

齿毛菌漆酶对活性亮蓝的高效脱色

江 聪¹, 尹大强², 许鑫琦², 林 娟¹, 叶秀云¹, 杨 捷^{1*}

(1.福州大学福建省海洋酶工程重点实验室, 福建 福州 350116; 2.同济大学长江水环境教育部重点实验室 200092)

摘要: 漆酶是一种含铜的多酚氧化酶, 在环境污染治理等领域具有广阔的应用前景。采用齿毛菌 (*Cerrena unicolor*) 漆酶对蒽醌染料活性亮蓝 (Remazol Reactive Brilliant Blue, RBBR) 进行催化脱色。在单因素试验的基础上, 应用中心组合设计 (Central Composite Design, CCD) 建立四因素三水平的响应面分析方法, 得到漆酶介导 RBBR 脱色的最佳脱色条件: 漆酶浓度 2.24 U/mL, 染料质量浓度 123.83 mg/L, pH 4.52, 脱色时间 38.30 min, 预测脱色率为 99.82%。RBBR 在最优脱色条件下的脱色率实际检测值为 98.42%±1.39%。影响脱色的因素主次顺序为: pH>漆酶浓度>脱色时间>染料质量浓度。红外光谱和薄层色谱分析发现漆酶处理后 RBBR 结构发生改变, 其中的 C-N 键发生断裂, 证明漆酶确实催化了 RBBR 的降解。漆酶催化脱色反应的米氏常数 K_m 值为 134.82±3.05 mg/L。本研究采用的漆酶不需要氧化还原介体就可对 RBBR 进行高效脱色, 在染料脱色和生物修复方面具有实际应用价值。

关键词: 漆酶; 蒽醌染料活性亮蓝; 脱色; 响应面法; 红外光谱; 薄层色谱

中图分类号: Q89 **文献标志码:** A

染料广泛应用于印染、化妆品、食品等行业中。据统计, 已用于商业的染料种类超过 10^5 种, 根据染料的化学结构可分为偶氮类、蒽醌类、靛类、三苯甲烷类和杂环类等。目前, 我国每年生产的染料高达上百万吨, 其中 10%~20% 的染料会直接随废水排入到环境中。染料废水具有难降解、色度高、染料结构差异大、高毒性等特点, 不仅污染环境, 并可能对人和其他生物造成致毒致癌致突变的作用。目前染料废水处理技术主要有物理法、化学法、生物法等。物理和化学法效率低、能耗大、成本高且容易形成毒性更强的副产物。相比物理和化学法, 生物法因其成本低、效率高且能避免二次污染, 越来越多地应用于染料废水的处理 [1]。

收稿日期: 2017-09-20 **录用日期:** 2018-01-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31671795); 福建省引导性项目 (2016Y0059); 海洋生物酶工程创新服务平台项目 (2014FJPT02); 福州大学贵重仪器设备开放测试基金 (2017T027)

*通信作者: T09136@fzu.edu.cn

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶，广泛分布于高等植物和真菌中。漆酶催化反应只需要氧气且最终副产物只有水，被认为是绿色催化剂。漆酶有广泛的底物催化范围，在纺织、造纸、制药、化妆品、生物修复等领域应用广泛。其中在纺织和造纸业中，漆酶被应用于染料废水的脱色。漆酶的来源是影响脱色率最重要的因素。例如 Osma^[2]等采用绒毛栓菌 (*Trametes pubescens*) 漆酶对活性亮蓝 (Remazol Reactive Brilliant Blue, RBBR) 染料脱色 42 h, 脱色率为 44%; Lu 等^[3]应用血红密孔菌 (*Pycnoporus sanguineus*) 漆酶对 RBBR 染料脱色 2 h, 脱色率为 94%。此外，介体和酶的固定化也影响漆酶的脱色效果，小分子介体可以拓宽漆酶氧化底物范围，提高脱色率。在染料脱色处理研究中，存在脱色时间长、脱色率不高的问题。若添加介体还会使成本升高，容易使漆酶失活，还可能具有毒性^[4]，这些都制约了漆酶的实际应用。因此筛选高效降解染料的菌种显得尤为重要。

RBBR 是一种蒽醌类染料，由于其着色效果好、色牢度高且可作为前体物质合成许多染料，在纺织和印染工业中应用广泛。RBBR 染料由于其有毒且难降解的性质，被认为是有机污染物的代表。实验室前期通过选育得到一株齿毛菌 (*Cerrena* sp.) HYB07 菌株，其漆酶产量高，底物范围广、催化活力强、稳定性好，最适 pH 为 3.0 (以 ABTS 为底物)，常温下反应能保持较高酶活，且对多种染料具有较好的脱色效果^[5]。本文利用齿毛菌 (*Cerrena* sp.) HYB07 漆酶对 RBBR 进行脱色，以 RBBR 染料脱色率为响应值，在单因素实验的基础上，采用响应面法优化脱色条件。通过红外光谱和薄层色谱分析，验证 RBBR 的降解。该结果可为漆酶在染料脱色中的应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 主要材料

齿毛菌 HYB07 菌株由福建省海洋酶工程重点实验室筛选保存。RBBR 和 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 购于美国 Sigma 公司，乙腈 (色谱纯)，无水乙酸钠，冰乙酸，糊精，蛋白胨，琼脂等试剂购买于国药化学试剂有限公司。

马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基按照《微生物学实验》^[6]配制。种子培养基配方与 PDA 固体培养基一样，但不添加琼脂。液体产酶培养基 (1 L)：糊精 60 g、蛋白胨 15 g、酒石酸铵 2 g、KH₂PO₄ 6.0 g、MgSO₄·7H₂O 4.2 g、CaCl₂ 0.3 g、NaCl 0.2 g、CuSO₄·5H₂O 62.5 mg、ZnSO₄·7H₂O 18.0 mg、VB₁ 15.0 mg。

1.2 方法

1.2.1 漆酶的制备

取斜面保藏的齿毛菌 HYB07 菌株接种于 PDA 平板, 30 °C 恒温培养 3~4 d。菌株活化后, 接种于液体种子培养基, 30 °C 培养 2 d, 制成一级种子液。将一级种子液以体积分数为 6% 的接种量接入到二级种子液培养基中, 30 °C 恒温培养 2 d。将二级种子液以 6% 的接种量接入液体产酶培养基中, 恒温摇瓶发酵 6 d。离心分离菌丝体和发酵液, 上清液即为粗酶液, 漆酶比活为 629.8 U/mg, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 漆酶活力测定

漆酶酶活测定^[5]采用 ABTS 为底物, 反应体系 2.0 mL, 其中含 0.975 mL 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 3.0)、1.0 mL 0.5 mol/L ABTS 溶液和 25 μL 酶液。30 °C 恒温水浴反应, 测定反应前 5 min 内 ABTS 在 420 nm ($\epsilon_{420}=36\ 000\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$) 处吸光度的增加值。以灭活的酶液作为空白对照。该反应体系下酶活定义为: 每分钟催化氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。实验均 3 组平行, 并进行均方差分析。

1.2.3 染料脱色率的测定

采用全波长酶标仪 (Multiskan GO, Thermo Scientific) 在波长 200~1 000 nm 处对 RBBR 染料溶液进行全波长扫描, 确定最大吸收波长为 574 nm。在 RBBR 染料最大吸收波长处测定脱色前后吸光度值, 计算脱色率。染料脱色率公式为:

$$R = (1 - A_1/A_0) \times 100\% \quad (1)$$

式中: R 为脱色率 (%); A_0 为脱色前染料吸光值, A_1 为脱色后染料吸光值。

1.2.4 响应面法优化介导 RBBR 的脱色

首先利用单因素实验分别对 pH (2.0~7.0)、酶浓度 (0.1~5 U/mL)、染料浓度 (50~800 mg/L)、脱色时间 (10~60 min) 进行优化。缓冲液采用甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH 2.0~3.0) 和磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 4.0~7.0)。基于单因素实验优化的结果, 采用 Design Expert v8.0.6 软件中心组合设计 (Central Composite Design, CCD) 建立四因素三水平的响应面分析方法, 确定漆酶介导 RBBR 脱色的最佳脱色条件。以脱色率为响应值, 酶浓度 (A), 染料浓度 (B), pH (C) 和脱色时间 (D) 为自变量。每个自变量均选择三个水平, 酶浓度选择 0.8, 1.5, 2.2 U/mL, 染料质量浓度选择 100, 150, 200 mg/L, pH 选择 4.0, 5.0, 6.0 (磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液), 脱色时间选择 20, 30, 40 min。

1.2.5 漆酶对 RBBR 反应动力学参数测定

配制不同质量浓度 (20~2000 mg/L) 的 RBBR 染料, 以 pH 4.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸为缓冲液, 酶浓度为 1 U/mL, 脱色 10 min 后测定脱色率, 利用 GraphPad Prism v5.0 软件进

行非线性回归分析，求漆酶反应的米氏常数 K_m 和最大速度 V_m 。实验进行 3 次重复。

1.2.6 红外光谱分析

将在最优条件下脱色的 RBBR 混合液样品和加入灭活漆酶处理的 RBBR 样品进行冷冻干燥，取 2 mg 冷冻干燥后的固体，加入 200 mg 溴化钾 (KBr) 混匀，在玛瑙研钵中研磨、压片。用傅立叶红外光谱仪 (360 智能型，美国尼高丽仪器有限公司) 先对纯 KBr 薄片进行背景扫描，而后对样品的薄片进行扫描，得到的红外光谱图。比较红外光谱图可知 RBBR 漆酶脱色处理后化学键断裂情况。

1.2.7 薄层色谱分析

在硅胶薄层层析点样板上，将在最优条件下脱色的 RBBR 混合液样品和加入灭活漆酶处理 RBBR 样品进行上样。在扩展槽内加入适量展样剂，放入硅胶点样板，加盖密封展样。展样剂体积比为正丁醇：乙酸：水=3：1：1。当样品完全展开后，取出晾干，放入装有碘晶体的密闭容器中显影，以判断 RBBR 脱色处理后是否产生了新物质。

2 结果与讨论

2.1 基于响应面法的脱色条件优化

通过单因素优化实验，得到齿毛菌 HYB07 漆酶对 RBBR 脱色的最佳条件为 pH 5.0，酶浓度 3 U/mL，染料浓度 100 mg/L，脱色时间 30 min。温度对酶的催化活性也有较大影响，但前期实验发现该漆酶在室温下保持了较好的催化活性，故在本研究未对温度进行优化。在单因素实验基础上，采用 Design-Expert V 8.0.6 软件用 -1, 0, 1 对酶浓度、染料浓度、pH 和脱色时间这 4 个因素编码，脱色率 Y (%) 为响应值，通过中心组合设计对四个因素优化，对试验结果进行多元回归拟合，得到脱色率的回归模型方程为：

$$Y=86.10+12.90X_1-2.54X_2-13.49X_3+7.40X_4+0.63X_1X_2+0.83X_1X_3+1.46X_1X_4+3.81X_2X_3+1.16X_2X_4+1.26X_3X_4-6.34X_1^2-2.63X_2^2-14.13X_3^2-4.66X_4^2。$$

回归方程的方差分析结果见表 1。回归模型的 F 值为 41.04， p 值小于 0.0001，表明所得模型极显著。模型误差失拟项中 $p = 0.1438 > 0.05$ ，该模型失拟不显著，说明该二次方程能够较好地拟合真实水平，可靠性较高。模型一次项中 A、C、D 极显著；BC 交互项显著；二次项 A^2 、 C^2 、 D^2 极显著， B^2 显著。模型的决定系数和校正决定系数分别为 95.81% 和 92.04%，说明该模型精确性较高。因此该模型可用于 RBBR 脱色率的预测。

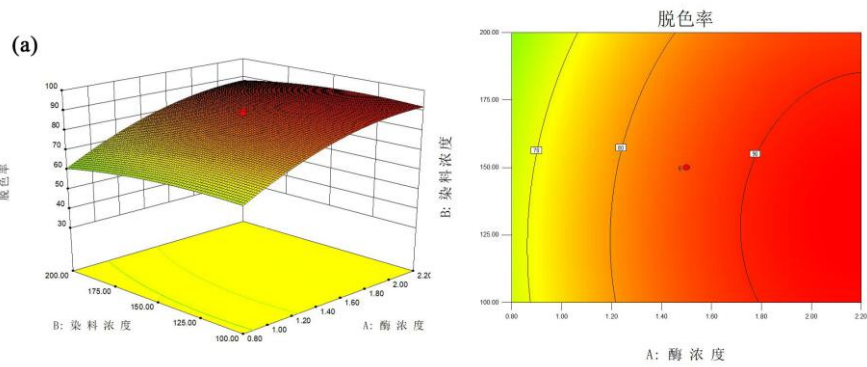
表 1 模型回归方程方差分析

Tab. 1 ANOVA of the regression equation

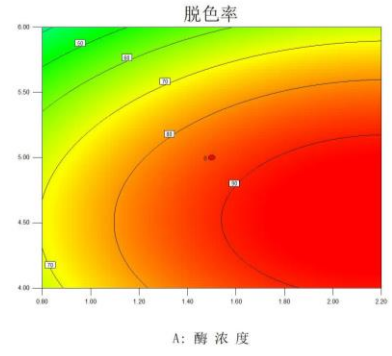
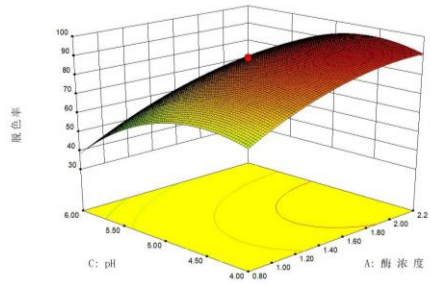
方差来源	平方和	自由度	均方和	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性水平
模型	16287.37	14	1163.38	41.04	< 0.0001	***
A	3991.38	1	3991.38	140.82	< 0.0001	***
B	155.19	1	155.19	5.48	0.0335	*
C	4369.42	1	4369.42	154.16	< 0.0001	***
D	1313.63	1	1313.63	46.35	< 0.0001	***
AB	6.34	1	6.34	0.23	0.6407	
AC	11.13	1	11.13	0.39	0.5403	
AD	33.95	1	33.95	1.20	0.2910	
BC	232.52	1	232.52	8.20	0.0118	*
BD	21.60	1	21.60	0.76	0.3965	
CD	25.27	1	25.27	0.89	0.3601	
A ²	1102.23	1	1102.23	38.89	< 0.0001	***
B ²	189.68	1	189.68	6.69	0.0206	*
C ²	5478.19	1	5478.19	193.27	< 0.0001	***
D ²	595.05	1	595.05	20.99	0.0004	***
残差	425.16	15	28.34			
失拟	358.36	10	35.84	2.68	0.1438	
净误差	66.80	5	13.36			
总和	16712.53	29				

注：****P*<0.001，极显著；**P*<0.05，显著。

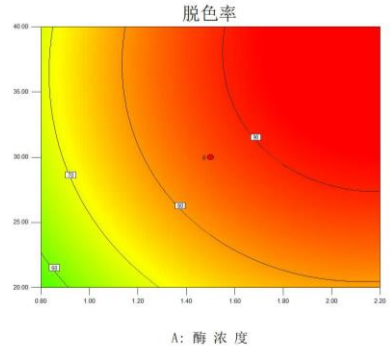
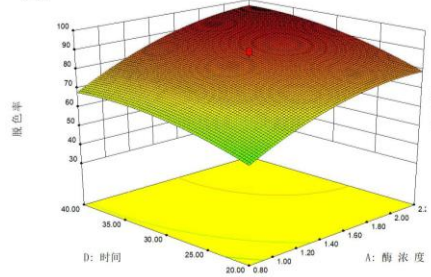
各因素的*F*值可以用来评价该因素对试验指标影响的显著程度。*F*值越大，表示该因素的影响越显著。由表3可知， $F(X_1)=140.82$ ， $F(X_2)=5.48$ ， $F(X_3)=154.16$ ， $F(X_4)=46.35$ ，由此综合分析可知，在所选取的因素水平范围内，各因素对脱色率的影响由大到小依次为：pH>酶浓度>脱色时间>染料质量浓度。根据二次回归方程绘制响应面图，从响应面图上可得到最佳参数及各参数间的相互作用。



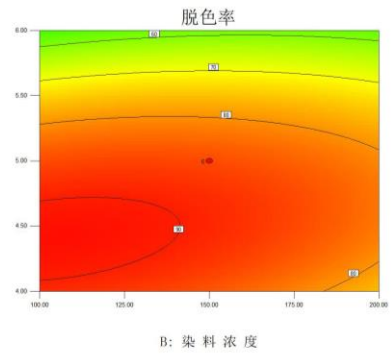
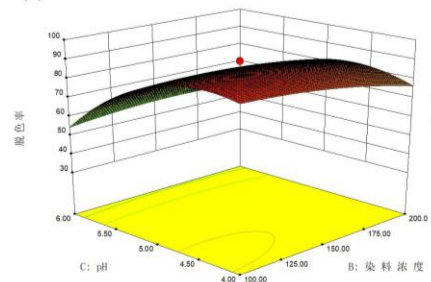
(b)



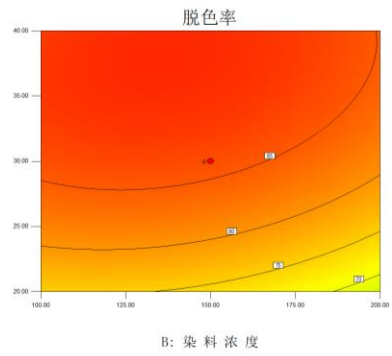
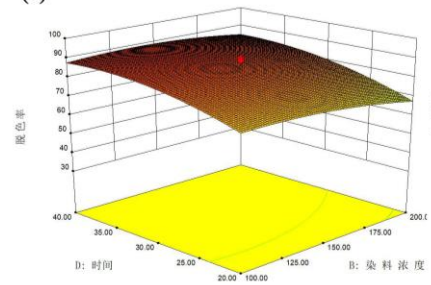
(c)



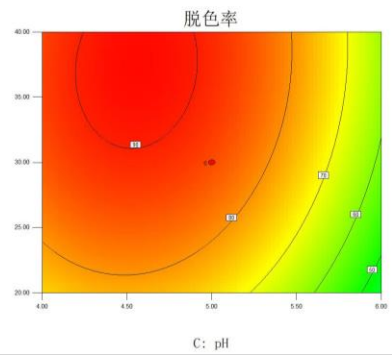
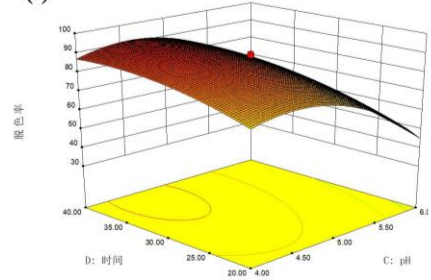
(d)



(e)



(f)



(a) 酶浓度和染料质量浓度; (b) 酶浓度和 pH; (c) 酶浓度和时间; (d) 染料质量浓度和 pH; (e) 染料质量浓度和时间; (f) pH 和时间。

图 1 不同因素交互作用对 RBBR 脱色率影响的响应面及等高线

Fig.1 Response surface and contour plot of the effect of different factors on RBBR decolorization

响应面曲线可用于解释变量间的交互作用并确定达到最高脱色率时每个变量的最优水平。响应面曲面的坡度可反映了该因素对 RBBR 脱色率影响的强弱程度。每个响应面代表当其中一个变量处于最佳水平时,另外 2 个独立变量之间的相互作用。等高线图中同一椭圆曲线上染料的脱色率是相同的,染料脱色率在椭圆形的中心值最高,并由中心向边缘逐渐降低。同时等高线的形状可以反映交互效应的强弱大小,椭圆形表示两因素交互作用显著,圆形表示交互作用不显著。本实验选定 4 个主要因素,优化可以得到每两个因素之间交互的 6 个响应面及相应的等高线图,如图 1 所示。

由图 1(a)和(b)可知,在选定的 pH 和染料浓度范围内,RBBR 脱色率呈现先高后低的趋势,存在极大值,RBBR 脱色率随酶浓度的增加而增大。同时由等高线可知,pH 的等高线变化趋势较酶浓度和染料浓度陡峭,因此可以推测出 pH 对 RBBR 脱色率的影响比酶浓度和染料浓度大。图 1(a)酶浓度与染料浓度的等高线近似于圆形,表明酶浓度与染料浓度的交互效应不明显。同时由图 1(d)可以看出,染料浓度与 pH 的等高线呈椭圆形,且中心点角度大,表明两因素间的交互效应显著。综上分析,4 种因素的主效应关系为 pH>酶浓度>脱色时间>染料浓度。

2.2 RBBR 最佳脱色条件及检验

分析得到最大响应值时,A、B、C、D 对应的编码值分别为 1.055, 0.523, -0.480, 0.830, 与其相对应的脱色条件为:酶浓度 2.24 U/mL,染料浓度 123.83 mg/L, pH 4.52, 脱色时间 38.30 min, 预测最优脱色率达 99.82%。为检验响应面法的可靠性,采用上述最佳脱色条件进行试验。考虑到实际操作条件,将最佳脱色条件修正为酶浓度 2.20 U/mL,染料浓度 124.00 mg/L, pH 4.50, 脱色时间 38.00 min,在此条件下进行 3 次验证性试验,得到平均脱色率为 98.42%±1.39%,与理论预测值差异不显著,说明用响应面优化漆酶介导 RBBR 的脱色具有可行性。

国内外报道的应用漆酶对 RBBR 的脱色效果对比见表 2。目前在报道的漆酶对 RBBR 的脱色降解研究中,降解体系大致分为酶、酶-介体(Laccase-mediator system, LMS)、固定化酶几种。在酶-介体的处理中,Sathishkumar^[7]等应用 *Pleurotus florida* 漆酶对 RBBR 染料

脱色, 添加介体 1-羟基苯并三唑 (HBT) 处理的脱色率是纯酶处理的 1.56 倍。同样, Soares^[8] 等研究表明, 采用的商业漆酶只有添加介体, 才能对 RBBR 脱色。在不添加介体的报道中, Mechichi^[9] 等研究认为添加 0.1 mmol/L 的 HBT 并不能提高毛栓菌 (*Trametes trogii*) 漆酶对 RBBR 染料的脱色率。Khlifi^[10] 等报道认为漆酶可以单独氧化 RBBR 染料, 而并不需要介体。在固定化酶处理中, Kunamneni^[12] 等采用的嗜热丝孢杆菌 (*Myceliophthom thermophila*) 漆酶, 在固定化和添加 HBT 的情况下, 24 h 脱色率为 31%。综合表 4 中的数据可知, 虽然添加介体能提高脱色率, 但存在增加成本和可能有毒性等弊端。而不添加介体的处理, 脱色时间普遍过长。因此, 菌的来源是影响漆酶对染料脱色最重要的因素, 因此筛选一株高效脱色的漆酶尤为重要。本实验采用的齿毛菌漆酶对 RBBR 染料脱色 38 min, 脱色率达到 98.42%±1.39%, 脱色效率比已有报道更佳。

表 2 产漆酶的不同菌种对 RBBR 降解特性对比
Tab. 2 The degradation characteristic of RBBR by laccase from different strains

菌种	RBBR 质量浓度 / (mg·L ⁻¹)	酶量 /U	介体	固定化	脱色时间/h	脱色率 /%	文献
<i>P. florida</i>	53	9.3	HBT	否	0.1	82	[7]
CLF(商业漆酶)	20	3	VA	否	0.3	90	[8]
<i>G. lucidum</i>	50	25	HBT	否	2	92	[11]
<i>M. thermophila</i>	200	20	HBT	是	24	31	[12]
<i>P. pastoris</i> SMD 1168H	100	50	ACE	否	2	78	[13]
<i>F. lignosus</i>	25	0.9	VA	否	6	100	[14]
<i>T. trogii</i> *	200	0.4	无	否	1	72	[12]
<i>P. acaciicola</i> LA 1	100	500	无	否	4	90	[15]
<i>P. sanguineus</i>	100	25	无	否	2	94	[3]
<i>T. versicolor</i>	63	6	无	否	4	75.8	[16]
<i>T. pubescens</i>	133	0.5	无	是	42	44	[2]
<i>P. ostreatus</i> 3.42	100	30	无	否	12	70	[17]
<i>C. unicolor</i>	123	8.8	无	否	0.6	98	本研究

注: *酶活测定底物为 DMP (2,6-二甲氧基酚), 表中其余酶活测定底物均为 ABTS。HBT (1-羟基苯并三唑), VA (紫脲酸), ACE (乙酰丁香酮)。

2.3 RBBR 反应动力学参数分析

如图 2 所示, 在 RBBR 质量浓度 0~200 mg/L 范围内, 反应速率呈线性上升, 随着底物浓度的增加, 反应速率增势变缓, 并逐渐趋于平缓。这种变化趋势, 符合米氏方程描述的反应速率随底物浓度的变化规律。

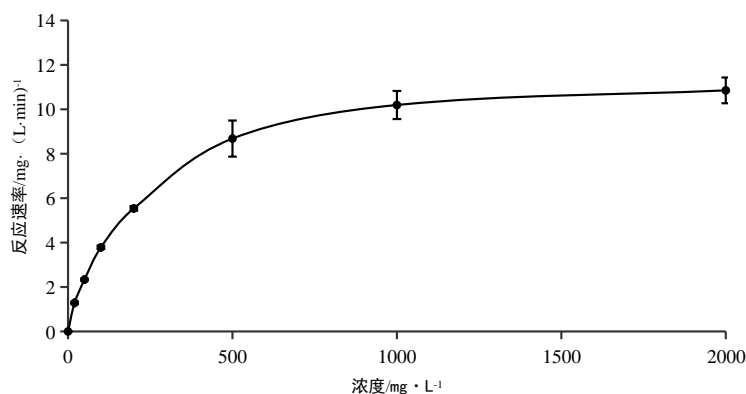


图 2 漆酶反应动力学

Fig.2 The kinetics of laccase reaction

通过 GraphPad Prism 软件求得漆酶对 RBBR 染料的脱色反应的 K_m 为 134.82 ± 3.05 mg/L, V_m 为 9.68 ± 0.85 mg/L/min; 反应动力学方程为 $Y=9.68X/(134.82+X)$, X 为底物浓度, Y 为反应速率。 K_m 是酶特征常数之一, 反应酶对底物亲和力的大小。*Pleulorotus florida* 漆酶对 RBBR 脱色的 K_m 值为 145.82 mg/L, 其 K_m 值高于本研究, 并且添加介体才能达到较高的脱色率。相比而言, 本研究采用的齿毛菌漆酶不需要添加介体, 也有接近 100% 的脱色效率, 进一步证明了该漆酶运用于 RBBR 染料脱色的实际价值。

2.4 RBBR 降解产物分析

图 3 为 RBBR 染料脱色前后的紫外-可见光谱。由图可知, 脱色前 RBBR 在可见光区 574 nm 处有一个明显的特征吸收峰, 而在加入漆酶脱色处理后, 此处的吸收峰消失, 表明齿毛菌漆酶能够氧化降解染料 RBBR。戴文魁^[1]曾报道杂色云芝菌 (*Coriolus versicolor* LZ-8) 漆酶降解 RBBR 的实验结果, 在处理前后对比中发现 400~700 nm 内特征峰消失。

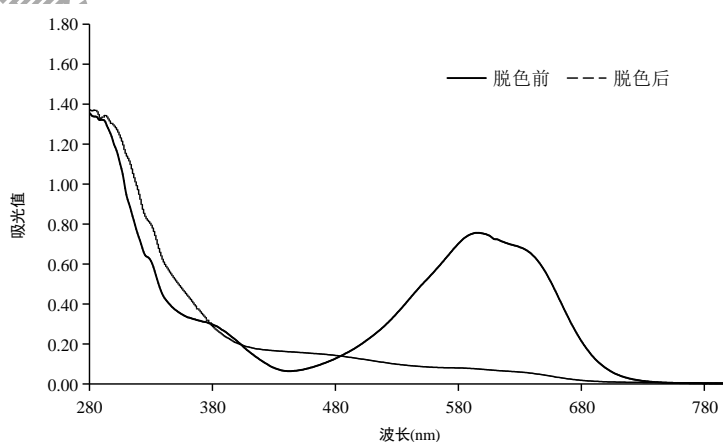
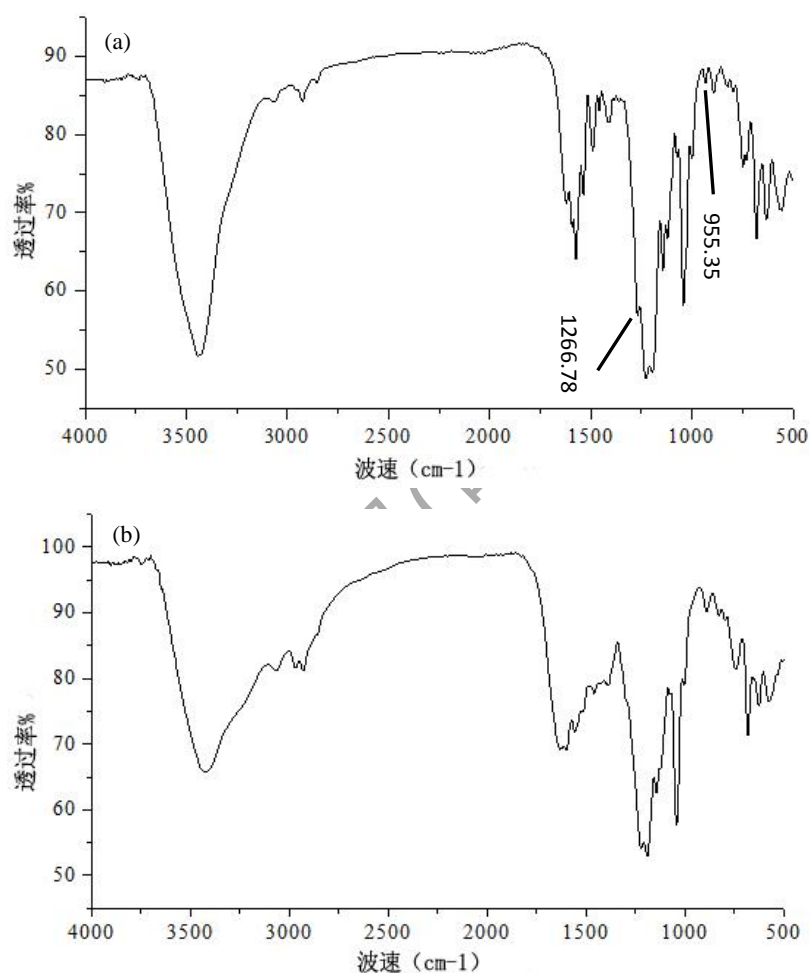


图 3 RBBR 脱色前后的 UV-visible 全波长扫描图

Fig.3 UV-visible spectra of RBBR before and after treatment with laccase

利用红外光谱分析波数范围在 $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ 内的 RBBR 脱色前及经漆酶脱色后的产物，对比 RBBR 脱色前和脱色后红外光谱图（图 4）可知，脱色后 955.35 和 1266.78 cm^{-1} 吸收峰消失。该峰是 C-N 的伸缩振动峰，脱色后 C-N 键断裂，说明 RBBR 经漆酶处理后结构发生变化，并且该键的断裂造成发色基团被破坏，使 RBBR 从蓝色变成无色。Osma^[2]等采用绒毛栓菌 (*Trametes pubescens*) 漆酶对 RBBR 染料处理后发现，C-N 键断裂，发色基团被破坏，形成两个副产物，这与本实验结果相一致。



(a) RBBR 脱色前; (b) RBBR 脱色后。

图 4 RBBR 脱色前后的红外光谱图

Fig.4 The FT-IR spectra of RBBR before and after treatment with laccase

通过薄层色谱进一步验证 RBBR 经漆酶处理后的结构发生了变化。将 RBBR 脱色前后样品进行薄层色谱分离后发现，脱色后产生一个新的条带（图 5），也证明了 RBBR 经漆酶处理后结构发生了改变。

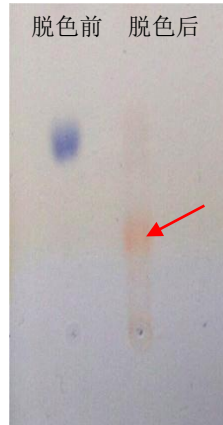


图 5 RBBR 脱色前后的薄层色谱图

Fig.5 The thin layer chromatography of RBBR before and after treatment with laccase

3 结 论

本研究通过响应面分析建立了齿毛菌漆酶介导 RBBR 脱色条件的二次项数学模型，得出影响脱色的因素主次顺序为 pH>酶浓度>脱色时间>染料质量浓度，得到最佳脱色条件为：酶浓度 2.24 U/mL，RBBR 染料质量浓度 123.83 mg/L，pH 4.52，脱色时间 38.30 min。在此条件下，进行三次验证性实验，测得的脱色率为 $98.42\% \pm 1.39\%$ 。通过红外光谱和薄层色谱分析，发现 RBBR 经齿毛菌漆酶处理后 C-N 键发生断裂，RBBR 结构发生变化。以 RBBR 为底物，齿毛菌漆酶催化脱色反应的米氏常数 K_m 值为 134.82 ± 3.05 mg/L。本研究选育的白腐真菌齿毛菌漆酶在未添加介体的情况下，脱色效果明显高于已有的文献报道，因此在染料降解方面具有较大的应用潜力。

参考文献：

- [1] 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]. 济南: 山东大学, 2008:44.
- [2] OSMA J F, TOCAHERRERA J L, RODRÍGUEZCOUTO S. Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase.[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(22):8509-8514.
- [3] LU L, ZHAO M, ZHANG B B, et al. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme.[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2007, 74(6):1232.
- [4] YANG J, LI W, NG T B, et al. Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 832.
- [5] YANG J, LIN Q, NG T B, et al. Purification and characterization of a novel laccase from *Cerrena* sp. HYB07

-
- with dye decolorizing ability[J]. PLoS One, 2014, 9(10):e110834.
- [6] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [7] SATHISHKUMAR P, BALAN K, PALVANNAN T, et al. Efficiency of *Pleurotus florida*, laccase on decolorization and detoxification of the reactive dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR) under optimized conditions[J]. Clean-Soil Air Water, 2013, 41(7):665-672.
- [8] SOARES G M B, AMORIM M T P D, COSTA-FERREIRA M. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 89(2/3):123-129.
- [9] MECHICHI T, MHIRI N, SAYADI S. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*[J]. Chemosphere, 2006, 64(6):998-1005.
- [10] RIM KHLIFI, SAYADI S, BELBAHRI L, et al. Effect of HBT on the stability of laccase during the decolourization of textile wastewaters[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2010, 84(12):1828-1833.
- [11] MURUGESAN K, NAM I H, KIM Y M, et al. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum*, in solid state culture[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2007, 40(7):1662-1672.
- [12] KUNAMNENI A, GHAZI I, CAMARERO S, et al. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(2):169-178.
- [13] 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.
- [14] HU M R, CHAO Y G, XUE Z Q, et al. Laccase-mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(1):45-51.
- [15] ADAK A, TIWARI R, SINGH S, et al. Laccase production by a novel white-rot fungus *Pseudolagarobasidium acaciicola*, LA 1 through solid-state fermentation of parthenium, biomass and its application in dyes decolorization[J]. Waste & Biomass Valorization, 2016(6):1-9.
- [16] LE T T, MURUGESAN K, LEE C S, et al. Degradation of synthetic pollutants in real wastewater using laccase encapsulated in core-shell magnetic copper alginate beads[J]. Bioresource Technology, 2016, 216:203-210.
- [17] 侯红漫, 周集体, 王竟, 等. 白腐菌糙皮侧尔漆酶性质及其对蒽醌染料脱色性能的研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(1):48-52.

Efficient Decolorization of Remazol Reactive Brilliant Blue by *Cerrena* sp. Laccase

JIANG Cong¹, YIN Daqiang², XU Xinqi², LIN Juan¹, YE Xiuyun¹,
YANG Jie^{1*}

(1. Fujian Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, 350116, China; 2. Yangtze River Water Environment Key Laboratory of The Ministry of Education, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Laccases comprise a family of copper-containing polyphenol oxidases and have wide applications in bioremediation. In this study, catalytic decolorization of Remazol Reactive Brilliant Blue (RBBR) by *Cerrena* sp. laccase was investigated. Based on the single factor experiments, the Central Composite Design (CCD) was used to establish the four-factor three-level response surface analysis model, and the optimum conditions of laccase-mediated RBBR decolorization were as follows: 2.24 U/mL laccase, 123.83 mg/L RBBR, pH 4.52, and 38.30 min. The predicted and observed decolorization rates were 99.82% and 98.42%±1.39%, respectively, under the optimal conditions. Influences of the factors on the decolorization efficiency were: pH > laccase concentration > decolorization time > dye concentration. FTIR and TLC analyses showed that the structure of RBBR was changed by the laccase. Specifically, the C-N bond in RBBR was broken upon laccase treatment, corroborating that the laccase catalyzed RBBR degradation. The *K_m* value of laccase towards RBBR was 134.82±3.05 mg/L, as indicated by the kinetic study. *Cerrena* sp. laccase efficiently decolorized RBBR in the absence of a redox mediator and showed promise in dye decolorization and bioremediation.

Key words: laccase; RBBR; decolorization; response surface method; infrared spectroscopy; thin layer chromatography