 后, 酶活几乎没有损失, 在 60 °C 保温超过 4 h 后的酶活仍可达到 50% 以上, 而在 70 °C 高温下保温 10 h 后仍具有 20% 以上的活性(图 5B)。

#### 2.4 金属离子对漆酶活性的影响

各种金属离子对漆酶活性影响的差异较大,  $\text{Li}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  对芽孢漆酶的活性具有显著的促进作用, 漆酶的催化活性中心一般含有几个铜原子, 因此铜离子的加入可能没有对漆酶的活性产生太大的影响;  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  对酶活有抑制作用, 其中  $\text{Ag}^+$ 、

$\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Hg}^{2+}$  的抑制作用最为明显(表 3)。

#### 2.5 抑制剂对漆酶活性的影响

二硫苏糖醇和半胱氨酸两种抑制剂对漆酶活性的抑制作用最为明显, 在 0.1 mmol/L 时即可抑制大部分漆酶活性, 此外 0.1 mmol/L 的  $\text{NaN}_3$  也可使酶活丧失 30% 左右(表 4)。浓度为 25–50 mmol/L 的 EDTA 对酶活起不到抑制作用, 反而对酶活会有所促进, 直到 EDTA 的浓度增加到 100 mmol/L 时, 其抑制效果仅为 25% 左右, 这说明菌株 LS05 的芽孢漆酶对 EDTA 具有良好的耐受性。

#### 2.6 动力学常数

芽孢漆酶催化底物 ABTS 和 SGZ 的  $V_{\max}$  分别  $27.66 \pm 0.45$  nmol/min 和  $19.58 \pm 0.22$  nmol/min,

表 3 金属离子对菌株 LS05 漆酶活性的影响  
Table 3 Effect of metal ions on spore laccase activity of strain LS05

金属离子 Metal ions	残余酶活 Residual activity (%)	金属离子 Metal ions	残余酶活 Residual activity (%)
Control	100	$\text{Cu}^{2+}$	$84.38 \pm 1.78$
$\text{Li}^+$	$112.83 \pm 7.36$	$\text{Co}^{2+}$	$40.14 \pm 7.25$
$\text{Na}^+$	$103.00 \pm 3.35$	$\text{Mn}^{2+}$	0.00
$\text{K}^+$	$117.56 \pm 3.10$	$\text{Ba}^{2+}$	$108.36 \pm 1.38$
$\text{Ag}^+$	$3.21 \pm 0.95$	$\text{Hg}^{2+}$	$5.91 \pm 1.45$
$\text{Mg}^{2+}$	$118.61 \pm 1.56$	$\text{Fe}^{3+}$	$76.89 \pm 3.46$
$\text{Ca}^{2+}$	$102.29 \pm 1.45$	$\text{Al}^{3+}$	$93.85 \pm 0.67$
$\text{Zn}^{2+}$	$92.98 \pm 2.34$		

表 4 抑制剂对菌株 LS05 漆酶活性的影响  
Table 4 Effect of inhibitors on spore laccase activity of strain LS05

抑制剂 Inhibitors	浓度 Concentration (mmol/L)	残余活性 Residual activity (%)	抑制剂 Inhibitors	浓度 Concentration (mmol/L)	残余活性 Residual activity (%)
SDS	0.1	$105.35 \pm 3.86$	Dithiothreitol	10.0	0
	1.0	$93.75 \pm 3.30$		0.1	$10.92 \pm 0.53$
	10.0	$51.86 \pm 1.49$		1.0	0
$\text{NaN}_3$	0.1	$71.46 \pm 3.09$	EDTA	10.0	0
	1.0	$33.73 \pm 1.96$		25.0	$102.71 \pm 3.84$
	10.0	$3.69 \pm 0.43$		50.0	$116.04 \pm 2.45$
Cysteine	0.1	$7.23 \pm 1.49$		100.0	$73.64 \pm 3.62$
	1.0	0			

以 ABTS 为底物时的  $K_m$  值为  $57.83 \pm 3.84 \mu\text{mol/L}$ , 以 SGZ 为底物时的  $K_m$  值为  $37.19 \pm 1.16 \mu\text{mol/L}$ , 表明该菌株的芽孢漆酶对底物 SGZ 具有更高的亲和力。

## 2.7 染料脱色

为了测试芽孢漆酶在碱性条件下对染料的脱色能力, 选择了 3 种化学结构不同的工业染料进行脱色实验。结果表明芽孢漆酶在介体(乙酰丁香酮)的介导下体现出较强的催化氧化能力, 能快速有效脱色 3 种染料, 1 h 后对 RB 亮蓝、活性黑和靛红的脱色率达到 93% 以上(图 6)。

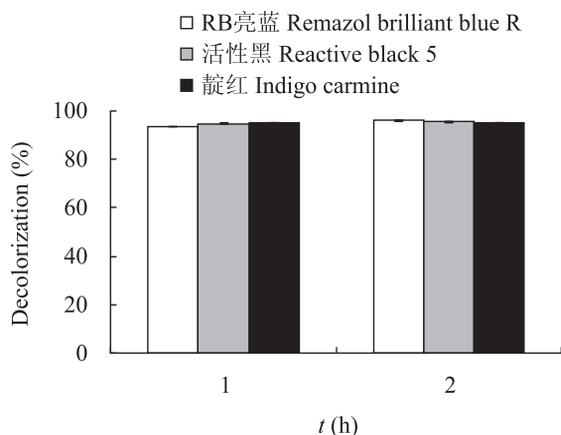


图 6 漆酶在碱性条件下对不同染料的脱色

Fig. 6 Decolorization of different dyes by spore laccase under alkaline conditions

## 3 讨论

以往对漆酶的研究和应用, 主要偏重于真菌漆酶, 有关细菌漆酶的研究相对较少<sup>[3]</sup>。目前筛选产漆酶细菌主要通过生物信息学方法在数据库中搜索漆酶的同源性序列, 发现潜在的产漆酶的细菌, 然后通过基因克隆和酶活测定等方法进一步筛选验证<sup>[4]</sup>。由于漆酶的活性中心由  $\text{Cu}^{2+}$  组成, 漆酶依赖  $\text{Cu}^{2+}$  进行电子传递氧化底物, 有不少研究表明培养基中加入  $\text{Cu}^{2+}$  可诱导细菌漆酶的表达和提高漆酶活性<sup>[16-17]</sup>。本文利用含铜的富

集培养基从森林土壤中分离筛选出一株具有漆酶活性的菌株 LS05, 通过生理生化和 16S rDNA 序列分析, 鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

细菌漆酶相对真菌漆酶的主要优势在于高温和碱性条件下的稳定性, 与多数真菌漆酶的最适 pH 范围在酸性条件下不同<sup>[18]</sup>, *B. amyloliquefaciens* LS05 芽孢漆酶的催化底物的 pH 范围比较广泛, 可在碱性条件下催化底物 SGZ, 同时在 pH 9.0 时酶活可保持 10 d 以上(图 4)。不少工业废水如造纸和染料废水等的 pH 值一般在碱性范围内, 真菌漆酶在此条件下活性较低, 限制了其工业应用, 而本实验所用的芽孢漆酶在碱性条件下催化活性和稳定性都比真菌漆酶要好, 在碱性工业废水的处理上具有较好的应用前景。由于芽孢本身的特殊构造使内含芽孢的微生物可以在极其恶劣的环境下生存, 因此芽孢漆酶也相应具有抗不良物理、化学环境如高温、紫外线、过氧化氢等的能力<sup>[19]</sup>, 如 *B. subtilis* 的芽孢漆酶在 80 °C 的酶活半衰期在 2 h 以上<sup>[10]</sup>。本实验所筛选的 *B. amyloliquefaciens* LS05 的芽孢漆酶在 90 °C 的高温下仍具有催化活性, 在 70 °C 的酶活半衰期接近 4 h (图 5), 而同样耐碱的 *Streptomyces psammotomicus* 漆酶在 55 °C 以上活性明显下降<sup>[20]</sup>。

漆酶介体系统的应用可以极大地扩大漆酶的底物范围, 促进很多难氧化有机物的氧化分解, 在环境污染治理上具有重要用途<sup>[1]</sup>。染料广泛用于食品、制药、化妆品、纺织等行业, 在染料生产和使用过程中, 大量的染料废水直接排放到环境中, 不仅污染环境, 而且会产生例如联苯胺一类的致癌物质, 因此染料废水的处理越来越受到人们的关注<sup>[21]</sup>。在介体乙酰丁香酮的参与下, *B. amyloliquefaciens* LS05 的芽孢漆酶可在碱性条件下(pH 9.0)迅速有效地脱色不同结构的工业染料, 表明该芽孢漆酶在工业染料废水的处理上具有较好的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Majeau JA, Brar SK, Tyagi RD. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(7): 2331–2350.
- [2] Desai SS, Nityanand C. Microbial laccases and their applications: a review[J]. *Asian Journal of Biotechnology*, 2011, 3(2): 98–124.
- [3] Sharma P, Goel R, Capalash N. Bacterial laccases[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23(6): 823–832.
- [4] Alexandre G, Zhulin IB. Laccases are widespread in bacteria[J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(2): 41–42.
- [5] Tong P, Hong Y, Xiao Y, et al. High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp.[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(2): 295–301.
- [6] Hong YZ, Zhou HM, Tu XM, et al. Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes* sp. 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*[J]. *Current Microbiology*, 2007, 54(4): 260–265.
- [7] 周宏敏, 洪宇植, 肖亚中, 等. 栓菌漆酶在毕赤酵母中高效表达及重组酶的性质[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(6): 1055–1059.
- [8] Fang ZM, Li TL, Chang F, et al. A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 111: 36–41.
- [9] Hullo MF, Moszer I, Danchin A, et al. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(18): 5426–5430.
- [10] Martins LO, Soares CM, Pereira MM, et al. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(21): 18849–18859.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364–398.
- [12] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697–703.
- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [14] Goldman RC, Tipper DJ. *Bacillus subtilis* spore coats: complexity and purification of a unique polypeptide component[J]. *Journal of Bacteriology*, 1978, 135(3): 1091–1106.
- [15] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 732–734.
- [16] Malhotra K, Sharma P, Capalash N. Copper and dyes enhance laccase production in  $\gamma$ -proteobacterium JB[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(13): 1047–1050.
- [17] Niladevi KN, Prema P. Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolorization[J]. *Bioresources Technology*, 2008, 99(11): 4583–4589.
- [18] Baldrian P. Fungal laccases—occurrence and properties[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30(2): 215–242.
- [19] Riesenman PJ, Nicholson WL. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 620–626.
- [20] Niladevi KN, Jacob N, Prema P. Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: purification and characterization[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(6): 654–660.
- [21] Rodríguez CS. Dye removal by immobilised fungi[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(3): 227–235.