Vol. 28, No. 2 Apr. 2014

文章编号:1001-3555(2014)02-0188-09

细菌漆酶的结构、催化性能及其应用

高 键¹,关可兴², 焦 晶¹,姜文洙²,张应玖^{1*}

(1. 吉林大学 分子酶学工程教育部重点实验室, 吉林 长春 130012; 2. 吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130062)

漆酶(laccase)(EC 1.10.3.2)是一类含铜的多 酚氧化酶(copper-containing polyphenol oxidase),属 于蓝色多铜氧化酶(blue multi-copper oxidase, MCO)家族,能催化多种酚类、芳胺类化合物的氧 化,同时将分子氧还原成水.漆酶突出的催化特性 是它的底物具有广泛性、催化反应具有复杂性,生 成的产物具有环境友好性. 漆酶以其分子中的金属 离子作为辅助因子行使其催化功能,依据催化条件 的不同,漆酶既可以催化天然大分子如木质素、腐 殖酸的氧化降解,也可以催化小分子酚类、芳胺类 化合物的氧化转化或氧化聚合,产生的副产物只有 水,是"环境友好"(environment-friendly)的酶.因 此,漆酶具有广阔的应用潜力,近些年来备受关 注. 对漆酶的研究不仅能为人类了解天然物质、探 索生命现象提供信息,而且对生物资源的开发和利 用都有着重要的意义,因此漆酶从发现至今一直是 人们关注和研究的热点.

漆酶在自然界中广泛存在,迄今已在细菌、真 菌、昆虫和高等植物中鉴定出了漆酶.不同来源的 漆酶,因分子结构和酶学性质的差异,其催化功能 也明显不同,显示出不同的工业应用价值.漆酶最 早是在1883年从植物漆液中发现的,虽然至今已 有100多年的历史了,但是人们认识细菌漆酶只是 近20年的事.过去10年间,随着微生物基因组数 据库的不断完善以及电脑模拟(in silico)生物学的 快速发展,人们对细菌漆酶的认识才迅速提高.

第一个报道的细菌漆酶是 1993 年 Givaudan 等^[1]从根际细菌生脂固氮螺菌(Azospirillum lipoferum)中发现的漆酶,作者发现该酶可以多种形

式存在,参与细胞的色素沉着和酚类化合物的利 用. 2000年, Alexandre 等^[2]基于已知的植物和真 菌漆酶保守氨基酸序列比对以及二级结构预测结 果,第一次比较明确地指出了漆酶在细菌中广泛存 在. 由于细菌的基因工程和蛋白质工程操作简单、 快速,成本低,所以虽然细菌漆酶发现较晚,但却 显示出特有的应用优势,预示着其具有独特的、不 可替代的工业应用价值^[3].我国对漆酶的研究还十 分有限,并主要集中在真菌漆酶上,对细菌漆酶的 研究就更少. 随着国际上对漆酶研究的不断深入, 产漆酶或拟漆酶的细菌被陆续发现^[4],包括来自常 见的大肠杆菌和枯草杆菌,同时其相应的编码基因 也被陆续克隆^[5-6].我们综述了近年来关于细菌漆 酶在催化特性和工业应用优势等方面的研究进展, 旨在为更好地将细菌漆酶应用于多个工业领域中提 供必要的依据和指导.

1 细菌漆酶的分子组成与结构特性

在分子组成上,细菌漆酶较单一,没有糖基化 的修饰,这与其它漆酶截然不同,如真菌漆酶中糖 组分约占分子质量的10%~49%甚至更高^[5,7].在 分子构成上,绝大多数细菌漆酶为单体酶,分子由 一条肽链构成,大约含有500~600个氨基酸残基, 只有个别的细菌漆酶为寡聚酶,如来自Streptomyces griseus 和来自Azospirillum lipoferum 的漆酶,分别为 均一三聚体和非均一的三聚体^[1,5,8-9].所以,总体 上细菌漆酶较其它来源的漆酶组成简单,分子量相 对小.

大多数细菌漆酶分子含有4个铜离子,少数细

收稿日期: 2014-01-14;修回日期: 2014-01-23.

基金项目: 吉林省科技厅计划项目(20140101020JC)资助.

作者简介:高键(1984-),男,博士研究生.

^{*} 通讯联系人, E-mail: yingjiu @ jlu. edu. cn.

菌漆酶分子中的部分铜离子被锌离子或铁离子取 代.与其它来源的漆酶相似,根据磁学和光谱学特 征,细菌漆酶分子中的4个铜离子可以被分为3 类:即1个Ⅰ型铜离子(T1Cu²⁺)、1个Ⅱ型铜离子 (T2Cu²⁺)和2个Ⅲ型铜离子(T3Cu²⁺或T3Cu²⁺-Cu²⁺T3).虽然细菌漆酶的铜离子配位特性具有漆 酶家族的共性,但其铜离子的结合位点与分布却与 其它漆酶有所不同.T1Cu²⁺与2个His,1个Cys和 1个Met形成配位键,其中CysHis2连接位点是必 需的,而Met只在个别的细菌漆酶中被其它氨基酸 如Phe、Leu或Glu取代,但该位点在真菌和植物漆 酶中较多见的却是Phe或Leu^[10].T1Cu²⁺与Cys形 成配位键(CysS→Cu²⁺)后,强烈的电子吸收表现在 大约 610 nm 处有特征吸收峰, 使漆酶分子呈蓝色. 凡是缺少 T1Cu²⁺的漆酶, 酶蛋白不显蓝色.

一种来自枯草芽孢杆菌的漆酶 1GSK 是细菌漆 酶的代表^[11],也是目前研究得最详细的细菌漆酶, 其分子中4个铜离子的结合位点和光谱学特征如表 1 所示.通过序列对比我们发现,在 1GSK 及大多 数细菌漆酶分子中,与4个铜离子配位的 12 个氨 基酸残基[1个 Cys、1个 Met 和 10个 His]所在的氨 基酸序列是相对保守的,形成细菌漆酶分子中特定 的4个氨基酸序列保守区(C1~C4),它们的分布 与序列特性与真菌和植物漆酶的保守序列有所不 同^[3,5].我们通过综合分析归纳出细菌漆酶分子4 个高度保守序列区如表2所示,所有与4个铜离子

Table 1 The binding sites and the spectral features of copper ions in 1GSK										
Туре	Ι	П	∭ a	∏ b						
	① Cys492	① His105	① His155	① His107						
	② His419	② His422	② His424	② His153						
Ligand	(3) His497	③ H ₂ O	③ His493	③ His491						
	④ Met502	4) -	④ —0—	④—0—						
			Н	Н						
Absorption peak (nm)	$\sim 610($ blue $)$	no	330	330						

	表1	1GSK	中铜离	子结合	位点与	同谱学性质	Ì
--	----	------	-----	-----	-----	-------	---

表 2 细菌漆酶中四个高度保守的序列

Table 2 Four highly conserved sequences in bacterial laccases

Conserved signature sequences in bacterial laccases																	
C1	104	V	Н	W	Η	G	$(X)_{7}$	G	D	117							
		(L)		(L)													
		(I)		(I)													
#			П		III _b												
C2	151	W	Y	Н	D	Η	(X) ₁₁	G	L	Х	G	170					
					(P)												
#				${\rm I\!I\!I}_{\rm b}$		III a											
C3	419	Η	Р	Ι	Н	L	Н	424									
				(F)		(I)											
						(V)											
#		Ι			П		Ⅲ a										
C4	489	V	W	Н	С	Η	Ι	L	Е	H	Е	D	Х	Х	М	М	503
		(M)	(F)				(L)	(V)							(F)		
			(Y)												(L)		
#				III ₀	Ι	Ⅲ a				Ι					Ι		

#: Type of copper ion bonded with the shaded residue

: Residue bonded with copper ion

相配位的氨基酸残基全都包含在这4个保守序列中 (带阴影氨基酸残基),每个保守序列中至少有2个 残基与铜离子相配位.我们在从土壤中筛选的芽孢 杆菌 ZW2531.1 (16S RNA 登录号 EF567395.1)中 克隆到1种漆酶基因(ZGL3,GenBank 登录号 EU368579.1),其与1GSK 高度同源,而且分子中4 个铜离子的结合位点与1GSK 完全相同^[12].

由于细菌漆酶不存在糖基化修饰,较容易获得 天然酶的单晶,因此关于细菌漆酶三维结构的研究 进展比较迅速.目前来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)(PDB ID:1GSK、3ZDW)^[11,13]、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)(PDB ID:1KV7、3OD3)^[14-15]、脱 硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans*)(PDB ID: 1OFY)^[16]、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*) (PDB ID:3ZX1)^[17]、抗生链霉菌(*Streptomyces antibioticus*)(PDB ID:3CG8)^[18]、欧洲亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas europaea*)(PDB ID:3G5W)^[19]和嗜热 栖热菌(*Thermus thermophilus*)(PDB ID:2XU9)的漆 酶的晶体结构解析已陆续见报道,相应漆酶的空间 结构也已明确.

在一级结构上,不同来源的细菌漆酶,其氨基 酸序列相似性并不高,甚至低于 30%,但通过构象

的对比分析发现,细菌漆酶的空间结构具有高度的 相似性,以枯草芽孢杆菌漆酶和大肠杆菌漆酶的 3D 结构(PDB ID:1GSK、PDB ID:30D3)为例,如图 1 所示. 首先, 细菌漆酶均具有漆酶家族共有的拓 扑学构象特征,即由3个杯状(cupredoxin-like)结 构域(D1、D2、D3)组成,3者紧密结合形成漆酶的 球状构象(图1D1、D2、D3). 其次,细菌漆酶中的4 个铜离子形成了两个氧化还原中心(图1,圆圈部 分): T1Cu²⁺位于 D3 中, 并处于靠近分子表面较大 的凹槽内,形成1个单核的氧化还原中心,简称单 核中心(mononuclear centre, MNC), 底物分子在此 结合并被氧化;2个T3Cu²⁺(Cu₂⁴⁺)由1个羟基桥偶 联形成一个双核结构, 再与1个T2Cu²⁺形成1个三 核铜簇的氧化还原中心, 简称三核中心(trinuclear centre, TNC), 位于 D1 与 D3 之间, 并处于酶蛋白 中央空穴内,氧分子在此接受电子并形成了水分 子. 漆酶的这两个氧化还原中心有各自的底物通道 与分子表面相通(图1,曲箭头所示),各自的底物 和产物由此进入和离开氧化还原中心.显然,漆酶 的两个氧化还原中心主要与 D1 和 D3 有关, 而 D2 主要是起到连接 D1 和 D3, 并限定两个反方向的底 物通道的作用.



图 1 枯草芽孢杆菌漆酶(a, b)(引自 PDB ID:1GSK 并标注)与大肠杆菌漆酶(c) (引自 PDB ID:30D3 并标注)的 3D 结构

Fig. 1 3D structures of laccases from *Bacillus subtilis* (a, b) (cited from PDB ID:1GSK and marked) and from *E. coli* (c) (cited from PDB ID:3OD3 and marked)

细菌漆酶与其它漆酶在构象上的差异主要体现 在 MNC 部位,包括底物结合部位的大小、取向以及 周围肽段的密度与电荷分布.早在 2000 年 Gladys Alexandre 就根据细菌漆酶可能的三维结构模式提 出,细菌漆酶的底物结合口袋要比真菌和植物漆酶 的略大^[2](图2).2011 年 Dwivedi 等通过精确测定 后证实了细菌漆酶的底物结合腔要明显比真菌漆酶 和植物漆酶的大^[20],这也提示了细菌漆酶较真菌 或植物漆酶更能催化大分子底物的氧化.





细菌漆酶的另一个结构特征是,除了少数细菌 漆酶中存在二硫键外,多数细菌漆酶中不存在二硫 键,而真菌和植物漆酶中却普遍存在二硫键.如上 述提到的已获得晶体结构的多种细菌漆酶中,只有 来自枯草芽孢杆菌的漆酶(PDB ID:1GSK、3ZDW) 分子中存在1个二硫键(C322-C229),其余漆酶分 子中均不存在二硫键.虽然如此,但对比分析已报 道的漆酶构象发现,细菌漆酶的3个杯状结构域 (D1、D2、D3)较真菌和植物漆酶的相应部分折叠得 更紧密,这也许与细菌漆酶不存在糖基化修饰有 关,同时也反映出细菌漆酶分子中普遍存在较多的 盐键和离子键,由此推测细菌漆酶的构象更稳定.

此外,在有些革兰氏阴性菌(如大肠杆菌)的漆 酶中,还存在着富含 Met 的肽段(Met-rich region), 该肽段在空间上形成了1个位于分子表面并临近 MNC 的螺旋区,而该肽段在大多数革兰氏阳性菌 (如枯草杆菌)的漆酶中是不存在的.图1C为大肠 杆菌漆酶的三维结构^[15],图中箭头所示螺旋区即 为富含 Met 的肽段(355-396),而该段螺旋在图1A 中不存在.革兰氏阴性菌漆酶中这种富含 Met 的肽 段使该漆酶对铜离子有较高的亲和性,被认为与转 运和耐受铜离子有关^[21-24].

细菌漆酶分子中的两个氧化还原中心(MNC、 TNC)形成了相对保守的三维结构部分,其结构特 性,尤其是 MNC 的结构特性决定了细菌漆酶的氧 化还原电位的高低,而后者又与这些漆酶的催化活 性成正相关^[25].多数细菌漆酶属于低氧化还原电 位漆酶^[26],这在一定程度上限制了天然细菌漆酶 的应用.

2 细菌漆酶的功能与催化特性

与其它来源的漆酶不同,多数细菌漆酶属于胞 内酶,但也有个别的细菌漆酶以周质酶(如 CueO)、 分泌酶^[27-28]或芽孢酶(如 CotA)的形式存在,这主 要与细菌漆酶的生物功能有关.细菌漆酶主要参与 芽胞色素的形成和抵御紫外线及过氧化氢等的损 伤^[29]、铜离子的运转和耐受^[30],并可能与细菌的 抗药性有关^[2,4],而植物漆酶主要参与木质素的生 物合成、创伤愈合和铁离子的氧化,真菌漆酶主要 参与木质素的降解、色素沉着和子实体的形成.

漆酶的催化过程是单电子氧化过程,如图3所示.单核中心的T1Cu²⁺是初始电子捕获位点,它的还原是漆酶催化过程的限速步骤.还原性底物的4个电子被T1Cu²⁺捕获后形成半醌类产物,电子通过与T1Cu²⁺相配位的His-Cys-His路径又被三核中心的T2Cu²⁺和T3Cu₂⁴⁺捕获,最后被氧分子获得,氧分子被还原为水.所形成的半醌类产物离开酶分子后可继续进行其它非酶促的分解、转化或聚合反应.



图 3 漆酶中两个氧化还原中心的功能示意图 Fig. 3 Schematic function of the two redox centres in laccase

虽然细菌漆酶的催化过程与其它漆酶相似(图 3),但细菌漆酶属于简单酶,无糖基化修饰,因此 它的反应动力学与真菌和植物漆酶是不同的.细菌 漆酶催化反应的速率主要取决于两方面的因素: (1)底物与单核中心的空间排布,即底物是否容易 进入酶分子表面较大的凹槽内并与 T1Cu²⁺靠近.细 菌漆酶的单核中心凹槽空间较大,能容纳体积较大 的底物,所以从分子量方面考虑,细菌漆酶的底物 范围相对较宽.(2)底物与 T1Cu²⁺的氧化还原电位 之差(ΔE^0),即漆酶能够催化氧化还原电位比 T1Cu²⁺低的底物发生氧化反应,而且两者的氧化还 原电位差越大,在动力学上越利于漆酶的催化.基 本上, ΔE^0 决定电子转移的速率.目前发现漆酶的 氧化还原电位均在 0.4~0.8 V 范围,国际上将其 分为两类:高氧化还原电位的漆酶(0.6~0.8 V)和 低氧化还原电位的漆酶(0.4~0.6 V).天然细菌漆 酶通常为低氧化还原电位的漆酶.而由于细菌漆酶 的氧化还原电位通常较低,T1Cu²⁺的 E⁰ 基本上在 0.45~0.54 V 范围,所以从氧化还原电位方面考 虑,细菌漆酶的底物范围又相对较窄,通常它只能 直接作用氧化还原电位更低的底物的氧化.然而, 不论哪种漆酶,其氧化还原电位通常高于其它的多 铜氧化酶.

漆酶真正的底物是酚类、芳香族或脂肪族的胺 类和它们的大分子复合多聚物,如木质素和腐殖 酸,以及大分子的非酚型复合多聚物,如非酚型木 质素,因此漆酶的底物专一性都不是很高,可催化 的底物种类均较广泛,这也是漆酶在生物技术应用 中引起广泛关注的主要原因.依据 2006 年 Riva 等^[31]提出的漆酶的反应模式,细菌漆酶主要以下 列两种模式实现对底物的催化氧化(图4).



cycles for substrates oxidation in the presence of chemical mediators (refer to ref. 31).

在上述两种模式中,细菌漆酶直接催化氧化的 物质不是其真正的底物分子,而是(中)介体(mediator, Med),它在漆酶的催化下可形成稳定而更高 电位的氧化态自由基,后者离开酶后能够自发氧化 真正的底物,并实现自身复原(还原态).在第2种 模式中,除了需要中介分子参与外,还需要有以黄 素为辅基的脱氢酶介导电子的传递,才能实现真正 底物的氧化.

不论哪种模式,在有氧分子存在的条件下,漆 酶和介体构成了强氧化势能的"漆酶/介体"体系, 能够氧化漆酶自身不能氧化的高氧化还原电位的底 物,如非酚型木素化合物的氧化^[32-33],形成稳定而 更高电位的氧化态介体.稳定的氧化态介体离开酶 的活性中心后,便可与底物分子发生自动氧化还原 交换(在两者氧化还原电位差的驱动下),最终底物 被氧化,中介分子被还原.在这里小分子的介体不 但在漆酶与底物之间充当了电子穿梭体(electron shuttle).实际上,介体或还有黄素酶的参与扩大了 细菌漆酶的底物范围,也拓宽了细菌漆酶的应用领 域^[34-35].合适的介体是细菌漆酶发挥催化功能的 有力保障.

细菌漆酶较适宜的作用温度普遍比较宽,在 40~70℃范围内均具有良好的催化活性,而来自 耐热菌(Thermotolerant bacteria)、嗜热菌(Thermophilic bacteria) 或极端嗜热菌(Thermus thermophilus) 的漆酶可耐受高达 90 ℃ 甚至更高的温度[36-39]. 从早期 Martins 等^[40] 报道的枯草芽孢杆菌漆酶 CotA 到我们获得的芽孢杆菌漆酶 ZGL3^[12],几乎 所有来自芽孢杆菌和非芽孢嗜热菌的漆酶最适催化 温度都在 60~75 ℃范围, 而在 80 ℃时它们的半衰 期可达2~14 h,这说明来自芽孢杆菌或非芽孢嗜 热菌的细菌漆酶普遍具有较高的热稳定性,而且远 比大多数真菌漆酶的热稳定性要高[41-43],但其余 的细菌漆酶在热稳定性上差别较大,有的细菌漆酶 在80℃时半衰期只有几分钟^[43].显然,细菌漆酶 普遍较真菌漆酶的热稳定性要高,后者的作用温度 一般在 25~50 ℃之间,通常不超过 40 ℃,而在 60℃以上便完全失活了,只有少数真菌漆酶较耐 热,甚至达到芽孢杆菌漆酶的耐热程度.细菌漆酶 的耐热特性可能与其分子网络中普遍形成了相对较 多的盐键和离子键有关, 而似乎与二硫键关系不 大,因为多数细菌漆酶中不存在二硫键. 2011年 Fernandes 等^[44]采用常规点突变的方法分析了枯草 芽胞杆菌漆酶(CotA)分子中二硫键的作用 (C322A),发现二硫键的存在对其分子的整体构象 和热稳定性没有影响,但却对 T1Cu²⁺的掺入速率有 影响.

细菌漆酶适宜催化的 pH 范围也较宽,一般可 在 pH 4.0~9.0 范围起作用,有些细菌漆酶还可在 更极端的 pH 条件下起作用,这主要取决于酶的来 源和底物的类别,如来自嗜碱或耐碱细菌(Alkalophilic/alkalotolerant bacteria)的漆酶在 pH 10.0 或更 极端的条件下仍能保持较好的活性^[36],我们获得 的细菌漆酶 ZGL3 催化 ABTS (Diammonium2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)、DMP(2,6-Dimethoxyphenol)的最适 pH 值分别为 4.0 \7.5^[12], 而多数来自真菌或植物的漆酶却适宜在 pH 4.0~ 6.0环境下起作用. 2003 年 Bains 等曾从工厂的排 污中分离出一种耐碱细菌,在 pH 6~10 的范围内 都可以较好的生长,并且在 pH 10 的条件下漆酶产 量最高^[45].近年来,越来越多的耐碱细菌漆酶被 发掘,并显示了它们纺织和造纸工业中的应用价 值^[46-48].

多数细菌漆酶还能耐受较高的盐浓度,有的甚至在高达1 mol NaCl 的环境中仍能保持良好的活性^[49],这一特性也使细菌漆酶的应用价值明显增大.不同的细菌漆酶,所耐受的盐离子种类是不同的,有的是针对阳离子,有的是针对阴离子,但细菌漆酶普遍具有良好的卤族离子耐受性^[36,48-49].揭示这些酶的酶学特性,才能在相应的领域中有针对性地对其加以应用.研究者们在如何更好地应用细菌漆酶方面进行了许多探索,为这些漆酶的工业应用提供了理论指导和基础^[36].

3 细菌漆酶的工业应用优势

虽然漆酶总体上可广泛应用于许多领域,包括 农业、工业、环保、医药、卫生等^[26],但细菌漆酶在 适宜或可耐受的催化条件方面普遍具有耐温、耐碱 和耐盐的催化特性,这使得细菌漆酶更适用于生态 环境保护与修复、纸浆脱色与纺织染料处理等^[36]. 此外,目前已发现有百余种化合物可用作为细菌漆 酶的介体,这在一定程度上拓宽了细菌漆酶的应用 范围,提高了细菌漆酶的应用价值^[34,50].细菌漆 酶主要适合应用于以下领域:

(1)环保——环境污染物的降解

工业三废、化学农药分解时往往产生有毒的酚 类或芳胺类物质.近几年来细菌漆酶越来越多地被 用来降解这些对自然环境造成严重污染的污染物、 有毒物以及环境激素类物质.由于工业废水的酸碱 度多在 pH 6.0~9.0 范围,而且含有高浓度的卤族 离子或其它盐离子,多数真菌漆酶不适用,但细菌 漆酶却适用,尤其是针对含有酚类物质的污染物, 细菌漆酶要比真菌漆酶更有效^[50].在治疗这些工 业污染的过程中,细菌漆酶的耐热、耐碱、耐盐或耐 卤族离子的特性得到了很好的发挥.

(2) 造纸——纸浆的生产[51]

造纸工业中制浆是除去木材中的木质素,降低 纤维间的结合力使之离解成浆.应用漆酶等选择性 地降解木质素生产纸浆,对纸浆进行生物漂白,可 以使生产在较温和的条件下进行,同时不会产生有 毒物质给环境带来污染,比传统工艺节能、环保, 并且不会损伤纸浆中的纤维素和半纤维素组分,还 可提高纸浆质量.目前漆酶在这一领域有着重要的 应用.与此同时,造纸业产生的有色污水的处理也 离不开细菌漆酶,尤其是针对还有酚类组分的废水 的处理,通常需要耐热、耐碱、耐盐的漆酶^[52],显 然细菌漆酶较其它漆酶更有优势.

(3) 纺织工业——织品的脱色

合成染料在设计时都要求具有较强的耐受性、 防水、抗光、抗氧化性,因此使用常规的物理、化学 方法脱色很难达到脱色效果.漆酶对蒽醌类染料具 有选择性,可直接催化其氧化脱色,而且其脱色和 降解程度与漆酶活性呈正比.例如我们获得的漆酶 ZGL3 在无介体时,就能有效使 RBBR (Remazol Brilliant Blue R)、刚果红和靛蓝胭脂红脱色,而当 存在介体时,它还能使难脱色的甲基红和结晶紫脱 色,显示出该漆酶在染料的脱色和处理中绿色应用 价值^[12].由于纺织工业中染料的脱色通常需要在 pH 9.0,60 ℃以上进行,显然多数细菌漆酶较真菌 漆酶更适用^[52].

研究还发现,若将细菌漆酶如 CotA 与其他相 关酶如偶氮还原酶协同作用,可极大地提高其脱色 和解毒的效果^[33].

此外,细菌漆酶作为一种工业用酶制剂在应用 上的另一个优势是容易制备,不需要糖基化修饰的 特点使得细菌漆酶可利用原核表达系统如大肠杆菌 或枯草杆菌表达系统实现高水平的活性表达,不论 是胞内表达还是分泌表达,均有较高的表达效率. 不仅如此,大量的研究还显示,细菌漆酶的定向分 子是一种有效的功能优化途径^[5,37,48,54-55],甚至 还可同时提高其表达水平^[56],显然细菌漆酶的这 种分子改造和工程化制备的优势是其它漆酶难以具 备或实现的.鉴于细菌漆酶的强实用性和具有原核 高水平表达的优势,不论是来自陆地的还是海洋的 细菌漆酶,探索其规模化制备已成为人们关注的 热点.

4 展望

漆酶是土壤中最丰富的木质素酶,在生态系统 中发挥着重要作用.事实上,漆酶的底物中有许多 也能被过氧化物酶催化氧化,但与过氧化物酶不同 的是,漆酶催化的反应过程中并不产生有害的过氧 化氢和活性氧(ROS),而是产生醌或半醌等强抗氧 化剂,是非常绿色的反应.因此漆酶有"蓝色的酶 催化绿色的反应"之美誉^[36].这也是当今漆酶被 认为是最有应用前景的木素酶的主要原因.细菌漆 酶以其特有的环境耐受和工程化制备简单的突出特 性必将在人类社会的许多领域中发挥出明显"绿 色"功效和"蓝色"优势.

总之,关于细菌漆酶的理论与应用研究还有待进一步深入.虽然发现的天然细菌漆酶资源很多^[4,57],但与真菌漆酶相比,迄今克隆的细菌漆酶 基因还很有限,而在已发现的漆酶中,细菌漆酶目 前仅约占9%,而系统研究的细菌漆酶就更少.在 细菌漆酶中,迄今研究比较深入的是枯草芽孢杆菌 (*B acillus subtilis*)的芽孢漆酶 CotA、大肠杆菌(*E. coli*)的漆酶 CueO、超嗜热菌(*Aquifex aeolicus*)和嗜 热栖热菌(*Thermus thermophilus*)中的漆酶.尽管有 些细菌漆酶已实现工程化制备和工业应用^[58],但 筛选或创建高氧化还原电位的优良细菌漆酶,并构 建遗传稳定的高效工程菌株,以提高细菌漆酶在工 业上的广泛应用仍然是今后努力的方向.

参考文献:

- Givaudan A, Effosse A, Fanre D, et al. Polyphenol oxidase in Azospirillum lipoferum isolated from rice rhizosphere[J]. FEMS Microbiol Lett, 1993, 108(2): 205-210.
- [2] Alexandre G, Zhulin L B. Laccases are widespread in bacteria[J]. Trends Biotechnol, 2000, 18(2): 41-42.
- [3] Sharma P, Goel R, Capalash N. Bacterial laccases [J].
 World J Microbiol Biotechnol, 2007, 23: 823-832.
- [4] Kellner H, Luis P, Zimdarsa B, et al. Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland cambisol soil samples [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40: 638-648.
- [5] Claus H. Lassases and their occurrence in prokaryotes[J]. Arch Mierobiol, 2003, 179(3): 145-150.
- [6] Santhanam N, Vivanco J M, Decker S R, et al. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style
 [J]. Trends Biotechnol, 2011, 29(10): 480-489.
- Slomczynski D, Nakas J P, Tanenbaum S W. Production and characterization of laccase from botrytis cinerea 61 – 34[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 907-912.
- [8] Diamantidis G, Effosse A, Potier P, *et al.* Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium azospirillum lipoferum [J]. *Soil*

Biology & Biochemistry, 2000, 32: 919-927.

- [9] Endo K, Hayashi Y, Hibi T, et al. Enzymological characterization of Epo A, a laccase-like phenol oxidase produced by streptomyces griseus [J]. J Biochem, 2003, 133:671-677.
- [10] Kumar S V, Phale P S, Durani S, Wangikar P P. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83(4): 386-394.
- [11] Enguita F J, Martins L O, Henriques A O, et al. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (21):19416-19425.
- [12] 张应玖,高键,关可兴. 嗜温漆酶基因和嗜温漆酶及 其应用[P]:中国,201310498465.X. 2013-10-22.
- [13] Enguita F J, Marçal D, Martins L O, et al. Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from Bacillus subtilis [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (22): 23472-23476.
- [14] 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 co-li[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(5): 2766–2771.
- [15] Singh S K, Roberts S A, McDevitt S F, et al. Crystal structures of multicopper oxidase CueO bound to copper (I) and silver (I): functional role of a methionine-rich sequence[J]. J Biol Chem, 2011, 286 (43): 37849-37857.
- [16] Bento I, Teixeira V H, Baptista A M, et al. Redox-bohr and other cooperativity effects in the nine-heme cytochrome C from desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774: crystallographic and modeling studies [J]. J Biol Chem, 2003, 278(38):36455-36469.
- [17] Silva C S, Durão P, Fillat A, et al. Crystal structure of the multicopper oxidase from the pathogenic bacterium campylobacter jejuni CGUG11284: characterization of a metallo-oxidase[J]. Metallomics, 2012, 4(1): 37-47.
- [18] Skálová T, Dohnálek J, Ostergaard L H, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the small laccase from streptomyces coelicolor [J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2007, 63 (Pt 12):1077-1079.
- [19] Lawton T J, Sayavedra-Soto L A, Arp D J, et al. Crystal structure of a two-domain multicopper oxidase: implications for the evolution of multicopper blue proteins[J]. J Biol Chem, 2009, 284(15): 10174-10180.

- [20] Dwivedi U N, Singh P, Pandey V P, et al. Structurefunction relationship among bacterial, fungal and plant laccases[J]. J Mol Catal B-Enzym, 2011, 68: 117-128.
- [21] Roberts S A, Wildner G F, Grass G, et al. A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO[J]. J Biol Chem, 2003, 278 (34): 31958-31963.
- [22] Arnesano F, Banci L, Bertini I, et al. Solution structure of CopC: A cupredoxin-like protein involved in copper homeostasis[J]. Structure, 2002, 10(10): 1337-1347.
- [23] Long F, Su C C, Zimmermann M T, et al. Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport [J]. Nature, 2010, 467 (7314): 484-488.
- [24] Su C C, Long F, Yu E W. The Cus efflux system removes toxic ions via a methionine shuttle [J]. Protein Sci, 2011, 20(1): 6-18.
- [25] Xu F, Shin W, Brown S H, et al. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1292(2): 303-311.
- [26] Mikolasch A, Schauer F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(4): 605-624.
- [27] Senan R C, Abraham T E. Bioremediation of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium [J]. Biodegradation, 2004, 15(4): 275-280.
- [28] Telke A A, Ghodake G S, Kalyani D C, et al. Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a Bacillus sp. ADR[J]. Bioresour Technol, 2011, 102(2): 1752-1756.
- [29] Hullo M F, Moszer I, Danchin A, et al. CotA of Bacillus subtilis is a copper-dependent laccase[J]. J Bacteriol, 2001, 183(18): 5426-5430.
- [30] Lee S M, Grass G, Rensing C, et al. The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in Escherichia coli[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 295 (3): 616-620.
- [31] Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry[J]. Trends Biotechnol, 2006, 24(5): 219-226.
- [32] Bourbonnais R, Paice M G, Freiermuth B, et al. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(12): 4627-4632
- [33] Husain M, Husain Q. Applications of redox mediators in

the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: a review [J]. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 2008, **38**:1-42.

- [34] Kudanga T, Nyanhongo G S, Guebitz G M, et al. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review [J]. Enzyme Microb Technol, 2011, 48(3): 195-208.
- [35] Reiss R, Ihssen J, Thöny-Meyer L. Bacillus pumilus laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum [J]. BMC Biotechnol, 2011, 11: 9.
- [36] Singh G, Sharma P, Capalash N. Performance of an alkalophilic and halotolerant laccase from gamma-proteobacterium JB in the presence of industrial pollutants
 [J]. J Gen Appl Microbiol, 2009, 55(4): 283-289.
- [37] Zheng Z, Li H, Li L, et al. Biobleaching of wheat straw pulp with recombinant laccase from the hyperthermophilic thermus thermophilus [J]. Biotechnol Lett, 2012, 34 (3): 541-547.
- [38] Lu L, Zhao M, Wang T N, et al. Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from bacillus licheniformis LS04[J]. Bioresour Technol, 2012, 115: 35-40.
- [39] Zheng Z, Li H, Li L, et al. Biobleaching of wheat straw pulp with recombinant laccase from the hyperthermophilic thermus thermophilus [J]. Biotechnol Lett, 2012, 34: 541-547.
- [40] Martins L O, Soares C M, Pereira M M, 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]. J Biol Chem, 2002, 277: 18849-18859.
- [41] Miyazaki K. A hyperthermophilic laccase from thermus thermophilus HB27[J]. Extremophiles, 2005, 9: 415-425
- [42] Fernandes A T, Soares C M, Pereira M M, et al. A robust metallo-oxidase from the hyperthermophilic bacterium aquifex aeolicus [J]. FEBS J, 2007, 274: 2683-2694
- [43] Hildén K, Hakala T K, Lundell T. Thermotolerant and thermostable laccases [J]. Biotechnol Lett, 2009, 31 (8): 1117-1128.
- [44] Fernandes A T, Pereira M M, Silva C S, et al. The removal of a disulfide bridge in CotA-laccase changes the slower motion dynamics involved in copper binding but has no effect on the thermodynamic stability [J]. J Biol Inorg Chem, 2011, 16(4): 641-651.
- [45] Bains J, Capalash N, Sharma P. Laccase from a non-

melanogenic, alkalotolerant gamma • proteobacterium JB isolated from industrial wastewater drained soil[J]. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(14): 1155–1159.

- [46] Fang Z M, Li T L, Chang F, et al. A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability [J]. Bioresour Technol, 2012, 111: 36-41.
- [47] Zhang C, Zhang S, Diao H, et al. Purification and characterization of a temperature- and pH-stable laccase from the spores of bacillus vallismortis fmb-103 and its application in the degradation of malachite green [J]. Agric Food Chem, 2013, 61(23): 5468-5473.
- [48] Ye M, Li G, Liang W Q, et al. Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived multicopper oxidase with alkaline laccase activity and highly soluble expression[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 87 (3): 1023-1031.
- [49] Fang Z, Li T L, Wang Q, et al. A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89(4): 1103-1110.
- [50] Reiss R, Ihssen J, Thöny-Meyer L. Bacillus pumilus laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum[J]. BMC Biotechnol, 2011, 11: 9.
- [51] Virk A P, Sharma P, Capalash N. Use of laccase in pulp and paper industry[J]. Biotechnol Prog, 2012, 28 (1): 21-32.
- [52] Held C, Kandelbauer A, Schroeder M, et al. Biotrans-

formation of phenolics with laccase containing bacterial spores [J]. *Environ Chem Lett*, 2005, **3**: 74–77.

- [53] Mendes S, Farinha A, Ramos C G, et al. Synergistic action of azoreductase and laccase leads to maximal decolourization and detoxification of model dye-containing wastewaters [J]. Bioresour Technol, 2011, 102 (21): 9852-9859.
- [54] Mollania N, Khajeh K, Ranjbar B, et al. An efficient in vitro refolding of recombinant bacterial laccase in Escherichia coli [J]. Enzyme Microb Technol, 2013, 52 (6/ 7):325-330.
- [55] Mohammadian M, Fathi-Roudsari M, Mollania N, et al. Enhanced expression of a recombinant bacterial laccase at low temperature and microaerobic conditions: purification and biochemical characterization [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2010, 37(8): 863-869.
- [56] Nasoohi N, Khajeh K, Mohammadian M, Ranjbar B. Enhancement of catalysis and functional expression of a bacterial laccase by single amino acid replacement[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, **60**: 56-61.
- [57] Auseca L, van Elsas J D, Mandic-Mulec I. Two- and three-domain bacterial laccase-like genes are present in drained peat soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(5): 975-983.
- [58] Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, et al. Heterologous laccase production and its role in industrial applications
 [J]. Bioeng Bugs, 2010, 1(4): 252-262.