

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250110008

引用格式: 王婧涵, 庞立, 田红, 等. 可降解磺胺嘧啶的重组细菌漆酶诱导表达和酶学性质研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(6): 232–238.

WANG JH, PANG L, TIAN H, *et al.* Induced expression and enzymatic properties of recombinant bacterial laccase degrading sulfadiazine [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(6): 232–238. (in Chinese with English abstract).

# 可降解磺胺嘧啶的重组细菌漆酶诱导表达和酶学性质研究

王婧涵<sup>1</sup>, 庞立<sup>2</sup>, 田红<sup>1</sup>, 詹依雅<sup>1</sup>, 易永真<sup>1</sup>, 夏菠<sup>1\*</sup>, 刘霞<sup>1\*</sup>

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 长沙 410128; 2. 湖南农业大学园艺学院, 长沙 410128)

**摘要: 目的** 探究重组细菌漆酶诱导表达水平及酶学特性, 提高细菌漆酶对磺胺嘧啶抗生素的降解效率。

**方法** 本研究通过单因素实验探讨了诱导温度、诱导时间以及异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)浓度对酶表达量的影响。并通过 pH 和温度两方面对重组细菌漆酶的酶学性质进行探究。**结果** 24 h 重组细菌漆酶对磺胺嘧啶的降解率达 50%。重组细菌漆酶在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的最适表达条件为: 诱导温度 16 °C, 诱导时间 16 h, IPTG 浓度 0.2 mmol/L。最适 pH 为 3, 在 pH 为 7 时, 稳定性最好, 6 h 酶活达到 150%; 最适温度为 80 °C, 在温度为 70 °C 时热稳定性最好, 1 h 提高到 120%, 半衰期约为 6 h。**结论** 本研究为细菌漆酶在磺胺嘧啶抗生素降解中的应用提供了实验基础, 并为未来研究其在工业中的潜在应用奠定了理论依据。

**关键词:** 细菌漆酶; 磺胺嘧啶; 抗生素降解; 异源表达; 酶学性质; 蛋白浓度

## Induced expression and enzymatic properties of recombinant bacterial laccase degrading sulfadiazine

WANG Jing-Han<sup>1</sup>, PANG Li<sup>2</sup>, TIAN Hong<sup>1</sup>, ZHAN Yi-Ya<sup>1</sup>, YI Yong-Zhen<sup>1</sup>,  
XIA Bo<sup>1\*</sup>, LIU Xia<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;  
2. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the induced expression level and enzymatic properties of recombinant bacterial laccase and to improve the degradation efficiency of sulfadiazine antibiotics by bacterial laccase. **Methods** In this study, the effects of induction temperature, induction time, and concentration of isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) on enzyme expression were investigated by one-way experiments. The enzymatic properties of recombinant bacterial laccase were also investigated by both pH and temperature. **Results** The

收稿日期: 2025-01-10

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30299, 2022JJ30290)

第一作者: 王婧涵(1997—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为生物降解。E-mail: 925811357@qq.com

\*通信作者: 夏菠(1980—), 男, 副教授, 博士, 主要研究方向为生物转化与生物降解。E-mail: julinomber2@sina.com

刘霞(1976—), 女, 教授, 博士, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: liuxiaspr@aliyun.com

degradation of sulfadiazine by recombinant bacterial laccase at 24 h was 50%. The optimal conditions for the expression of recombinant bacterial laccase in *Escherichia coli* BL21 (DE3) were as follows: Induction temperature of 16 °C, induction time of 16 h, and IPTG concentration of 0.2 mmol/L. The optimal pH was 3, and the stability was best at pH 7, with the enzyme activity reaching 150% in 6 h. The optimal temperature was 80 °C, and the thermal stability was best at 70 °C, with the enzyme activity increasing to 120% in 1 h. The half-life was about 6 h.

**Conclusion** This study provides an experimental basis for the application of bacterial laccase in the degradation of sulfadiazine antibiotics and lays down a theoretical basis for the future study of its potential application in the industry.

**KEY WORDS:** bacterial laccase; sulfadiazine; antibiotic degradation; heterologous expression; enzymatic properties; protein concentration

## 0 引 言

磺胺类抗生素(sulfonamide antibiotics, SAs)是一种广谱抑菌剂,可以阻断四氢叶酸的合成,从而抑制细菌蛋白质生长而起到抗菌的作用。磺胺嘧啶在人体和动物医学中有广泛的应用,因而在土壤和水生生态系统中普遍存在,且半衰期较长。磺胺类抗生素可能增加病原菌的耐药性,加速抗生素耐药性的传播,导致更高的人类发病率感染与死亡率<sup>[1]</sup>。磺胺类抗生素的降解方法分为非生物降解和生物降解。非生物降解需要额外的装置和能量,产生更高的费用。生物降解大多是微生物降解,单独使用微生物降解,在后期菌株对反应环境的影响和菌株的培养与鉴定都存在许多不确定因素。而使用特定的酶法降解磺胺类抗生素,是一种清洁且高效的方法。并且酶相较于微生物更易控制和分离,通过固定化酶等方法可以应用于食品中。

漆酶(EC 1.10.3.2),是一种含铜的多酚氧化酶,能够氧化多种酚类和非酚类化合物,同时伴随 4 个氢质子转移,将氧分子转化为水<sup>[2]</sup>。是一种对环境友好的“绿色酶”,广泛存在于真菌<sup>[3]</sup>、细菌<sup>[4]</sup>和植物<sup>[5]</sup>中,漆酶在很多方面都有应用,如染料的脱色<sup>[6]</sup>、生物传感器<sup>[7]</sup>、废水处理<sup>[8-9]</sup>、纺织品<sup>[10]</sup>、食品工业<sup>[11]</sup>、造纸和纸浆生产<sup>[12]</sup>、化妆品<sup>[13]</sup>和油漆<sup>[14]</sup>。漆酶分为真菌漆酶和细菌漆酶,真菌漆酶生产时间较长、成本较高,并且在高温、高碱和高盐条件下不稳定<sup>[15]</sup>。而细菌漆酶可以在很大程度上弥补真菌漆酶的各种缺点。近年来对细菌漆酶的研究和应用迅速增长<sup>[16]</sup>。部分细菌漆酶可以在高温条件下保留较高的酶活性。细菌漆酶在中性和碱性条件下稳定,对抑制剂的敏感性较低,对金属离子的依赖性较低,并易于异源表达。异源表达可以提供更高的酶产率,并且可以允许产生具有用于工业应用的期望性质的漆酶<sup>[17]</sup>。不同的宿主包括大肠杆菌、巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母等已被普遍用作重组漆酶表达的宿主生物<sup>[18]</sup>。基于细菌漆酶容易进行异源表达,能通过异源表达提高细菌漆酶的产量和纯度,进行成本更为有效的生产、提高工业价值。因此选择合适的诱导方法尤为关键。

本研究使用来自死谷芽孢杆菌 *Bacillus vallismortis*

fmb-103 的细菌漆酶,通过之前的研究得出该细菌漆酶可以在大肠杆菌中异源表达,并且有较好的耐热性,具有降解孔雀蓝、磺胺嘧啶的能力,有很好的研究前景。故对酶学特性进一步挖掘。将可降解磺胺嘧啶的重组细菌漆酶质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达,并系统优化诱导条件,包括诱导温度、诱导时间及异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)浓度,以期提高重组细菌漆酶蛋白的表达水平。与此同时,研究还通过探讨 pH 和温度对重组细菌漆酶酶学性质的影响,分析其最适反应条件及稳定性。以期为细菌漆酶降解磺胺嘧啶在工业生产中的应用奠定重要的理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

选择 *Bacillus vallismortis* fmb-103 的漆酶进行后续研究, GeneBank: KC859464.1, 并用 SDIa 代表; pGBTNH2-SDIa 质粒(深圳市博奥康生物科技有限公司); 感受态大肠杆菌(BL21)、IPTG(质量浓度 50 mg/mL)、氨苄青霉素(质量浓度 50  $\mu$ g/mL)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]; His 标签纯化试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 [2,2-diazo-bis(3-ethyl-benzothiazole-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS](分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司); 磺胺嘧啶[分析纯,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司]。

### 1.2 仪器与设备

Bio-Photometer 紫外可见光分光光度计(上海艾本德国际贸易有限公司); JY96-IIN 超声破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); ZNCL-B 智能磁力搅拌器(河南佰年仪器有限公司); 赛默飞 Vanquish Core 液相色谱仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细菌漆酶重组质粒的转化和诱导表达

将含有细胞漆酶基因的克隆质粒物热激至大肠杆菌 BL21(DE3)表达菌株中,涂布于含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素

抗性的 LB 平板上。挑取阳性菌落送往上海生工生物工程股份有限公司进行测序。测序正确的菌液,按 3% (V/V)加入含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基,将混合物在 37  $^{\circ}\text{C}$  下旋转振荡孵育。当细胞达到指数生长期 ( $\text{OD}_{600}=0.6\sim 0.8$ ),加入 0.1 mmol/L IPTG 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  诱导产酶,16  $^{\circ}\text{C}$  孵育 16 h。

### 1.3.2 重组细菌漆酶粗酶液的获取与蛋白纯化

吸取 10 mL 的大肠杆菌 BL21(DE3)菌液于 6000 r/min 离心 10 min,收集菌体。加入等体积细菌蛋白制备裂解液,冰浴条件下超声波破碎 20 min。将裂解液于 12000 r/min 离心 10 min,收集上清液即为可溶性蛋白并用于蛋白纯化。粗酶液采用 His 标签纯化试剂盒进行,在重组漆酶破碎粗酶液中加入已平衡的 50% BeyoGold™ His-tag 纯化树脂,混匀后在冰浴环境下缓慢摇动 60 min,使 His 标签重组蛋白与镍柱充分结合。用非变性洗脱液洗柱 5 次,并收集洗脱液至离心管中。对得到的各组分收集液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳检测<sup>[19-20]</sup>。

### 1.3.3 重组细菌漆酶对磺胺嘧啶抗生素的降解效果

将 1.5 mg/L 的重组细菌漆酶酶液添加至终质量浓度为 1 mg/L 的磺胺嘧啶体系中,在 30  $^{\circ}\text{C}$  反应 24 h,取 1 mL 反应产物过膜装样,进行液相色谱检测。

### 1.3.4 SDS-PAGE 电泳分析

将蛋白质样品和上样缓冲液按 4:1 (V/V)混合,置于 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热 10 min。按配方制备 10% 分离胶、4% 浓缩胶,观察洗脱蛋白的分子质量大小和纯度。

### 1.3.5 重组漆酶 SDIa 诱导表达的条件优化

#### (1) 诱导温度对重组细菌漆酶表达量的影响

在 20 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养重组菌株,同 1.3.1,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 12、16、28、37、42  $^{\circ}\text{C}$  以 100 r/min 分别诱导 16 h,取 10  $\mu\text{L}$  菌液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

#### (2) 诱导时间对重组细菌漆酶表达量的影响

在 20 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养重组菌株,同 1.3.1,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 16  $^{\circ}\text{C}$  以 100 r/min 分别诱导 4、8、12、16、20、24 h,取 10  $\mu\text{L}$  菌液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

#### (3) IPTG 浓度对重组细菌漆酶表达量的影响

在 20 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养重组菌株,同 1.3.1,加入终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG 于 16  $^{\circ}\text{C}$  以 100 r/min 分别诱导 16 h,取 10  $\mu\text{L}$  菌液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

### 1.3.6 重组漆酶 SDIa 的酶学性质

#### (1) 酶活力测定

以 ABTS 为底物,反应体系总体积 3 mL,包括 2.45 mL

0.1 mol/L pH 5 醋酸钠缓冲液、0.5 mL 6 mmol/L ABTS 及 50  $\mu\text{L}$  酶液,45  $^{\circ}\text{C}$  反应 3 min,在 420 nm 吸光值 OD 的增量<sup>[20]</sup>,以水替换酶液做为对照。以每分钟内生成 1  $\mu\text{mol}$  反应物所需的酶量为一个酶活力单位。实验重复 3 次,取平均值。漆酶酶活计算公式见(1)。

$$\text{漆酶酶活}(U)=\frac{V_{\text{总}}\times\Delta\text{OD}\times\text{酶液稀释倍数}}{V_{\text{酶}}\times\varepsilon\times\Delta t\times 10^{-6}} \quad (1)$$

式中:  $V_{\text{总}}$  为反应总体系的体积, mL;  $V_{\text{酶}}$  为反应体系中酶的体积, mL;  $\Delta\text{OD}$  为反应时间 OD 值的变化;  $\Delta t$  为反应时间, min;  $\varepsilon=36000$  M/cm。

#### (2) 最适 pH 及 pH 稳定性

分别加入 pH 为 2~8 的醋酸钠缓冲液,再加入 50  $\mu\text{L}$  重组漆酶酶液,在 45  $^{\circ}\text{C}$  反应 3 min,在 420 nm 下测定吸光值,根据上述方法计算酶活。在 4  $^{\circ}\text{C}$  下将漆酶在 pH (2、3、7) 下孵育 6 h,每隔 1 h 取样,迅速冰浴,以初始时酶活定为 100%,以残余酶活百分比表示测定结果,使用 ABTS 作为底物测量残余活性。以 pH 为横坐标,相对酶活力为纵坐标作图,得到重组漆酶的最适 pH 和 pH 稳定性。

#### (3) 最适温度及温度稳定性

将加入 ABTS 底物的缓冲液(pH 3)分别在 30~90  $^{\circ}\text{C}$  水浴中孵育 10 min,准确加入 50  $\mu\text{L}$  重组漆酶酶液,分别在以上各个温度条件下反应 3 min,在 420 nm 下测定吸光值,根据上述方法计算酶活。将酶溶液放置在 70、80、90  $^{\circ}\text{C}$  水浴中保温 6 h,每隔 1 h 取样,迅速冰浴,在所有实验组保温结束后使用 ABTS 作为底物测量残余活性,以初始时酶活定为 100%,以残余酶活百分比表示测定结果。以温度为横坐标,相对酶活力为纵坐标作图,得到重组漆酶的最适温度和温度稳定性。

### 1.3.7 液相色谱仪器条件

色谱柱为 Kromasil 100-5-C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm),流动相为 0.1% 甲酸水:乙腈(70:30, V/V),流速为 1.0 mL/min,波长为 265 nm,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。

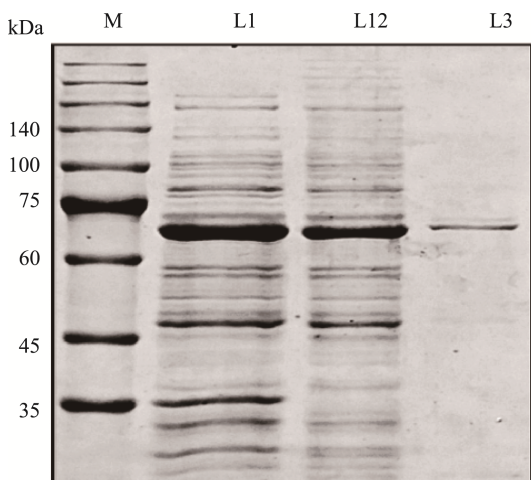
## 1.4 数据处理

所有实验均重复进行 3 次,以确保结果的可靠性和可重复性。实验数据通过使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行详细的统计学分析,并可视化数据结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组细菌漆酶的诱导表达及分离纯化

如图 1 SDS-PAGE 分析的粗酶液结果所示,在 65 kDa 处出现了特征条带。而且在诱导表达前无 SDIa 相对应的条带,并在诱导后的上清液中观察到目标蛋白的条带,表明重组工程菌成功可溶性表达了细菌漆酶。

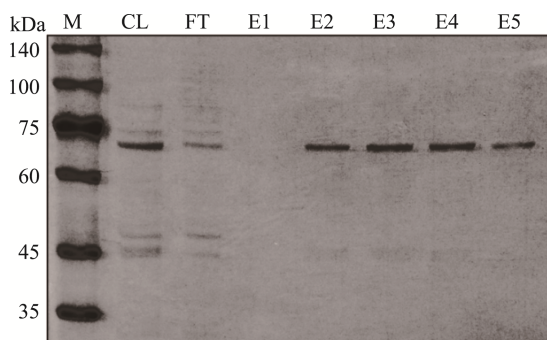


注: M. Marker; L1. 诱导后菌液; L2. 诱导破碎后上清液; L3. 诱导破碎后沉淀。

图 1 重组细菌漆酶诱导表达后的 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE plots of recombinant laccase solution after induced expression

为了进一步纯化重组表达带有 His 标签 SDIa 漆酶蛋白, 采用了镍柱亲和层析的方法。该方法基于 His 标签与镍离子之间的强亲和力, 通过镍柱可以特异性纯化目标蛋白<sup>[19]</sup>。收集的各组分洗涤液和洗脱液通过 SDS-PAGE 电泳分析, 以检测 His 标签重组蛋白的纯化效果。通过 ImageJ 软件对灰度值进行分析, 灰度值越高意味着诱导表达的蛋白量增加。根据电泳结果, 选择含有目标蛋白的洗脱液进行储存, 图 2 结果所示, 第 3 次洗脱(E3)的蛋白的表达量最高且灰度值也最高(表 1)。



注: M. Marker; CL. 裂解液; FT. 穿流液; E1~E5. 洗脱次数 1~5 次。

图 2 His 标签纯化后的重组漆酶液的 SDS-PAGE 图

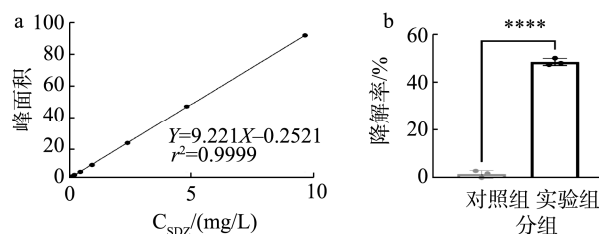
Fig.2 SDS-PAGE plots of recombinant laccase solution after His-tag purification

## 2.2 重组细菌漆酶对磺胺嘧啶的降解效果

如图 3 结果所示, 诱导表达成功的重组细菌漆酶可以降解磺胺嘧啶抗生素, 并且 24 h 降解效果可达 50.00%±0.69%。在 24 h, 重组细菌漆酶 SDIa 对磺胺嘧啶的降解效果高于来自枯草芽孢杆菌 WD23、X1 的细菌漆酶<sup>[21]</sup>。

表 1 ImageJ 灰度分析蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳结果  
Table 1 ImageJ grey scale analysis of SDS-PAGE electrophoresis results at protein purification

洗脱次数	区域	区域内灰度平均值	最大灰度	校正后的像素总和
E1	1180	7.919	38	9435
E2	1180	52.058	119	61428
E3	1180	64.203	119	75759
E4	1180	60.386	119	71256
E5	1180	42.904	115	50627



注: a. 磺胺嘧啶标准曲线; b. 重组细菌漆酶对磺胺嘧啶的降解率; \*\*\*\*代表  $P < 0.0001$ 。

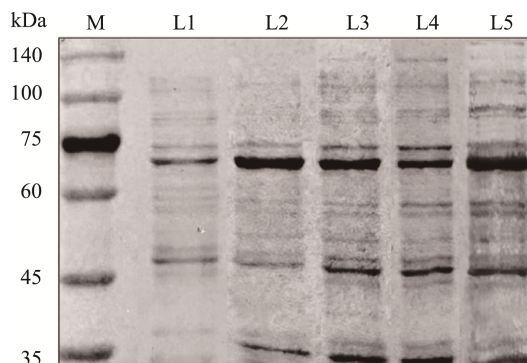
图 3 重组细菌漆酶对磺胺嘧啶的降解率

Fig.3 Degradation rate of sulfadiazine by recombinant bacterial laccase

## 2.3 重组细菌漆酶诱导表达的条件优化

### 2.3.1 诱导温度对重组细菌漆酶 SDIa 表达量的影响

从图 4 可以看出, 重组蛋白在大肠杆菌的表达会受到诱导温度的影响<sup>[22-23]</sup>, 低温会防止包涵体的形成, 减少质粒丢失的可能性<sup>[24]</sup>。16 °C 蛋白表达量最高, 随着温度升高蛋白量逐渐下降, 并且灰度值最高(表 2)。因此在后续实验中选用 16 °C 作为诱导温度。



注: M. Marker; L1. 12 °C; L2. 28 °C; L3. 37 °C; L4. 42 °C; L5. 16 °C。

图 4 诱导温度对酶表达量的影响

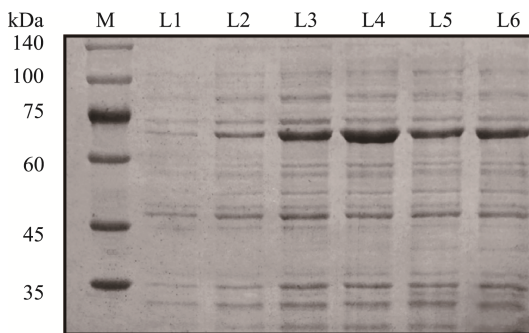
Fig.4 Effects of different induction temperatures on enzyme expression quantity

### 2.3.2 诱导时间对重组漆酶 SDIa 表达量的影响

如图 5 所示, 诱导时间的合理选择对重组蛋白表达至关重要<sup>[25]</sup>。蛋白表达量随诱导时间的延长而增加, 在 16 h 达到最大, 延长诱导时间, 不会增加蛋白表达量, 且 16 h 的灰度值最高(表 3), 故选择 16 h 为诱导时间。

表 2 ImageJ 灰度分析不同诱导温度下 SDS-PAGE 电泳结果  
Table 2 ImageJ grey scale analysis of SDS-PAGE electrophoresis results at different induction temperatures

诱导温度/°C	区域	区域内灰度平均值	最大灰度	校正后的像素总和
12	11016	41.949	168	462109
16	11016	92.118	194	1014776
28	11016	89.427	187	985152
37	11016	60.689	178	668552
42	11016	105.02	204	1156901



注: M. Marker; L1. 4 h; L2. 8 h; L3. 12 h; L4. 16 h; L5. 20 h; L6. 24 h。

图 5 诱导时间对酶表达量的影响

Fig.5 Effects of different induction times on enzyme expression quantity

表 3 ImageJ 灰度分析不同诱导时间下 SDS-PAGE 电泳结果  
Table 3 ImageJ grey scale analysis of SDS-PAGE electrophoresis results at different induction times

诱导时间/h	区域	区域内灰度平均值	最大灰度	校正后的像素总和
4	3760	10.635	86	39987
8	3760	21.008	112	78989
12	3760	55.031	152	206916
16	3760	78.727	165	296014
20	3760	47.529	152	178710
24	3760	53.319	154	200478

### 2.3.3 IPTG 浓度对重组漆酶 SDIa 表达量的影响

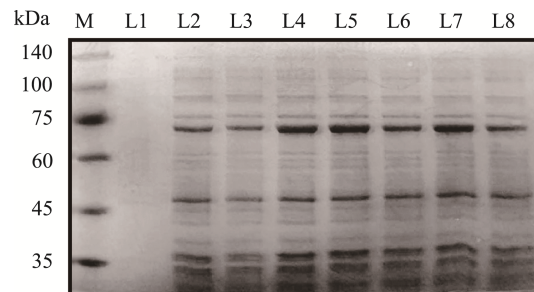
诱导剂浓度至关重要, 根据研究已经证明 IPTG 浓度在 0~1 mmol/L 之间的样品对大肠杆菌的生长不会有毒性作用<sup>[26-27]</sup>。如图 6 所示, IPTG 在 0.2 mmol/L 时, 蛋白质表达量均高于其他组, 灰度值(表 4)也高于其他组, 因此选择 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 进行后续实验。

## 2.4 重组细菌漆酶的酶学性质

### 2.4.1 最适 pH 和 pH 稳定性

图 7 显示 pH 对重组漆酶 SDIa 的影响。以 ABTS 为底物, 在 pH 为 3 的时候酶活达到最高, 比枯草芽孢杆菌漆

酶(pH 4.2)和真菌漆酶更耐酸<sup>[28-29]</sup>。重组漆酶更耐酸可能是由于在之前的基础上更换了缓冲液类型, 不使用柠檬酸-磷酸盐溶液, 而是采用醋酸-醋酸钠溶液。不同缓冲液的最适 pH 是不同的。图 7b 所示, 1 h 时, 3 个 pH 条件下重组漆酶 SDIa 的酶活稳定不变。在 pH 7 条件下, 酶活随反应时间的延长而增加, 3 h 到达顶峰后缓慢下降, 6 h 时酶活仍有 150%。而 pH 2 和 pH 3 反应条件的酶活变化趋势接近, 反应时间越长, 酶活越低。6 h 时, pH 3 的酶活高于 pH 2, 酶活仅有 50%。



注: M. Marker; L1. 诱导前; L2. 0.05 mmol/L; L3. 0.1 mmol/L; L4. 0.2 mmol/L; L5. 0.4 mmol/L; L6. 0.6 mmol/L; L7. 0.8 mmol/L; L8. 1.0 mmol/L。

图 6 IPTG 浓度对酶表达量的影响

Fig.6 Effects of different IPTG concentration on enzyme expression quantity

表 4 ImageJ 灰度分析不同 IPTG 浓度下 SDS-PAGE 电泳结果  
Table 4 ImageJ grey scale analysis of SDS-PAGE electrophoresis results at different IPTG-induced concentration

IPTG 浓度/(mmol/L)	区域	区域内灰度平均值	最大灰度	校正后的像素总和
0.05	1932	34.66	145	66964
0.1	1932	29.128	132	56275
0.2	1932	65.651	170	126837
0.4	1932	61.365	170	118557
0.6	1932	41.32	157	79830
0.8	1932	61.205	167	118279
1.0	1932	33.165	144	64074

### 2.4.2 最适温度和温度稳定性

图 8 显示温度对重组漆酶 SDIa 的影响。以 ABTS 为底物, 80 °C 时为最适温度, 高于 *Bacillus licheniformis* LS04 的最适温度<sup>[30]</sup>和大多数真菌漆酶<sup>[31]</sup>。重组漆酶 SDIa 的热稳定性也优于其他芽孢杆菌漆酶<sup>[21]</sup>。重组漆酶 SDIa 在 70 °C 加热 1 h 后酶活有所提高, 提高至 120% 以上, 随后逐渐下降, 在 6 h 达到半衰期。在 80 °C 和 90 °C, 酶活变化趋势类似, 随着加热时间的延长, 酶活逐渐降低, 在 3 h 内达到半衰期。重组漆酶 SDIa 在高温中加热 1 h 并不会失活, 但不能在高温下长时间存在。

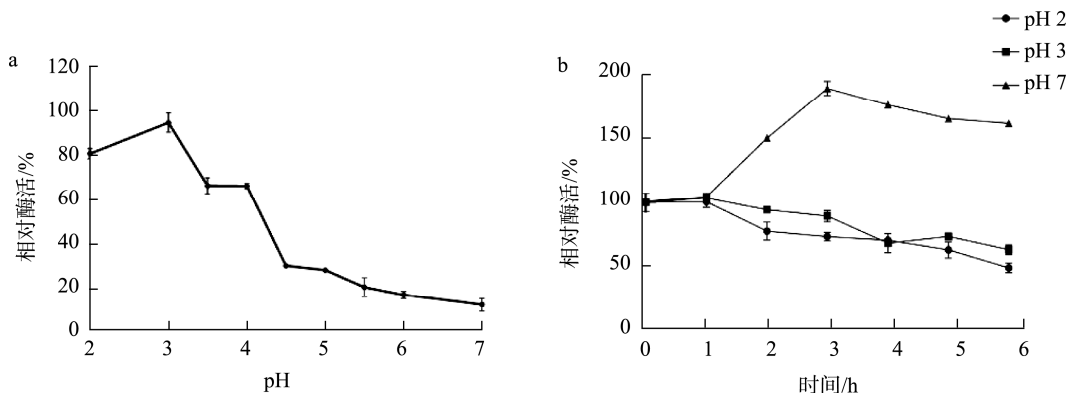


图 7 最适 pH (a)和 pH 稳定性(b)  
Fig.7 Optimal pH (a) and pH stability (b)

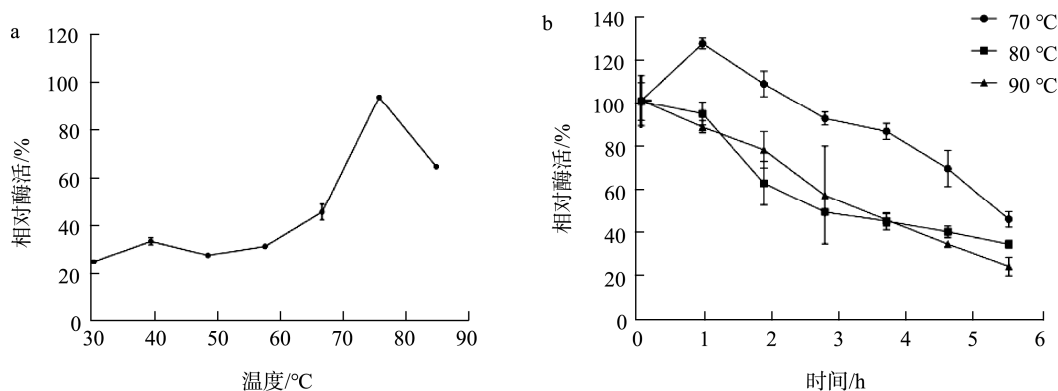


图 8 最适温度(a)和温度稳定性(b)  
Fig.8 Optimal temperature (a) and temperature stability (b)

### 3 结 论

本研究成功构建了重组细菌漆酶表达系统, 并初步证明了该酶对磺胺嘧啶的降解能力。实验结果表明, 细菌漆酶在优化的表达条件下表现出较强的酶活性和稳定性, 特别是在高温和酸性环境中, 具备良好的耐热性能, 降解磺胺嘧啶能力更优。这些发现为细菌漆酶在环境污染治理, 尤其是抗生素降解领域的潜在应用提供了理论支持。尽管研究已取得初步进展, 但为了推动其在工业化应用中的可行性, 未来的工作应聚焦于酶的进一步优化和适应性研究, 如探讨金属离子、化学试剂对酶活性及稳定性的影响, 以及反应动力学的深入分析。这些研究将为细菌漆酶在工业环境中的大规模应用奠定坚实基础。

#### 参考文献

[1] 赵肖肖. 基于印迹技术的钾资源提取和磺胺嘧啶去除的研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.  
ZHAO XX. Study on potassium resource extraction and Sulfadiazine removal based on imprinting technology [D]. Ji'nan: Shandong University, 2019.

[2] 杨丽花. 细菌漆酶基因异源表达降解磺胺类抗生素[D]. 天津: 天津大

学, 2021.  
YANG LH. Heterologous expression of bacterial laccase genes to degrade sulfonamide antibiotics [D]. Tianjin: Tianjin University, 2021.

[3] 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.

[4] CAPARRÓS-RUIZ D, FORMALÉ S, CIVARDI L, *et al.* Isolation and characterisation of a family of laccases in maize [J]. *Plant Science*, 2006, 171(2): 217–225.

[5] ASADI E, MAKHDOUMI A, ASOODEH A. Laccase mediator system obtained from a marine spore exhibits decolorization potential in harsh environmental conditions [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 191: 110–184.

[6] PALANISAMY S, RAMARAJ SK, CHEN SM. A novel laccase biosensor based on laccase immobilized graphene-cellulose microfiber composite modified screen-printed carbon electrode for sensitive determination of catechol [J]. *Scientific Reports*, 2017, 24(7): 412–414.

[7] NAVADA KK, KULAL A. Enzymatic degradation of chloramphenicol by laccase from *Trametes hirsuta* and comparison among mediators [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2019, 138: 63–69.

[8] LIU J, CAI Y, LIAO X, *et al.* Simultaneous laccase production and color removal by culturing fungus *Pycnoporus* sp. SYBC-L3 in a textile

- wastewater effluent supplemented with a lignocellulosic waste *Phragmites australis* [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2012, 89: 269–273.
- [9] IRACHETA-CÁRDENAS MM, ROCHA-PEÑA MA, GALÁN-WONG LJ, *et al.* A *Pycnoporus sanguineus* laccase for denim bleaching and its comparison with an enzymatic commercial formulation [J]. *Journal of Environmental Management*, 2016, 177: 93–100.
- [10] HAILEI W, PING L, YUHUA Y, *et al.* Overproduction of laccase from a newly isolated *Ganoderma lucidum* using the municipal food waste as main carbon and nitrogen supplement [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 38(5): 957–66.
- [11] OZER A, AY SAL F, BELDUZ AO, *et al.* Use of feruloyl esterase as laccase-mediator system in paper bleaching [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 190(2): 721–731.
- [12] KUMAR D, KUMAR A, SONDHI S, *et al.* An alkaline bacterial laccase for polymerization of natural precursors for hair dye synthesis [J]. *3 Biotech*, 2018, 8(3): 182.
- [13] GROVER N, BORKAR IV, DINU CZ, *et al.* Laccase-and chloroperoxidase-nanotube paint composites with bactericidal and sporicidal activity [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 50(6-7): 271–279.
- [14] KARHUNEN E, NIKU-PAAVOLA ML, VIIKARI L, *et al.* A novel combination of prosthetic groups in a fungal laccase; PQQ and two copper atoms [J]. *FEBS Letters*, 1990, 267(1): 6–8.
- [15] 张馨, 刘功良, 白卫东, 等. 原核漆酶的研究进展及其应用[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(15): 451–462.
- ZHANG X, LIU GL, BAI WD, *et al.* Research progress and application of prokaryotic laccase [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(15): 451–462.
- [16] PRINS A, KLEINSMIDT L, KHAN N, *et al.* The effect of mutations near the T1 copper site on the biochemical characteristics of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 68: 23–32.
- [17] PISCITELLI A, PEZZELLA C, GIARDINA P, *et al.* Heterologous laccase production and its role in industrial applications [J]. *Bioengineered*, 2010, 1(4): 252–262.
- [18] SODHI AS, BHATIA S, BATRA N. Laccase: Sustainable production strategies, heterologous expression and potential biotechnological applications [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 280(1): 135745.
- [19] 田红, 庞立, 杨文韬, 等. 分散泛菌 DJL-B 醇脱氢酶的重组表达与固定化研究 [J]. *食品工业科技*: 1-14. [2025-01-10]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024060040>
- TIAN H, PANG L, YANG WT, *et al.* Recombinant expression and immobilization of *Pantoea dispersa* DJL-B alcohol dehydrogenase [J]. *Science and Technology of Food Industry*: 1-14. [2025-01-10]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024060040>
- [20] 杨文韬, 庞立, 田红, 等. 分散泛菌胞内脱乙酰酶在大肠杆菌中重组表达条件优化及酶学特性[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(22): 190–199.
- YANG WT, PANG L, TIAN H, *et al.* Optimization of expression conditions and enzymatic properties of intracellular deacetylase from *Pantoea dispersa* in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(22): 190–199.
- [21] 孙建娜. 重组细菌漆酶的发酵条件及其催化壳聚糖改性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- SUN JN. Study on fermentation conditions of recombinant bacterial laccase and its application in chitosan modification [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019.
- [22] VIVEKANAND V, DWIVEDI P, SHARMA A, *et al.* Enhanced delignification of mixed wood pulp by *Aspergillus fumigatus* laccase mediator system [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24: 2799–2804.
- [23] SELINHEIMO E, KRUS K, BUCHERT J, *et al.* Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs [J]. *Journal of Cereal Science*, 2006, 56(14): 5732–5742.
- [24] CANFORA L, IAMARINO G, RAO MA, *et al.* Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *Trametes versicolor* laccase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(4): 1398–1407.
- [25] FAN F, ZHUO R, SUN S, *et al.* Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 which had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 102(3): 3126–3137.
- [26] 牛亚春. 甘油单酯脂肪酶 GMGL 的高效表达及固定化研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2022.
- NIU YC. High-efficiency expression and immobilization of monoacylglycerol lipase GMGL [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2022.
- [27] HAYAT SMG, FARAHANI N, GOLICHENARI B, *et al.* Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What we need to know [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24(6): 718–725.
- [28] HSU CA, WEN TN, SU YC, *et al.* Biological degradation of anthraquinone and azo dyes by a novel laccase from *Lentinus* sp. [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(9): 5109–5117.
- [29] COUTO S, SANROMAN M. The effect of violuric acid on the decolorization of recalcitrant dyes by laccase from *Trametes hirsute* [J]. *Dyes and Pigments*, 2007, 74(1): 123–126.
- [30] LU L, ZHAO M, WANG TN, *et al.* Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04 [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 115: 35–40.
- [31] SHARMA P, GOEL R, CAPALASH N. Bacterial laccases [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23: 823–832.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)