

文章编号: 1003-9015(2013)01-0090-06

无机盐对海洋内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶及漆酶脱色偶氮类染料的影响

冯晓雨, 陈慧英, 薛栋升, 姚善泾

(浙江大学 化学工程与生物工程学系 生物质化工教育部重点实验室, 浙江 杭州 310027)

摘要: 内生拟盘多毛孢菌 J63 (*Pestalotiopsis* sp. J63)是从东海的海滩滩涂中新分离出一株真菌。研究考察了无机盐对该菌株产漆酶响, 以及对漆酶催化底物和脱色偶氮类染料甲基橙的影响。结果表明添加 H_3BO_3 、 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 KBr 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对漆酶的产生有明显的促进作用, 其中 H_3BO_3 的作用最明显, 可使酶活增加 221.8%。在漆酶催化底物反应时, 除 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 能够抑制漆酶酶活, 其余无机盐均对酶活有促进作用。 $14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 对酶活的促进作用明显, 使相对酶活达到 124.9%。 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KBr}$ 使相对酶活达到 116.7%, 与其他菌株所产漆酶受到 KBr 抑制的特性相比具有优势。添加 $14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KBr}$ 后相应的脱色率分别达到了 97.3%和 75.6%, 高于对照组 64%的脱色率。同时还研究了适宜该菌株产漆酶的温度和 pH, 当温度为 26°C , pH 为 6.0 时酶活最高, 达到 $3280.6 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 漆酶; 内生拟盘多毛孢属; 无机盐; 偶氮类染料

中图分类号: Q554.1; Q815; Q939.97

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1003-9015.2013.01.015

Effect of Inorganic Salts on Laccase Production by Marine-Derived *Pestalotiopsis* sp. J63 and on Azo Dye Decolorization

FENG Xiao-yu, CHEN Hui-ying, XUE Dong-sheng, YAO Shan-jing

(Key Laboratory of Biomass Chemical Engineering of Ministry of Education, Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: *Pestalotiopsis* sp. J63 is a fungus isolated from the oceanic sediment of the East China Sea. The effect of inorganic salts on laccase production, laccase activity and azo dye (methyl orange) decolorization was investigated in this work. The results suggest that the additions of H_3BO_3 , $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaF , KBr , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ have the positive effect on laccase production. Among them, H_3BO_3 enhances laccase activity by 221.8% which is the most effective one. In the catalytic reaction process, all salts increase laccase activity except for $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ of $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Moreover, $14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ and $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KBr}$ increase laccase activity to 124.9% and 116.7% in comparison with the control, respectively. Corresponding decolorization rates also enhance to 97.3% and 75.6%, which are much higher than that of the control sample (64%). Then, the appropriate temperature and pH for laccase formation were tested in fermentation, and it was found that 26°C and pH 6.0 give the highest laccase activity ($3280.6 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$).

Key words: laccase; *Pestalotiopsis*; inorganic salts; azo dye

1 前言

漆酶(EC 1.10.3.2)是一类含铜的多酚氧化酶,能够催化酚类物质、胺类物质、羧酸及它们的衍生物氧化,同时能将氧分子还原为水。因漆酶催化的底物范围广泛,副产物无污染,它在废弃物的生物治理中有重要的应用价值^[1]。目前用于生产漆酶的微生物主要为真菌,包括担子菌、子囊菌和半知菌,其中又以担子菌和子囊菌研究较多^[2]。近年来半知菌产漆酶的潜能逐渐被发现,成为又一个重要的研究对象^[3]。

收稿日期: 2011-10-18; 修订日期: 2012-02-14。

基金项目: 国家自然科学基金(21036005); 浙江省科技厅社会发展公益项目(2011C33016)。

作者简介: 冯晓雨 (1987-), 女, 山西太原人, 浙江大学硕士生。通讯联系人: 姚善泾, E-mail: yaosj@zju.edu.cn

目前国内外关于海洋半知菌产漆酶的研究较少, 考虑到海洋微生物可能的特殊性, 因此深入了解海洋半知菌产漆酶的能力很有必要。

据报道, 金属离子具有调节漆酶的基因表达的功能, 其中 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 离子对漆酶的表达有促进作用, 而 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Hg^{2+} 等金属离子对漆酶的产生有抑制作用^[4, 5]。卤族元素 Br^- 、 Cl^- 等对漆酶同样具有抑制作用, 主要是因为它们与电子供体存在竞争关系使得酶催化底物的效率降低^[6]。由于海洋环境中富含多种无机盐, 海洋微生物在自然进化的过程中形成了对这些无机盐的依赖性, 因此无机盐对海洋微生物产漆酶的影响可能不同于陆生微生物。

无机盐不仅能够影响微生物产生漆酶, 而且能够影响漆酶催化底物时的酶活性^[7]。漆酶用于生物治理的环境中常含有各种无机盐, 例如生产和使用染料所产生的废水中通常含有多种无机盐, 应用漆酶进行染料废水脱色时就要求漆酶能够在无机盐环境中保持酶活同时催化染料的降解反应。目前国内外对漆酶脱色染料的研究较多^[8], 但是在无机盐存在的环境中考察漆酶的脱色能力鲜有报道。

本文将以从海滩滩涂中新分离出来的一株真菌——内生拟盘多毛孢菌 J63 作为研究对象, 研究适宜该菌株产漆酶的 pH、温度, 重点考察无机盐对产漆酶的影响, 并考察无机盐对漆酶酶活及偶氮类染料甲基橙脱色的影响。

2 材料和方法

2.1 菌种

实验菌株是本课题组从中国东海的海滩滩涂中分离出来的。经 18S rRNA 和形态学鉴定为内生拟盘多毛孢菌, 命名为 J63, 其 18S rRNA 在 NCBI 中的序列号为 HQ339955。菌种由本实验室保藏, 并收藏于中国菌种保存中心, 收藏号为 CCTCCM2010300。

2.2 培养基

种子培养基(PDA 培养基): 马铃薯 200 g 切块后加 H_2O 1000 mL 煮沸 1 h, 纱布过滤后, 加入葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 补足水至 1000 mL, pH 值为 5.6 ± 0.2 。115℃ 湿热灭菌 30 min。

发酵培养基: 每升发酵培养基中包含 3 g 麦芽糖, 20 g 稻草粉, 8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g KH_2PO_4 , 100 μmol $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g NaCl, 0.037 g KCl, 0.54 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.27 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.042 g CaCl_2 和 10 mL 微量金属离子元素液。每升金属微量元素液包含 0.2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.003 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g H_3BO_3 , 0.02 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 0.001 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调 pH 值至 5.0。培养基于 115℃ 灭菌 30 min。考察不同 pH 值对内生拟盘多毛孢 J63 产漆酶的影响时, 用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 或 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 调至目标 pH。

2.3 培养条件

内生拟盘多毛孢菌在 PDA 培养基上于 28℃ 培养 5 d 后用打孔器在培养好的平板上切下两个直径为 5 mm 的菌丝片, 接种至装有 50 mL 发酵培养基的 100 mL 三角瓶中, 在 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、28℃ 的条件下培养 5 d。

2.4 无机盐对内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶的影响

每升发酵培养基中只添加 3 g 麦芽糖, 20 g 稻草粉, 8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g KH_2PO_4 , 100 μmol $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和所要研究的无机盐, 浓度和种类见 3.4 节表 1, 其余无机盐均不添加。

发酵液在 4℃、 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下离心 10 min 除去菌丝, 收集上清液用于酶活测定。

2.5 无机盐对漆酶酶活的影响

用发酵培养基培养内生拟盘多毛孢菌 J63, 发酵结束后离心收集粗酶液。测定漆酶酶活时反应体系中分别加入终浓度 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、NaF 和 KBr, 及 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 MgSO_4 、 CaCl_2 。

2.6 无机盐对漆酶脱色偶氮类染料甲基橙的影响

用 pH 4.5、 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸-醋酸钠缓冲液配制 $2 \times$ 无机盐溶液, 用蒸馏水配制 $10 \times$ 甲基橙溶液。实验

组中加入 3 mL 2×无机盐溶液, 60 μL 10×甲基橙溶液在染料, 混匀后再加入 3 mL 漆酶粗酶液, 于 25℃, 200 r·min⁻¹ 震荡 24 h 后测吸光值 A 。对照组中将 3 mL 漆酶粗酶液用 3 mL 100℃加热失活 15 min 的酶液代替, 用于测定初始吸光值 A_0 。将不含无机盐和甲基橙的一管作为空白对照。SrCl₂·6H₂O、MnCl₂·4H₂O、ZnSO₄·7H₂O、CoCl₂·6H₂O、KAl(SO₄)₂·12H₂O、CuSO₄·5H₂O、NaF 和 KBr 的终浓度均为 1 mmol·L⁻¹, NaCl、MgSO₄、CaCl₂ 的终浓度分别为 25 mmol·L⁻¹, 50 mmol·L⁻¹ 和 10 mmol·L⁻¹。甲基橙的终浓度为 50 mg·L⁻¹。漆酶粗酶液的最初酶活为 1600 U·L⁻¹。

$$\text{脱色率} = (A_0 - A) / A_0 \quad (1)$$

2.7 漆酶的测定方法

漆酶的酶活测定是通过检测 3 min 内氧化底物 2, 2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS) 在 420 nm ($\epsilon_{420} = 36,000 \text{ (mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) 处所产生的吸光值的变化来确定。一个酶活单位定义为每分钟氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量。

2.8 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)

Native-PAGE 采用 10% (w/v) 的分离胶和 5% (w/v) 浓缩胶, 160 V 进行电泳, 电泳过程维持温度为 4℃。电泳后将胶条置于 1 mmol·L⁻¹ ABTS (溶解于 0.2 mol·L⁻¹ pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液) 中显色 30 min。

3 结果与讨论

3.1 海洋内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶的时间进程

海洋内生拟盘多毛孢菌 J63 的生长曲线及产漆酶的时间进程如图 1 所示。由图可知, 该菌种在发酵第 6 天时酶活达到最大值 2311.1 U·L⁻¹。随时间推迟, 酶活逐渐降低, 但在第 11 天仍然保持了 85.8% 的酶活。菌体量在第四天达到最大值, 随后开始下降, 但是酶活从第四天到第五天仍然增加了 50%。这是因为从第四天开始菌体生长进入稳定期, 漆酶为该菌体的次级代谢产物, 在该阶段大量积累, 所以酶活大幅度提高。而进入第六天后, 生物量开始急剧下降, 菌体进入衰亡期, 菌体的裂解将细胞内少量的漆酶释放到胞外, 因此酶活有略微的提升。之后, 随着次级代谢有毒产物的积累和菌体的裂解, 酶活降低。

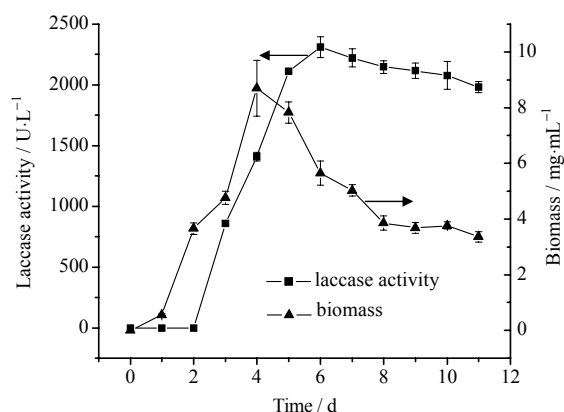


图 1 内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶的时间进程

Fig.1 Time course of laccase production by *Pestalotiopsis* sp. J63

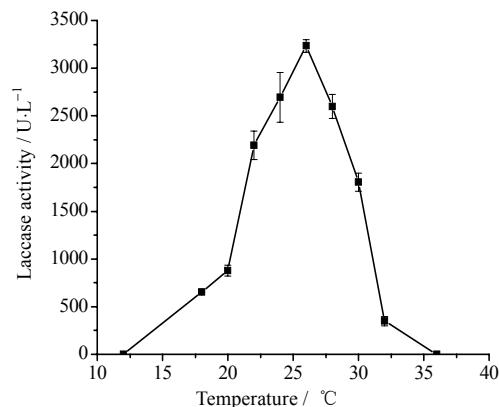


图 2 温度对内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶的影响

Fig.2 Effect of temperature on laccase production by *Pestalotiopsis* sp. J63

3.2 温度对海洋内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶的影响

图 2 显示出了温度对海洋内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶的影响。由图 2 可知, 该菌株适宜产漆酶的温度为 26℃, 在 22℃ 到 28℃ 范围内漆酶的酶活较高。在 18℃ 时漆酶的酶活仍能达到 655.6 U·L⁻¹, 说明该菌株具有一定的耐低温性。

3.3 初始 pH 值对海洋内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶的影响

图 3 显示了初始 pH 值对该菌株产漆酶的影响, pH 值为 6 时酶活达到最大值 3280.6 U·L⁻¹。进行 Native-PAGE 并活性染色发现, 在 pH 5 和 pH 6 时可产生两种同工酶 (laccase1, laccase 2)。

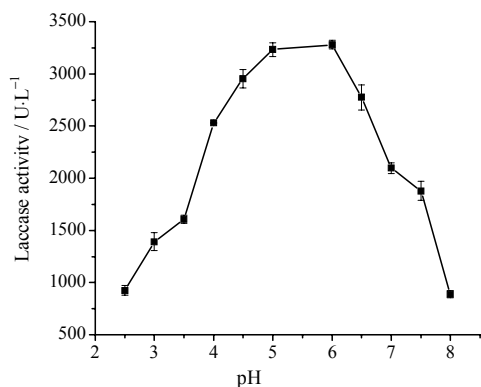


图 3 不同初始 pH 值对内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶的影响

Fig.3 Effect of initial pH on laccase production by *Pestalotiopsis* sp. J63

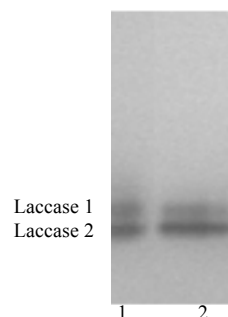


图 4 初始 pH 值为 5 和 6 时对内生拟盘多毛孢菌 J63 产生的漆酶同工酶

Fig.4 When initial pH were 5 and 6, laccase isozyme patterns produced by *Pestalotiopsis* sp. J63. Lane 1: laccase isozyme obtained at pH 5; lane 2: laccase isozyme obtained at pH 6

3.4 无机盐对海洋内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶的影响

表 1 列出了不同无机盐对内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶的影响。由表 1 可以看出, 各种金属离子及非金属离子对产漆酶均有正效应, 加入后使漆酶的酶活提高。NaCl、CaCl₂ 和 MgCl₂ 大量存在于海水中, 当培养基中加入 171 mmol·L⁻¹ NaCl、9 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 和 21 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 时, 有利

表 1 不同无机盐对内生拟盘多毛孢菌 J63 产漆酶的影响

Table 1 Effect of different concentrations of salts on laccase activity produced by *Pestalotiopsis* sp. J63

	Concentration 1 / mmol·L ⁻¹	Relative laccase activity 1 / % ^a	Concentration 2 / mmol·L ⁻¹	Relative laccase activity 2 / % ^a
H ₃ BO ₃	0.5	221.8 ± 2.3	1.5	120 ± 2.4
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0.1	201.3 ± 3.4	0.3	115.8 ± 4.3
NaF	0.07	200.1 ± 0.2	0.21	160.8 ± 5.2
KBr	1.7	203.4 ± 2.1	5.1	131.3 ± 4.1
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.007	185.1 ± 1.3	0.021	139.5 ± 3.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005	184.8 ± 0.8	0.016	144.5 ± 2.7
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.01	198.6 ± 3.3	0.03	148.7 ± 4.4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	195.9 ± 5.1	0.06	135.1 ± 3.1
Na ₂ MoO ₄	0.004	184.4 ± 2.3	0.012	150.2 ± 0.6
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.5	156.6 ± 4.9	1.5	87.7 ± 3.9
KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0.02	148.3 ± 1.7	0.06	143.7 ± 5.1
NaCl	171	156.2 ± 2.5	512	10 ± 0.3
CaCl ₂	9	134.3 ± 3.3	27	127.4 ± 3.8
MgCl ₂	21	181.1 ± 1.6	63	172.2 ± 1.1

^aLaccase activity relative to the control assay containing no salts

于漆酶酶活的提高。B、Sr、F、Br 为海洋中的主要元素, 每升海水中含量在 1 mg 以上。H₃BO₃、SrCl₂·6H₂O、NaF 及 KBr 的加入, 使漆酶酶活分别提高了 221.8%、201.3%、200.1% 和 203.4%。据文献报道卤化物能够抑制小皮伞属(*Marasmius quercophilus*)漆酶的酶活^[9], 而本研究的结果表明富集于海水中的卤族元素对该菌株产漆酶有促进作用。

Sr²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺及 Al³⁺在较低浓度时对内生拟盘多毛孢菌 J63 漆酶的酶活提高较大, 而浓度增大对产漆酶的促进作用降低。由此可以看出适量添加各种无机盐离子均能够促进漆酶的产生。

3.5 无机盐对漆酶酶活的影响

无机盐不仅对微生物发酵过程中产漆酶有影响, 对漆酶催化反应同样也有影响, 因此进一步考察了无机盐对漆酶催化反应时酶活的影响。如表 2 所示, 除 1 mmol·L⁻¹ FeSO₄·7H₂O 外其余二价金属离子对漆酶酶活均有促进作用。据文献报道 Fe²⁺对多种漆酶都有抑制作用, 如能够抑制灵芝(*Ganoderma lucidum*)的漆酶酶活^[10]。因为漆酶的催化反应是在 pH 4.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液中进行, Fe²⁺在酸性环境中容易失去一个电子成为 Fe³⁺, 所以 Fe²⁺与漆酶电子的电子传递系统相互作用, 阻碍电子从底物传递给 O₂, 从而抑制了酶活。Zn²⁺、Al³⁺对酶活的促进作用较为明显, 这一结果与粗毛栓菌(*Trametes hirsuta*)的漆酶有共同之处^[11]。可能是由于这些离子的存在能够稳定酶的三维结构, 或者能够结合到酶的活性中心上直接参与催化反应, 从而促进漆酶对染料的脱色。特别是 Al³⁺带 3 个正电荷, 较高的正电荷价数可协助酶活性中心的 Cu²⁺进行电子传递, 进而提高酶活^[10]。

表2 不同无机盐对漆酶酶活的影响

	Concentration / mmol·L ⁻¹	Relative laccase activity / % ^a
SrCl ₂ ·6H ₂ O	1	112.9 ± 2.4
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1	0
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1	113.5 ± 1.2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1	120.9 ± 3.2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1	113 ± 2.1
KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	1	115.8 ± 0.8
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1	110 ± 4.1
NaCl	25	102.6 ± 2.1
MgSO ₄	10	111.4 ± 1.6
CaCl ₂	50	101.4 ± 2.5
NaF	1	111.8 ± 1.8
KBr	1	114.6 ± 0.4

^aLaccase activity relative to the control assay containing no salts

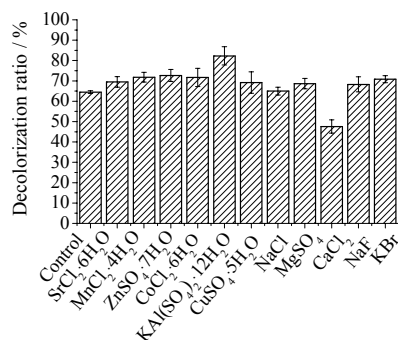


图5 无机盐对漆酶脱色甲基橙的影响

Fig.5 Effect of salts on decolorization of methyl orange by laccase of *Pestalotiopsis* sp. J63

3.6 无机盐对漆酶脱色偶氮类染料甲基橙的影响

在研究了无机盐对漆酶活性影响的基础上,进一步考察了无机盐对漆酶脱色偶氮类染料甲基橙的影响。由图5可知,1 mmol·L⁻¹ SrCl₂·6H₂O、MnCl₂·4H₂O、ZnSO₄·7H₂O、CoCl₂·6H₂O、CuSO₄·5H₂O、NaF、KBr和50 mmol·L⁻¹ MgSO₄对漆酶脱色染料均有促进作用。特别是加入1 mmol·L⁻¹ KAl(SO₄)₂·12H₂O后,24 h脱色率达到82.3%。这一结果与KAl(SO₄)₂能够提高酶活的结论相一致。然而,据文献报道1 mmol·L⁻¹ Co²⁺、Mn²⁺、K⁺、Zn²⁺和Na⁺对灵芝(*Ganoderma lucidum*)所产漆酶脱色甲基橙均有抑制作用^[10]。因为不同属的菌株产生的漆酶结构间存在差异,内生拟盘多毛孢菌J63来自海洋,海水中存在多种无机盐,自然进化中漆酶产生了能够耐受无机盐的结构,所以当该菌株分泌的漆酶处于无机盐存在的环境中时,依然能够保持酶活性。这一特性使得该种漆酶能够有效脱色偶氮类染料,具有应用于脱色染料废水的潜能。

因为KAl(SO₄)₂·12H₂O对漆酶脱色有明显促进作用,Br⁻作为卤族元素的代表对漆酶脱色也有促进作用,所以进一步考察了不同浓度下这两种无机盐对漆酶活性及脱色甲基橙的影响,结果如图6所示。在浓度为0.5~20 mmol·L⁻¹范围内,KAl(SO₄)₂·12H₂O能够促进漆酶脱色,在14 mmol·L⁻¹时脱色率达到最大值97.3%。在对应的浓度下测定酶活,发现KAl(SO₄)₂·12H₂O对酶活的影响与对染料脱色的影响基本一致,即酶活高时脱色率高。据文献报道,10 mmol·L⁻¹ Al³⁺对粗毛栓菌(*Trametes hirsuta*)酶活没有抑制作用,但是加入Al³⁺脱色率仅达到40%,与未加Al³⁺的对照组相比没有明显提高^[11]。而内生拟盘多毛孢菌J63产生的漆酶在14 mmol·L⁻¹ Al³⁺存在的环境中对甲基橙的脱色率从64%提高到97.3%。Br⁻同样能够促进漆酶酶活并提高染料脱色率,加入3 mmol·L⁻¹ Br⁻使得甲基橙的脱色率上升至75.6%。因为海洋中Br⁻浓度约为0.84 mmol·L⁻¹,所以从海洋中分离出的内生拟盘多毛孢菌J63产生的漆酶对Br⁻具有一定的耐受性,能够在高于海洋中Br⁻浓度的环境中催化底物。

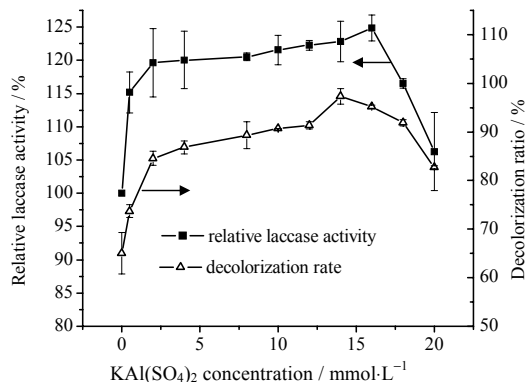


图6 不同浓度的KAl(SO₄)₂对漆酶酶活及脱色甲基橙的影响
Fig.6 Effect of different concentrations of KAl(SO₄)₂ on laccase activity and decolorization of methyl orange

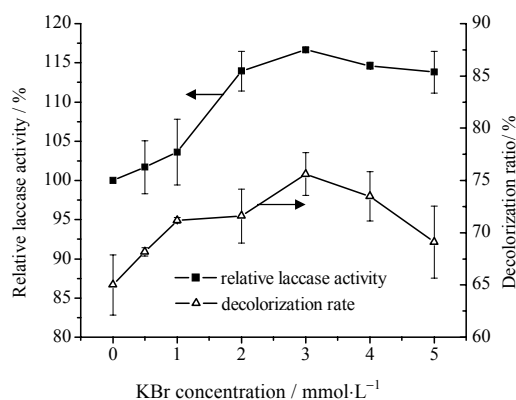


图7 不同浓度的KBr对漆酶酶活及脱色甲基橙的影响
Fig.7 Effect of different concentrations of KBr on laccase activity and decolorization of methyl orange

4 结 论

内生拟盘多毛孢菌 J63(*Pestalotiopsis* sp. J63)适宜在偏酸性条件下生长, pH 6.0、26℃产生的漆酶酶活最高, 达到 3280.6 U·L⁻¹。本文考察的 14 种无机盐在适宜浓度范围内对漆酶的产生均有促进作用。当漆酶催化底物反应时, 除 1 mmol·L⁻¹ FeSO₄·7H₂O 外, 其余无机盐均能够提高漆酶酶活及脱色偶氮类染料甲基橙的脱色率。特别是 14 mmol·L⁻¹ KAl(SO₄)₂ 和 3 mmol·L⁻¹ KBr 使脱色率分别达到 97.3%和 75.6%, 高于对照组的 64%。

参考文献:

- [1] Kudanga T, Nyanhongo G S, Guebitz G M, *et al.* Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2011, 48(3): 195-208.
- [2] Dwivedi U N, Singh P, Pandey V P, *et al.* Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases [J]. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, 2011, 68(2): 117-128
- [3] Hao J J, Song F Q, Huang F, *et al.* Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye [J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2007, 34(3): 233-240.
- [4] Baldrian P, Gabriel J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus* [J]. **Fems Microbiology Letters**, 2002, 206(1): 69-74.
- [5] Buswell J A, Cai Y J, Chang S T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) Edodes* [J]. **Fems Microbiology Letters**, 1995, 128(1): 81-87.
- [6] Naki A, Varfolomeev S D. Mechanism of the inhibition of laccase activity from *polyporus versicolor* by halide ions [J]. **Biochemistry-Moscow**, 1981, 46(9): 1344-1350.
- [7] Liu Z Y, Zhang D X, Hua Z Z, *et al.* Improvement of laccase production and its properties by low-energy ion implantation [J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2010, 33(5): 639-646.
- [8] GAO En-li (高恩丽), ZHANG Shu-jiang (张树江), XIA Li-ming (夏黎明). Laccase production by *Coriolus versicolor* fermentation and its decolorization effect on indigo blue dye (云芝菌发酵产漆酶及其对靛蓝脱色的研究) [J]. **J Chem Eng of Chinese Univ** (高校化学工程学报), 2007, 21 (1): 111-115.
- [9] Farnet A M, Gil G, Ferre E. Effects of pollutants on laccase activities of *Marasmius quercophilus*, a white-rot fungus isolated from a Mediterranean sclerophyllous litter [J]. **Chemosphere**, 2008, 70(5): 895-900.
- [10] Murugesan K, Kim Y M, Jeon J R, *et al.* Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum* [J]. **Journal of Hazardous Materials**, 2009, 168(1): 523-529.
- [11] Couto S R, Sanroman M, Guebitz G M. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta* [J]. **Chemosphere**, 2005, 58(4): 417-422.