

DOI: 10.11686/cyxb2025257

http://cyxb.magtech.com.cn

龙德智, 刘增照, 周斐然. 漆酶在棉副产品饲料开发中的研究进展. 草业学报, 2026, 35(7): 228—239.

LONG De-zhi, LIU Zeng-zhao, ZHOU Fei-ran. Progress in research on the use of laccase to produce feed from cotton by-products. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(7): 228—239.

漆酶在棉副产品饲料开发中的研究进展

龙德智, 刘增照, 周斐然*

(哈密市畜牧工作站, 新疆哈密 839000)

摘要: 中国作为棉花生产与消费大国, 每年产生大量棉副产品, 但其含有的游离棉酚等抗营养因子严重限制了其在饲料中的高值化应用。传统物理化学脱毒方法存在成本高、效率低及潜在污染等问题。漆酶作为一种多铜氧化酶, 凭借其广谱底物特异性和高效氧化能力, 能够通过催化棉酚分子内环化反应, 将毒性醛基转化为稳定的呋喃结构, 实现棉酚的绿色降解。系统综述了棉酚的化学特性及其对动物肝毒性、生殖毒性与氧化应激的影响, 深入解析了漆酶的三维结构、铜簇催化机制及介体辅助氧化途径, 总结了pH、温度、酶浓度等关键因素对降解效率的调控规律。结果发现, 漆酶处理可显著缓解棉酚引起的肝损伤与生殖功能障碍, 恢复抗氧化酶活性。此外, 通过天然菌株筛选、基因工程改造及极端环境微生物开发, 漆酶的生产效率与稳定性持续提升, 其在棉粕脱毒中的应用案例已验证其工业化潜力。未来, 漆酶技术有望推动棉副产品资源化利用, 降低饲料成本, 并衍生高附加值产物, 为实现棉产业可持续发展提供关键技术支撑。

关键词: 棉酚; 漆酶; 脱毒; 棉副产品; 饲料

Progress in research on the use of laccase to produce feed from cotton by-products

LONG De-zhi, LIU Zeng-zhao, ZHOU Fei-ran*

Animal Husbandry Station of Hami City, Hami 839000, China

Abstract: China is a large producer and consumer of cotton and produces vast amounts of cotton by-products every year. However, anti-nutritional factors such as free gossypol seriously limit the use of cotton by-products as high-value feed. The problems with traditional physico-chemical detoxification methods include high cost, low efficiency, and potential pollution. Laccase, a polycopper oxidase with broad substrate specificity and strong oxidation activity, catalyzes the intramolecular cyclization of gossypol to convert toxic aldehyde groups into stable furan structures, thus achieving green degradation of gossypol. In this paper, the chemical properties of gossypol and its effects on liver toxicity, reproductive toxicity, and oxidative stress in animals are systematically reviewed. The three-dimensional structure of laccase, its copper cluster catalytic mechanism, and its mediator-assisted oxidation pathway are described. The regulatory effects of key factors such as pH, temperature, and enzyme concentration on degradation efficiency are summarized. Recent research has shown that laccase treatment can significantly alleviate liver injury and reproductive dysfunction induced by gossypol, and restore antioxidant enzyme activity. In addition, through natural strain screening, genetic engineering modification, and extreme environment microorganism development, the production efficiency and stability of laccase have been continuously improved, and its application in cottonseed

收稿日期: 2025-06-26; 改回日期: 2025-10-23

基金项目: 甜高粱与棉花秸秆混贮的开发利用对肉牛生产性能的影响(2024XNRC008)资助。

作者简介: 龙德智(1996—), 男, 广西陆川人, 硕士。E-mail: 13040543675@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 710298044@qq.com

meal detoxification has verified its industrialization potential. In the future, laccase technology is expected to promote the utilization of cotton by-products, reduce feed costs, and produce high value-added products, providing key technical support for the sustainable development of the cotton industry.

Key words: gossypol; laccase; detoxification; cotton by-products; feed

中国是全球最大的棉花(*Gossypium hirsutum*)生产国、消费国和进口国之一,据统计2024年棉花播种面积283.8 hm²,单产2172 kg·hm⁻²,总产量达到了616.4万t^[1]。棉产业每年产生大量棉副产品,如棉粕、棉籽壳和棉花秸秆等。这些副产品不仅来源广泛、成本低廉,且具有良好的适口性,可作为优质的蛋白饲料原料,可广泛应用于畜牧养殖业^[2]。然而,棉副产品中含有多种抗营养因子,如植酸和游离棉酚,若家畜长期摄入,可能会导致机体器官损害或中毒,进而引发各种疾病,甚至导致死亡^[3]。为了提高棉花副产品的安全性和营养价值,人们一直在探索有效的棉酚降解方法。传统的物理和化学方法(如碱处理、热水处理、吸附剂等)虽然能够在一定程度上降低棉酚含量,但存在成本高、效率低、可能引入有害残留物等问题,这些因素制约了棉副产品在饲料中的广泛利用^[4-5]。近年来,生物降解方法因其绿色、环保、高效的特点受到广泛关注。漆酶作为一种多铜氧化酶,具有广泛的底物特异性和强大的氧化能力,能够有效降解棉酚,显示出其在棉副产品饲料中的巨大应用潜力。

漆酶(对二酚氧化酶,EC 1.10.3.2)作为含铜氧化酶家族的重要成员,自19世纪被发现以来持续受到学界关注^[6]。后续研究表明,漆酶在生物界中广泛分布:不仅存在于高等植物[如漆树(*Toxicodendron vernicifluum*)、卷心菜(*Brassica oleracea*)、苹果(*Malus domestica*)等]和各类真菌(包括担子菌纲、子囊菌纲等)中,还存在于部分细菌(如枯草芽孢杆菌)及10余种昆虫(蜻蜓、果蝇等)体内^[7]。该酶能高效催化酚类化合物(单酚、双酚、多酚等)、芳香胺类及抗坏血酸等多元底物的氧化反应,其分子机制依赖于4电子转移途径将氧分子还原为水^[8]。这种高效且广谱的催化物,在生物制造、污染治理和食品加工等领域具有显著应用潜力。漆酶通过将毒性游离棉酚氧化聚合为无毒产物,显著提升棉副产品使用的安全性,这一特异性脱毒机制为棉副产物在饲料中的高值化利用提供了关键技术支持^[9]。

1 棉酚的性质及其对动物的影响

1.1 棉酚的化学结构与性质

棉酚是由色素腺体分泌生成的一种复杂的多酚二萜衍生物,又称棉毒素,广泛存在于棉花的棉籽、棉壳及秸秆中。该分子有两个通过C—C键连接的萘环,每个萘环上带有羟基、异丙基、甲基及醛基等官能团,分子式为C₃₀H₃₀O₈。棉酚在自然界中以游离棉酚和结合棉酚2种形式存在^[5]。结合棉酚是棉酚与蛋白质、氨基酸或其他物质共价键合的产物,不可被消化道吸收,可以随排泄物排出体外,毒性低。游离棉酚具有活性羟基和活性醛基,而这种独特的结构赋予了棉酚多种生物活性,同时也导致了其细胞毒性^[10]。

1.2 棉酚对动物的毒性作用

游离棉酚的毒害作用主要以羟基和醛基的活性为主。研究表明,棉酚通过氧化应激与线粒体功能障碍协同作用,辅以代谢酶异常造成肝细胞损伤,导致肝细胞肿胀、变性甚至坏死^[11-13];可破坏睾丸取精细管结构,协同氧化应激障碍,影响正常生殖功能^[14-16]。其次,棉酚还会引起动物的免疫抑制、神经系统损伤等多种不良反应。例如,棉酚能够抑制淋巴细胞的增殖和活化,降低机体的免疫功能;同时,棉酚还可能影响神经递质的代谢,导致神经系统的功能障碍^[17]。

2 漆酶降解棉酚的作用机制

2.1 酶特性与催化机理

漆酶在自然界一般以单聚体的形式存在,少数情况下存在的形式为同源二聚体、异源二聚体或多聚体,它们包含铜氧还蛋白样结构域^[18]。漆酶是一种糖基化蛋白,包含4个铜原子,根据铜原子位点及光谱特性,命名为3种不同的铜中心:T₁型,T₂型和2种T₃型,它们形成3核铜簇(T₂/T₃)和单核铜(T₁)(图1A)。结构域1(D₁)与结构域

2(D_2)共同嵌入3核铜簇,为一对 T_3 铜离子提供配位残基,作为催化循环的终点站参与氧气的结合与还原。 D_2 为 T_2 铜离子和 T_3 铜离子提供配位残基与 D_1 共同稳定3核铜簇,确保电子传递和氧气还原的有效进行。结构域3(D_3)独立容纳 T_1 铜离子,为其提供配位环境负责识别并氧化底物,接收底物传来的电子。 T_1 铜位于 D_3 的疏水口袋中,从还原性底物中提取电子; T_2 位于 D_1 和 D_2 的接口处与两个 T_3 铜构成3核铜簇,与 T_3 铜协同完成氧气的4电子还原反应; T_3 铜负责接收从 T_1 铜传来的电子,并将 O_2 还原成 H_2O ^[19-23]。在真菌漆酶的研究中,酶的催化可概括为 T_1 接受电子,结合底物氧化,3核铜簇传递电子至氧气,生成水,将底物氧化(图1B)^[6,18,24]。

从化学角度分析,漆酶的氧化还原作用机制依赖于活性中心铜簇的氧化还原活性(图2)。当底物具有适宜的氧化还原电位时,漆酶可直接将其氧化为相应的有机自由基(图2B)。当底物由于空间位阻或氧化还原电位不匹配无法直接氧化时,采用“漆酶—介质系统”(laccase—mediator system, LMS),即利用介体产生的自由基,再作用于大体积或高电位底物,进而直接氧化(图2B)。此外,LMS还可应用于偶联多酶氧化还原转化中的辅因子再生(图2C)。在实际应用中,酶的合成通常不仅限于上述反应系统,还包括使用有机溶剂或其他能溶解疏水底物

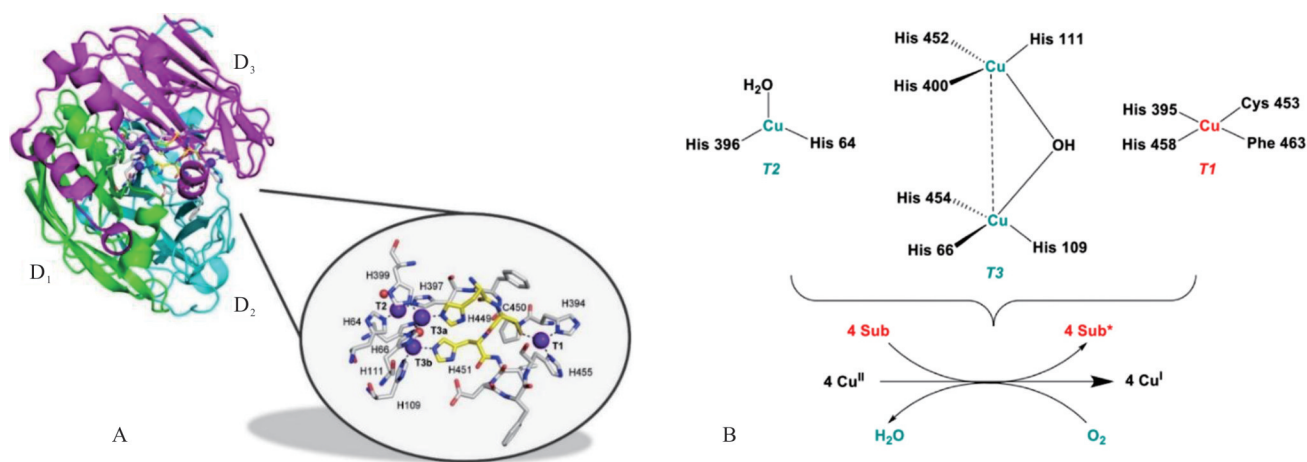


图1 漆酶结构及其催化方式^[6,18]

Fig. 1 Structure and catalytic mode of laccase^[6,18]

A: D_1 、 D_2 和 D_3 为结构域 D_1 , D_2 and D_3 domains; B: 漆酶氧化过程 Reactions catalyzed of laccase.

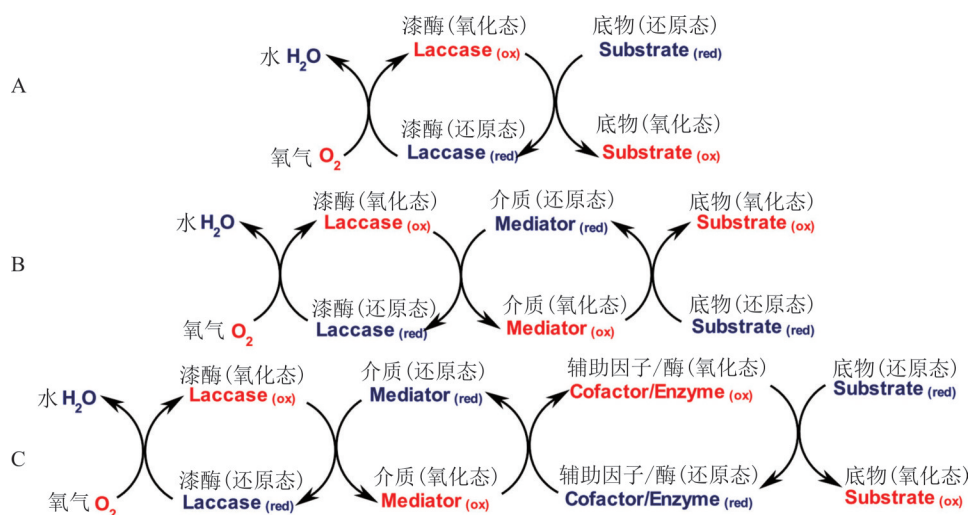


图2 基于底物漆酶的氧化循环^[6]

Fig. 2 Laccase-catalyzed redox cycles for substrate oxidation

A: 直接底物氧化 Direct oxidation of substrates; B: 化学催化底物氧化 Chemically catalyzed substrate oxidation; C: 多酶偶联氧化 Multienzymatic coupled oxidation. red(reduced)指失去电子过程,ox(oxidized)指得到电子过程。red (reduced) refers to the process of losing electrons; ox (oxidized) refers to the process of obtaining electrons.

的介质反应系统,以及那些生物催化剂被固定化或区室化,且生物转化在基于批次或流动的生物过程中进行的反应系统。例如,通过 LMS 系统进行黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)辅因子和氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+)的再生,或利用羟基类固醇 $12\alpha\text{-OH}$ 的选择性氧化制备胆汁酸衍生物^[25-26]。

2.2 棉酚的降解

研究表明,漆酶能够催化棉酚分子中的醛基和羟基与邻半醌自由基发生分子内环化反应^[9,27]。在漆酶的作用下,棉酚的醛基被氧化,生成的自由基与邻半醌自由基反应,形成稳定的呋喃环结构,从而将有毒的醛基转化为相对稳定的环状结构,完成棉酚的解毒过程。该反应不仅显著降低了棉酚的毒性,还有可能生成具有潜在生物活性的代谢产物。当漆酶与棉酚接触时,首先发生的是棉酚分子中醛基的单电子氧化反应,生成自由基中间体。该自由基随后与邻半醌自由基发生分子内环化反应,形成呋喃环结构。在此过程中,漆酶通过其 3 核铜簇的协同作用,将 O_2 还原为 H_2O ,并为反应提供必要的电子转移路径(图 3)。

利用核磁共振、电子自旋共振以及分子模拟等技术,研究人员对漆酶催化棉酚过程中的中间体和产物进行了详细分析(图 3)^[9]。结果表明,在反应过程中,棉酚中的 1,1'-羟基、7,7'-OH 和 15,15'-醛基等信号逐渐消失,同时出现了新的信号,随后这些信号逐步减弱并最终消失,伴随着呋喃环结构的形成。最终生成的产物包括一系列中间体和环化产物,其毒性显著低于原始棉酚。

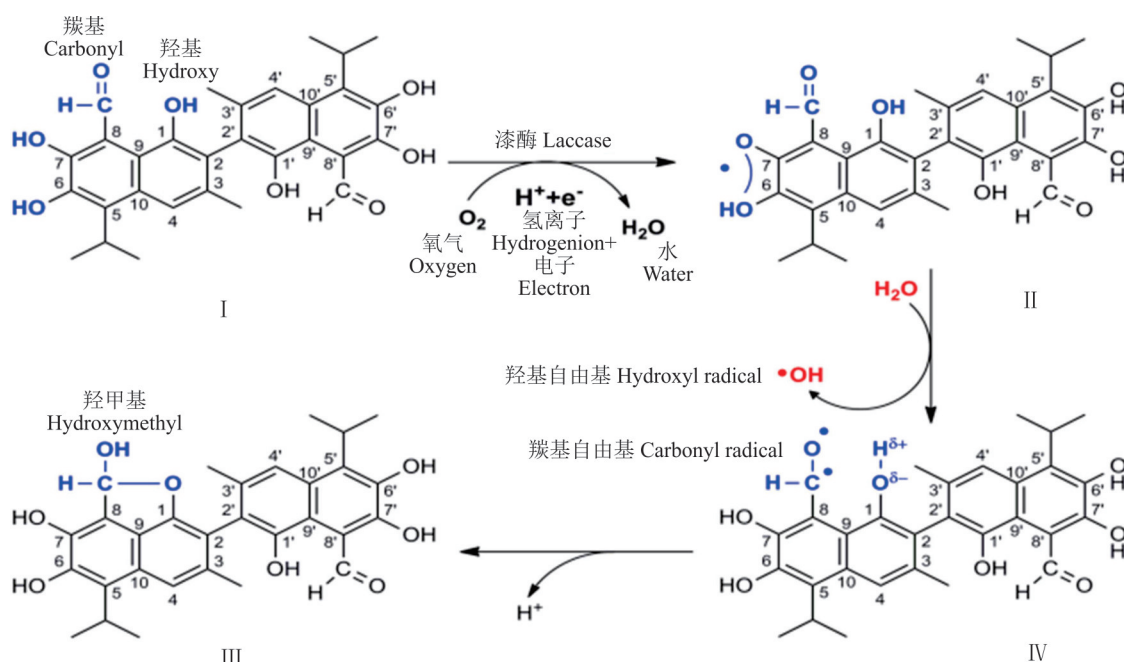


图 3 核磁共振谱图推测漆酶降解棉酚的过程

Fig. 3 Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of gossypol degradation by laccase

2.3 漆酶催化关键影响因素

为了提高漆酶处理棉酚的效率,研究人员对反应条件进行优化后发现,反应的底物与介体、pH 值、温度、酶浓度和反应时间等因素对漆酶的活性和棉酚的转化率有显著影响。

2.3.1 底物与介体 漆酶具有广泛的底物特异性,不同类型的漆酶对底物的适应性存在差异。其底物种类包括酚类化合物、氨基酚、多胺、苯胺、芳香胺、烷基胺等。此外,相较于一些双酚类化合物(如儿茶酚和对苯二酚),部分单酚类化合物(例如 2,6-二甲氧基苯酚和愈创木酚)更为适合作为漆酶的底物^[18]。李经法^[18]和 Bollag 等^[28]的一项研究中,发现叠氮化物、巯基乙酸和二乙基二硫代氨基甲酸能够抑制漆酶的活性。非碘化卤化物、叠氮化物、

氰化物以及氢氧化物等离子与漆酶中的三核铜簇结合,导致内部电子转移的中断,进而抑制酶的活性。此外,某些金属离子(如 Hg^{2+})、脂肪酸、巯基试剂、羟基甘氨酸、曲酸以及阳离子季铵洗涤剂也能在一定程度上抑制漆酶的活性^[29]。

2.3.2 pH值 漆酶的最适pH值因来源不同而有所差异,一般为4~7^[30-32]。在该pH范围内,漆酶的催化活性最高,能够有效促进棉酚的分子内环化反应(表1)。

表1 不同来源漆酶催化pH

Table 1 pH catalyzed by laccases from different sources

酶源类型 Enzyme source type	代表酶 Representative enzyme	pH值 pH value
真菌漆酶 Fungal laccase	云芝漆酶 <i>Trametes versicolor</i> laccase ^[31]	4.0~6.0
细菌漆酶 Bacterial laccase	植物乳杆菌漆酶 <i>Lactobacillus plantarum</i> laccase ^[32]	4.0~7.0
微生物发酵 Microbial fermentation	芽孢杆菌漆酶 <i>Bacillus licheniformis</i> laccase ^[30]	6.0~7.5

2.3.3 温度 漆酶的最适温度在不同菌株间差异较大,此外还与漆酶的提取方法,底物等有密不可分的关系,如表2所示。真菌漆酶^[31,33]的最适温度范围较宽(55~70℃),而植物漆酶^[33]的最适温度较低,约为28℃。即便是同为细菌来源的漆酶,地衣芽孢杆菌^[30]与龙舌兰芽孢杆菌^[30]的最适温度也相差约25℃。此外,漆酶的提取与纯化方法可能改变其空间构象和热稳定性;反应体系中的底物类型、浓度以及介质条件也会影响酶-底物复合物的热力学行为^[30-31,33]。这些因素共同决定了漆酶在实际应用中的催化性能,因此在工业过程中需依据具体酶制剂特性和工艺条件对温度参数进行系统优化。

表2 不同来源漆酶催化适宜温度

Table 2 Suitable temperature for laccase catalysis from different sources

酶源类型 Enzyme source type	不同酶源代表物 Representative enzymes from different sources	适宜温度 Suitable temperature
真菌漆酶 Fungal laccase	变色栓菌同工酶 <i>T. versicolor</i> isozymes ^[33]	60~70℃
	杂色云芝同工酶 <i>Coriolus versicolor</i> isozymes ^[31, 33]	55~60℃
细菌漆酶 Bacteria laccase	地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i> ^[30]	60℃左右 About 60℃
	龙舌兰芽孢杆菌 <i>B. tequilensis</i> ^[30]	85℃左右 About 85℃
植物漆酶 Plant laccase	日本漆树 <i>Toxicodendron vernicifluum</i> ^[33]	28℃左右 About 28℃
基因工程漆酶 Genetically engineered laccase	重组漆酶 Recombinant laccase ^[33]	55℃左右 About 55℃

2.3.4 酶浓度与反应时间 在漆酶催化棉酚转化的过程中,需根据酶源特性与底物性质确定适宜的酶浓度和反应时间。与多数酶促反应类似,提高漆酶浓度可在一定程度上加快反应速率,但浓度过高可能导致底物抑制效应,反而降低催化效率;同时,棉酚转化率随反应时间延长逐渐上升,最终趋于平衡。降解棉酚相关酶的具体浓度、反应时间及反应条件如表3所示。

在漆酶催化棉酚的转化过程中,其催化效率取决于酶源特性与底物体系的匹配度,需对多因素进行系统优化。如表3所示,不同来源漆酶的适宜操作条件存在显著差异。酶浓度作为影响反应速率的关键参数,其效应并非线性;例如,解淀粉芽孢杆菌漆酶在 $101.56 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下反应2 h,降解率可达94.57%,而某些商业漆酶的适用浓度范围则较宽^[34-35]。需注意,过高的酶浓度可能引发底物抑制或空间位阻效应,反而降低催化效率,因此确定体系最适浓度至关重要^[6,23]。与此同时,棉酚降解率随反应时间延长而增加,并最终趋于平衡,不同酶体系达此平衡的时间跨度从1 h至数十小时不等,故需协同考量时间经济性与预期降解率。

表 3 不同来源漆酶降解棉酚酶浓度与反应时间及条件

Table 3 Enzyme concentration, reaction time, and conditions for gossypol degradation by laccases from different sources

酶源	目标底物	典型酶浓度	温度	pH	反应时间	棉酚降解率	介体使用
Enzyme source	Target substrate	Typical enzyme concentration	Temperature (°C)		Reaction time (h)	Gossypol degradation rate (%)	Mediator usage
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ^[27]	游离棉酚 Free gossypol	101.56 U·mL ⁻¹	55	4	2	94.57	—
						98.73	2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)
细菌漆酶 Spore coat protein A laccase (CotA laccase) ^[34]	脱脂棉籽粕中游离棉酚 Free gossypol of defatted cottonseed meal	—	37	7	1	100.00	—
真菌漆酶 Fungal laccase	多酚类化合物 Polyphenolic compounds	广泛 Extensive	50~60	酸性 Acidic (4.0~6.5)	几十分钟至数小时不等 Vary from tens of minutes to several hours	因酶和条件而异 Depends on the enzyme and conditions	—
商业漆酶 Patented laccase ^[9]	棉籽蛋白中游离棉酚 Free gossypol of cottonseed protein	1000~40000 U·L ⁻¹	20~40	—	10~30	未明确量化 Not clearly specified	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)或过氧化氢(H ₂ O ₂) Nicotinamide adenine dinucleotide or hydrogen peroxide

此外,温度与pH是维持漆酶结构与功能的核心环境因子。真菌漆酶通常最适温度为50~60℃且偏好酸性环境,而细菌CotA漆酶在37℃和中性(pH 7.0)条件下表现最佳,商业漆酶则常具备更宽的温度适应性^[9,27,34]。偏离其最适范围将直接导致酶活性下降或不可逆失活。对于难直接作用的底物,引入介体(如ABTS)是提升反应效率的有效策略,它作为电子中介体可扩大底物作用范围,但也会增加工艺复杂性与成本。

综上所述,利用漆酶降解棉酚是一个多因素协同作用的过程。在实际应用开发中,必须针对特定的酶源和棉籽原料(如全籽、脱脂粕或蛋白),系统优化酶浓度、反应时间、温度及pH等核心参数,并权衡介体使用的必要性,才能建立高效、经济且稳定的棉酚降解工艺。表3所列数据为不同酶源的初始条件选择提供了有价值的参考。

3 漆酶处理棉酚的毒理学意义

3.1 对肝毒性的改善

在小鼠试验中,与单独使用棉酚处理的小鼠相比,使用漆酶催化的棉酚处理的小鼠肝脏损伤程度明显减轻。漆酶能够逆转棉酚对脂质过氧化物产生的抑制作用,稳定肝脏中的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,脂质过氧化物(lipid peroxide, LPO)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量,从而减少氧化损伤,部分治愈棉酚引起的肝损伤。

具体表现为,棉酚处理组小鼠的血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)活性显著升高,而经漆酶处理后的棉酚组小鼠,其血清中ALT和AST活性接近正常水平,表明肝脏损伤得到缓解。此外,组织病理学分析显示,漆酶处理后的棉酚组小鼠肝脏组织结构更加完整,肝细胞排列整齐,炎症细胞浸润和细胞坏死等病理变化明显减少^[9,35]。

3.2 对生殖毒性的缓解

棉酚对小鼠的生殖系统具有明显的毒性作用,会导致精子数量减少、生殖器官组织损伤等。而漆酶处理后的棉酚对小鼠生殖系统的毒性显著降低,睾丸和附睾的组织结构得到一定程度的修复,精子数量有所增加,表明漆酶能够缓解棉酚对生殖系统的损害^[9]。

试验中,棉酚处理组小鼠的睾丸组织出现精原细胞剥落、基底膜破坏和上皮内空泡等病理变化,而经漆酶处理后的棉酚组小鼠,其睾丸组织结构相对完整,精子生成过程恢复正常,精子活力和数量均有所提高。这表明漆酶通过促进棉酚的分子内环化反应,将有毒的醛基转化为相对无毒的环状结构,从而减少了棉酚对生殖系统的毒性作用^[36]。

3.3 对氧化应激的调节

棉酚诱导的氧化应激是其毒性作用的重要机制之一。漆酶处理棉酚能够有效调节氧化应激水平,恢复细胞内的氧化—抗氧化平衡。研究表明,漆酶处理后的棉酚组小鼠肝脏和生殖器官组织中,SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)等抗氧化酶的活性显著提高,而丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量明显降低,表明氧化应激损伤得到缓解^[37]。

4 漆酶在棉副产品脱毒中的应用进展

4.1 高效菌株与酶源开发

漆酶根据来源可以分为2种,天然菌和基因改造菌,不同酶源的性能比较如表4所示。

表4 不同酶源的性能比较
Table 4 Performance comparison of different enzyme sources

酶源类型 Enzyme source type	代表菌株 Representative strains	产酶周期 Enzyme production cycle	酶活性 Enzyme activity (U·mL ⁻¹)	优势 Advantage	局限性 Shortcoming
天然真菌 Natural fungal	云芝 <i>T. versicolor</i> ^[38]	7~14 d	50~200	酶系丰富,底物广谱 Rich enzyme system, broad substrate spectrum	周期长,需要诱导剂 Long cycle, need inducer
基因工程细菌 Genetically engineered bacterium	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> ^[39]	24~48 h	100~500	发酵快,耐高温/碱性 Fast fermentation, high temperature/alkaline resistance	需优化分泌表达 Secretory expression needs to be optimized
重组酵母 Recombinant yeast	毕赤酵母 <i>Pichia pastoris</i> ^[40]	3~5 d	200~800	糖基化修饰,稳定性高 Glycosylation modification, high stability	成本较高 Expensive cost
极端环境菌株 Extreme environment strains	嗜热芽孢杆菌 <i>Bacillus thermophilus</i> ^[41]	48~72 h	80~300	耐高温(>80℃),适合工业反应 High temperature resistance (>80℃), suitable for industrial reactions	底物特异性窄 Narrow substrate specificity

天然菌源漆酶主要来源于云芝等天然真菌或嗜热芽孢杆菌等极端环境微生物。该类酶系组成丰富,底物谱广,且部分具有优异的耐高温特性,更接近自然界中的原始状态。然而,其生产过程通常周期较长,往往需要添加诱导剂,且部分菌株所产酶存在底物特异性较窄的局限。基因改造菌源漆酶则通过将目标基因导入枯草芽孢杆菌、毕赤酵母等工程宿主实现异源表达。该类漆酶发酵周期短,酶活产量高,并可通过基因操作提升其对温度、碱性的耐受性,或利用真核系统进行糖基化修饰以增强稳定性。但其技术成本较高,且常需对分泌表达条件进行系统优化。

总体而言,漆酶来源的选择需结合实际应用需求,在酶学性质、生产成本、工艺适配性与操作稳定性等多因素间进行综合权衡。

4.1.1 天然菌 天然菌包括真菌和细菌两类,其中白腐真菌(云芝)是传统的漆酶高产菌,其培养底物多为农副产品废弃回收物,发酵条件温和,能耗低。但其产酶周期较长,为7~14 d,酶产量和效率低于优化过的工程菌,有的催化过程需添加木质素(如ABTS等介体物)。云芝产生的漆酶生产成本低,同样其效率和产量也最低。相比之下,枯草芽孢杆菌作为一种细菌,具有较高的漆酶基因表达量,且其产酶发酵周期较短,仅需24~48 h。此外,枯草芽孢杆菌在耐碱性和热稳定性方面表现出色,即使在70℃的高温下,仍能保持较高的活性。此外还有嗜

热芽孢杆菌等能在高温的情况下产生漆酶,用于工业反应。

4.1.2 基因工程菌 利用基因克隆技术将漆酶基因导入高效表达宿主中,如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、毕赤酵母或丝状真菌(里氏木酶)等,极大提高产酶发酵速率。其次,通过基因克隆技术还能实现定点突变提升底物亲和力或pH耐受性,或以基因组编辑技术构建突变库,筛选耐高温、耐有机溶剂或广谱底物适应性的变体。以基因工程改造的枯草芽孢杆菌生产漆酶的工艺成本同样较低,常采用豆(*Glycine max*)粕粉、木薯(*Manihot esculenta*)粉等廉价农副产品。其反应迅速,发酵周期短,且常能将目标酶分泌到胞外,极大简化了下游提取纯化工艺,技术成熟,具有低成本、高产率的显著优势^[42-43]。

4.1.3 重组酵母 毕赤酵母是利用真核表达系统高效生产漆酶的手段,其高密度发酵能达到极高的菌体密度和酶产量,但其生产成本较高,需要酵母粉、蛋白胨等培养基,诱导剂甲醇以及纯氧,其次系统的pH和温度也需要精密控制,工艺复杂,生产成本较高^[44-46]。

4.1.4 极端环境菌 嗜热芽孢杆菌属于天然菌的一种,此类菌产生的酶天然适应高温环境,具有极高的热稳定性。其发酵过程需要维持高温,对设备耐温性、保温性和能量消耗要求很高,有时还需耐受特定的pH或盐度,这些因素导致了生产成本过高^[41]。

4.2 应用案例与效果

魏婷婷等^[27]在土壤中筛选得到一株解淀粉芽孢杆菌XP-13(*B. amyloliquefaciens* XP-13),通过基因克隆扩增其片段,导入毕赤酵母GS115(*P. pastoris* GS115)实现异源表达。以ABTS作为底物,采用不同反应条件,利用高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)分析漆酶对棉酚的降解效果。结果显示该酶具有良好的热稳定性和广泛的pH适应性,对棉酚降解效果显著。

Zhang等^[34]也利用异源表达技术表达了芽孢杆菌的CotA、大肠杆菌的CueO和乳杆菌的LcLac 3种细菌漆酶,并研究了它们对棉酚的降解能力。结果表明,CotA漆酶棉酚降解能力最强,在37℃和pH值为7.0的条件下,在1h内能够实现100%的降解,且不需要添加氧化还原介质。此外,体外和体内研究证实,经CotA漆酶氧化降解后,棉酚的肝毒性被有效消除。

4.3 启发

有确凿的证据表明,漆酶能够有效降解棉酚,且整个催化过程完全无害,提示可以通过联合发酵技术实现棉副产品的脱毒。李丽红等^[47]在木本植物毛果杨(*Populus trichocarpa*)漆酶基因LAC-1的克隆与原核表达研究中,将其氨基酸序列与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)漆酶基因进行比对,发现其具有漆酶基因的3个铜离子的保守结合域,说明漆酶的酶催化系统结构保守。禾本科如玉米(*Zea mays*)、甘蔗(*Saccharum officinarum*)已被证实含有漆酶,高粱(*Sorghum bicolor*)作为同科植物,其漆酶相关研究近乎空白,但可以推测其大概率具有类似的酶系统^[48]。玉米秸秆和高粱秸秆作为当地较多的饲料原料,可能在发酵的条件下产生漆酶,通过联合青贮的方法降低棉副产品中的棉酚,为牲畜提供优质饲料。

5 漆酶对饲料中棉酚处理的应用前景

5.1 提高棉副产品源利用

棉产业产生的棉副产品产量巨大,但由于棉酚的存在,其蛋白质和油脂资源未能得到充分利用。漆酶处理棉酚的方法具有成本低、操作简便、环境友好等优点,如果能够实现工业化应用,将大大提高棉副产品资源的利用率,为食品和饲料行业提供大量的优质蛋白质和油脂来源。

5.2 降低饲料加工成本

传统的棉酚脱毒方法通常需要复杂的工艺和高昂的成本,如溶剂提取、基因工程等^[49]。而漆酶作为一种生物催化剂,具有高效、特异性高的特点,能够在温和的条件下实现棉酚的脱毒,从而降低棉副产品加工成本,提高新疆棉产业的市场地位。

5.3 开发新型棉酚衍生物

漆酶处理棉酚过程中可能产生的环化产物和代谢产物具有潜在的生物活性,如抗氧化、抗菌等^[9,50-51]。这些

新型棉酚衍生物有望开发成为具有高附加值的功能性食品、药品或化妆品,进一步拓展棉籽资源的应用领域。例如,有研究表明,漆酶处理棉酚生成的环化产物具有较强的抗氧化活性,能够有效清除自由基,延缓食品的氧化变质^[9,52]。此外,这些环化产物还可能具有抗菌、抗病毒等生物活性,可用于开发新型的天然保鲜剂、抗菌剂等产品。

5.4 环境友好性

漆酶作为一种绿色生物催化剂,在棉酚处理过程中,其反应条件温和,不需要使用有害的化学试剂,不会产生二次污染。与传统的化学脱毒方法相比,漆酶处理棉酚更加符合可持续发展的要求,有助于减少工业生产对环境的负面影响,实现棉籽加工的绿色化和可持续发展^[9]。

5.5 应用案例与前景展望

目前,漆酶在棉酚处理中的应用仍处于研究和开发阶段,但已有一些初步的案例显示出其良好的应用前景。例如,在一些实验室规模的研究中,通过优化漆酶的反应条件,已经实现了棉酚的高效解毒,并成功制备了安全的棉籽蛋白和油脂产品。这些成果为漆酶在棉酚处理中的工业化应用奠定了基础。

随着对漆酶催化机制的深入研究,以及酶工程技术的不断发展,在未来有望进一步提高漆酶的催化效率和稳定性,降低生产成本,从而推动漆酶在棉酚处理中的大规模工业化应用。同时,通过与其他脱毒技术的结合,如生物修复、物理化学方法等,可以构建更加高效、综合的棉酚脱毒体系,为棉籽资源的高效利用提供更加可靠的解决方案。

6 结论与展望

漆酶在棉酚处理中的应用展现出巨大的价值和意义。通过催化棉酚的分子内环化反应,漆酶能够有效降低棉酚的毒性,改善棉酚对肝脏和生殖系统的损害。在工业化应用方面,漆酶处理棉酚具有提高棉籽资源利用率、降低加工成本和开发新型棉酚衍生物的潜力。然而,目前漆酶在棉酚处理中的研究仍处于初步阶段,还需要进一步深入研究漆酶的催化机制、优化反应条件以及提高漆酶的稳定性和活性,以实现漆酶在棉酚处理中的大规模工业化应用。

参考文献 References:

- [1] Pan J. The national cotton output increased by 9.7% year-on-year in 2024. *Cotton Sciences*, 2025, 47(1): 2.
潘洁. 2024年全国棉花产量比上年增长9.7%. *棉花科学*, 2025, 47(1): 2.
- [2] Chu H Z, Liu J M, Yang G W, *et al.* Diagnosis and treatment gossypol poisoning of fattening cattle. *China Cattle Science*, 2019, 45(6): 83–85.
褚洪忠, 刘建明, 杨光维, 等. 育肥牛棉酚中毒的诊断与治疗. *中国牛业科学*, 2019, 45(6): 83–85.
- [3] Wang W K, Yang H J, Xing Y L, *et al.* Gossypol's toxicity and its microbial detoxification mode in ruminants: a review. *Chinese Journal of Animal Science*, 2017, 53(6): 15–19.
王伟康, 杨红建, 邢亚亮, 等. 棉酚对反刍动物的危害性及其瘤胃微生物学脱毒机理探讨. *中国畜牧杂志*, 2017, 53(6): 15–19.
- [4] Liu Y M, Guan S X, Wang W J, *et al.* Nutritional value, detoxification methods, and application research of cottonseed as animal feed. *China Cotton*, 2023, 50(9): 35–41.
刘永明, 关淑仙, 王文静, 等. 棉籽作畜禽饲料的营养价值、脱毒方法及应用研究进展. *中国棉花*, 2023, 50(9): 35–41.
- [5] Liu C L M, Aorigele, Wang C J, *et al.* Current research status of the use of the whole cottonseed in ruminant production. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2025, 52(4): 1651–1659.
刘朝乐门, 敖日格乐, 王纯洁, 等. 全棉籽在反刍动物生产中的应用研究现状. *中国畜牧兽医*, 2025, 52(4): 1651–1659.
- [6] Bassanini I, Ferrandi E E, Riva S, *et al.* Biocatalysis with laccases: an updated overview. *Catalysts*, 2021, 11(1): 26.
- [7] Patel N, Shahane S, Shivam, *et al.* Mode of action, properties, production, and application of laccase: a review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2019, 13(1): 19–32.
- [8] Khatami S H, Vakili O, Movahedpour A, *et al.* Laccase: Various types and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(6): 2658–2672.
- [9] Wang L, Chen M, Luo X C, *et al.* Intramolecular annulation of gossypol by laccase to produce safe cottonseed protein.

- Frontiers in Chemistry, 2020, 1(8): 583176.
- [10] Liu Y X, Wang L L, Zhao L, *et al.* Structure, properties of gossypol and its derivatives-from physiological activities to drug discovery and drug design. *Natural Product Reports*, 2022, 39(6): 1282—1304.
- [11] Xu W X, Hu Y L, Liu P, *et al.* Effect of hepatic antioxidant capacity in gossypol-induced male broilers. *Modern Animal Husbandry Science & Technology*, 2024, 106(3): 12—16.
徐文秀, 胡雨露, 刘盼, 等. 棉酚对雄性肉仔鸡肝脏抗氧化能力的影响. *现代畜牧科技*, 2024, 106(3): 12—16.
- [12] Zhang M D, Liang J P, Zhang J, *et al.* Effects of gossypol acetate on serum aminotransferase, liver antioxidant enzyme activities and hepatocyte apoptosis of *Cyprinus carpio* following oral administration. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(7): 128—135.
张孟丹, 梁俊平, 张静, 等. 口灌醋酸棉酚对鲤血清转氨酶、肝脏抗氧化酶活力及肝细胞凋亡的影响. *河南农业科学*, 2019, 48(7): 128—135.
- [13] Yu J, Yang H, Wang J, *et al.* Comprehensive analysis of histophysiology, transcriptomics and metabolomics in goslings exposed to gossypol acetate: unraveling hepatotoxic mechanisms. *Frontiers in Veterinary Science*, 2025, 21(12): 1527284.
- [14] Zhao S C, Wang H T, Liu K X, *et al.* Effects of gossypol on oxidative damage and expression of *NF- κ B*, *P53* and *Caspase-3* in mice testis. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2024, 55(2): 49—56.
赵树臣, 王海涛, 刘克祥, 等. 棉酚对小鼠睾丸氧化损伤及 *NF- κ B*、*P53* 和 *Caspase-3* 基因表达的影响. *东北农业大学学报*, 2024, 55(2): 49—56.
- [15] Zhou D R. Study on the regulatory effect of gossypol on the expression of connectin 43 in sertoli cells of testis. Shantou: Shantou University, 2009.
周德荣. 棉酚对睾丸支持细胞间隙连接蛋白 43 表达的调节作用的研究. 汕头: 汕头大学, 2009.
- [16] He X. Molecular mechanism of gossypol-induced apoptosis in goat spermatogonial stem cells. Yangling: Northwest A & F University, 2017.
贺鑫. 棉酚诱导山羊精原干细胞凋亡的分子机理研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [17] Ma X C, Ma Z, Huang X W, *et al.* Research progress on detoxification technology of cottonseed meal. *Zhongnan Agricultural Science and Technology*, 2023, 44(11): 226—230.
马晓翠, 马壮, 黄秀文, 等. 棉籽粕脱毒技术研究进展. *中南农业科技*, 2023, 44(11): 226—230.
- [18] Li J F. Study on bacterial composition, laccase gene screening and enzymatic properties of rumen lignin-degrading in buffalo. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022.
李经法. 水牛瘤胃木质素降解细菌组成、漆酶基因筛选及其酶学性质的研究. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [19] Ji W Z. Study on preparation of fungal laccase, its catalytic polymerization characteristics and laccase gene' cloning. Ji'nan: Shandong Polytechnic University, 2011.
季万镇. 白腐菌漆酶的制备、催化聚合的研究及漆酶基因克隆的初探. 济南: 山东轻工业学院, 2011.
- [20] Roberts S A, Weichsel A, Grass G, *et al.* Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(5): 2766—2771.
- [21] Hakulinen N, Kiiskinen L L, Kruus K, *et al.* Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural Biology*, 2002, 9(8): 601—605.
- [22] Giardina P, Faraco V, Pezzella C, *et al.* Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(3): 369—385.
- [23] Marcus R A, Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) —Reviews on Bioenergetics*, 1985, 811(3): 265—322.
- [24] Pezzella C, Guarino L, Piscitelli A. How to enjoy laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 72(5): 923—940.
- [25] Ludig R, Magdalena O, Marcel Z, *et al.* Continuous enzymatic regeneration of electron acceptors used by flavoenzymes: cellobiose dehydrogenase-catalyzed production of lactobionic acid as an example. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2004, 22(2): 97—104.
- [26] Ferrandi E E, Monti D, Patel I, *et al.* Exploitation of a laccase/meldola's blue system for NAD^+ regeneration in preparative scale hydroxysteroid dehydrogenase-catalyzed oxidations. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2012, 354(14/15): 2821—2828.
- [27] Wei T L, Miao H B, Wu Q, *et al.* Heterogeneous expression, characterization and degradation of gossypol by laccase *BmLac*. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(12): 320—328.

- 魏婷柳, 苗华彪, 吴倩, 等. 漆酶 *BmLac* 的异源表达、酶学特性及棉酚降解的研究. 生物技术通报, 2023, 39(12): 320—328.
- [28] Bollag J M, Leonowicz A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 48(4): 849—854.
- [29] Li Z, Jiang S, Xie Y, *et al.* Mechanism of the salt activation of laccase Lac15. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 521(4): 997—1002.
- [30] Sun Y, Zhang H L, Wang W B, *et al.* Advances in the function and properties of laccase and its microbial production. Advances in Microbiology, 2023, 12(4): 121—129.
- 孙雨, 张海伦, 王文博, 等. 漆酶的功能特性与微生物生产研究进展. 微生物前沿, 2023, 12(4): 121—129.
- [31] Shao Q, Yao Z Y, Guo W Y, *et al.* Study on physicochemical properties and kinetics of laccase from *Coriolus versicolor*. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2005(3): 109—112.
- 邵强, 姚朝阳, 郭伟云, 等. 云芝漆酶理化性质及动力学研究. 河南师范大学学报(自然科学版), 2005(3): 109—112.
- [32] Chen X W, Luo W S, Ye X Y, *et al.* Identification of enzymes and their key action sites for histamine degradation in mulberry fruit wine by *Lactiplantibacillus plantarum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(47): 26404—26415.
- [33] Li Q, Zhao D X, Liu S P, *et al.* Enzymatic characteristics of recombinant laccases from different sources. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition), 2014, 38(3): 93—97.
- 李琦, 赵东霞, 刘世萍, 等. 不同来源重组漆酶的酶学特性. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(3): 93—97.
- [34] Zhang L Y, Zheng H, Zhang X X, *et al.* Effective degradation of free gossypol in defatted cottonseed meal by bacterial laccases: performance and toxicity analysis. Foods, 2024, 13(4): 566—573.
- [35] Wang H T, Liang L, Zhao S C, *et al.* Effects of gossypol on SOD, GSH-Px and MDA in the liver of mice. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016, 52(9): 96—98.
- 王海涛, 梁璐, 赵树臣, 等. 棉酚对小鼠肝脏 SOD GSH-Px 和 MDA 的影响. 中国兽医杂志, 2016, 52(9): 96—98.
- [36] Wang H T. Study on the effect of gossypol-induced testicular oxidative stress on NF- κ B/P53 signaling pathway in mice. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.
- 王海涛. 棉酚诱导小鼠睾丸氧化应激对 NF- κ B/P53 信号通路影响的研究. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- [37] Kovacic P. Mechanism of drug and toxic actions of gossypol: focus on reactive oxygen species and electron transfer. Current Medicinal Chemistry, 2003, 10(24): 2711—2718.
- [38] Hu B Y, Wang S N, Chen Q J, *et al.* Isolation, identification, and cultivation of a white-rot fungus and its laccase production conditions. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2018, 24(2): 367—373.
- 胡渤洋, 王寿南, 陈青君, 等. 一种白腐真菌的分离、鉴定、培养及产漆酶条件. 应用与环境生物学报, 2018, 24(2): 367—373.
- [39] Liu W, Chao Y, Liu S, *et al.* Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 63(2): 174—181.
- [40] Sun J. Heterologous expression of *Ganoderma lucidum* laccase in *Pichia pastoris*, and study on its enzymatic characteristics and function. Yangzhou: Yangzhou University, 2011.
- 孙静. 毕赤酵母异源表达灵芝漆酶及酶学特性与功能的研究. 扬州: 扬州大学, 2011.
- [41] Wang J, Yi Y, Xia J, *et al.* Isolation of thermophilic microorganisms and preliminary study on their enzyme-producing characteristics. The Food Industry, 2014, 35(11): 278—281.
- 王佳, 易弋, 夏杰, 等. 嗜热微生物的分离及其产酶特性的初步研究. 食品工业, 2014, 35(11): 278—281.
- [42] Rao Z M, Zou Y L, Xu M J. A method for producing heat-resistant β -amylase by *Bacillus subtilis* 6-7. Wuxi: Jiangnan University, 2013.
- 饶志明, 邹艳玲, 徐美娟. 一种利用枯草芽孢杆菌 6-7 产耐热 β -淀粉酶的方法. 无锡: 江南大学, 2013.
- [43] Tian Y P. Fermentation preparation and application of *Bacillus subtilis* aminopeptidase. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- 田亚平. 枯草芽孢杆菌氨肽酶的发酵制备及应用. 无锡: 江南大学, 2018.
- [44] Zhang X L. Study on high-level expression of β -mannanase in *Pichia pastoris*. Ji'nan: Qilu University of Technology, 2015.
- 张晓龙. 毕赤酵母高效表达 β -甘露聚糖酶的研究. 济南: 齐鲁工业大学, 2015.
- [45] Zheng Y H, Hou Y, Zhao S D, *et al.* Recombinant expression and yield optimization of lipase LipA from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2025, 37(2): 1365—1375.
- 郑毅恒, 侯颖, 赵仕达, 等. 疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶 LipA 在毕赤酵母中的重组表达及产量优化. 动物营养学报, 2025,

37(2): 1365—1375.

- [46] Xie Y, Luo M J, Yang G Y. Fermentation method of lysozyme: China, CN109234256A. 2019-01-18.
谢渊, 罗漫杰, 杨广宇. 一种溶菌酶的发酵方法: 中国, CN109234256A. 2019-01-18.
- [47] Li L H, Han J Y, Wang Y, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of laccase gene LAC-1 from *Populus trichocarpa*. Journal of Plant Studies, 2016, 5(2): 39—46.
李丽红, 韩静宜, 王莹, 等. 毛果杨漆酶基因 LAC-1 的克隆与原核表达研究. 植物学研究, 2016, 5(2): 39—46.
- [48] Caparrós-Ruzi D, Fornalé S, Civardi L, *et al.* Isolation and characterisation of a family of laccases in maize. Plant Science, 2006, 171(2): 217—225.
- [49] Hu B, Zheng W X, Gao W M, *et al.* Research progress of toxicology and detoxification technology of free gossypol. Grass-feeding Livestock, 2020(3): 1—7, 38.
胡波, 郑文新, 高维明, 等. 游离棉酚毒理学与脱毒技术的研究进展. 草食家畜, 2020(3): 1—7, 38.
- [50] Hautphenne C, Penninckx M, Debaste F. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: a review. Environmental Technology & Innovation, 2016(5): 250—266.
- [51] Chen H L, Zhang Q Y, Sun K. Basic principles of laccase-mediated oxidative coupling of phenols *in vivo* and its application in green synthesis. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(5): 193—204.
陈慧玲, 张青云, 孙凯. 漆酶介导生物体内酚类氧化偶联的基本原理及其在绿色合成中的应用. 生物技术通报, 2020, 36(5): 193—204.
- [52] Ge Y Z, Xin J Y, Liu S M, *et al.* Application of laccase in food molecular modification and food colloid system. China Condiment, 2024, 49(2): 209—215.
葛怿泽, 辛嘉英, 刘思淼, 等. 漆酶在食品分子修饰和食品胶体体系中的应用. 中国调味品, 2024, 49(2): 209—215.