

赵丹 著

真菌漆酶及其 工业应用



黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS



真菌漆酶及其 工业应用

赵丹 著



黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

真菌漆酶及其工业应用 / 赵丹著. -- 哈尔滨 : 黑龙江大学出版社, 2015.3

ISBN 978 - 7 - 81129 - 838 - 3

I. ①真… II. ①赵… III. ①氧化还原酶 - 研究
IV. ①Q554

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 271308 号

真菌漆酶及其工业应用

ZHENJUN QIMEI JI QI GONGYE YINGYONG

赵 丹 著

责任编辑 魏翕然 李 卉
出版发行 黑龙江大学出版社
地 址 哈尔滨市南岗区学府路 74 号
印 刷 哈尔滨市石桥印务有限公司
开 本 880 × 1230 1/32
印 张 7.625
字 数 165 千
版 次 2015 年 3 月第 1 版
印 次 2015 年 3 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978 - 7 - 81129 - 838 - 3
定 价 22.00 元

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

目 录

第一篇 漆酶研究进展

第一章 漆酶及其来源	3
1.1 漆酶的定义	3
1.2 漆酶的来源	4
第二章 漆酶的性质	8
2.1 漆酶的相对分子质量	8
2.2 漆酶的等电点、最适反应温度与 pH 值	8
2.3 影响漆酶活性的因素	9
第三章 漆酶的结构与催化机理	10
3.1 漆酶的活性中心	10
3.2 漆酶的高级结构	11
3.3 漆酶的催化机理	12
第四章 微生物漆酶的合成与诱导	16
4.1 漆酶的合成位置	16

4.2	漆酶的诱导	16
第五章	漆酶的分子生物学研究	18
5.1	漆酶的氨基酸序列	18
5.2	漆酶基因的克隆	19
5.3	漆酶基因的表达	19
第六章	漆酶的应用	21
6.1	木质素降解	21
6.2	环境修复	22
6.3	染料脱色与解毒	22
6.4	其他应用	23
第七章	漆酶的电化学研究	24
7.1	漆酶的生物电催化	24
7.2	漆酶修饰电极	25
7.3	漆酶在电化学领域的应用	32
7.4	结语	34
	参考文献	36

第二篇 真菌漆酶的制备与应用实例

第一章	本研究的目的、内容与意义	75
1.1	研究目的	75
1.2	研究内容与意义	75
第二章	产漆酶真菌的分离与鉴定	77
2.1	实验材料	78

2.2	实验方法	82
2.3	结果与分析	87
2.4	讨论	90
2.5	本章小结	92
第三章	<i>M. verrucaria</i> NF - 05 产漆酶条件研究	93
3.1	实验材料	94
3.2	实验方法	95
3.3	结果与分析	98
3.4	讨论	126
3.5	本章小结	129
第四章	<i>M. verrucaria</i> NF - 05 胞外漆酶的诱导	130
4.1	实验材料	131
4.2	实验方法	135
4.3	结果与分析	136
4.4	讨论	143
4.5	本章小结	146
第五章	<i>M. verrucaria</i> NF - 05 漆酶的纯化及其生化、 光谱学和酶学性质	148
5.1	实验材料	149
5.2	实验方法	150
5.3	结果与分析	156
5.4	讨论	173
5.5	本章小结	178

第六章	<i>M. verrucaria</i> NF-05 漆酶对合成染料的 脱色及酚胺类物质的转化	180
6.1	实验材料	181
6.2	实验方法	182
6.3	结果与分析	184
6.4	讨论	203
6.5	本章小结	207
第七章	<i>M. verrucaria</i> NF-05 漆酶的电化学性质	209
7.1	实验材料	210
7.2	实验方法	211
7.3	结果与分析	212
7.4	讨论	220
7.5	本章小结	221
第八章	结论	223
	参考文献	226

第一篇

漆酶研究进展

第一章 漆酶及其来源

1.1 漆酶的定义

漆酶,即对苯二酚双氧氧化还原酶(laccase, *p* - diphenol: dioxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2),是一种含铜的多酚类氧化还原蛋白。漆酶因其活性中心含有铜离子,因此与细胞色素C氧化酶(cytochrome C oxidase)、L - 抗坏血酸氧化酶(L - ascorbate oxidase)、血浆铜蓝蛋白(ceruloplasmin)、胆红素氧化酶(bilirubin oxidase)和吩噻嗪酮合成酶(phenoxazinone synthase)一起被归为蓝多铜氧化酶(Blue Multi-Copper Oxidases, BMCOs)家族。漆酶具有较强的底物专一性,能够催化多种酚类、胺类及芳香类化合物,同时伴随一步四电子反应,能环境友好地将氧分子还原为水。目前漆酶已在环境修复、污染物降解、染料脱色与解毒、纺织印染、分析监测、生物电子设备研发等领域得到广泛应用。

1.2 漆酶的来源

漆酶由日本学者于 1883 年首次在紫胶漆树 (*Rhus vernicifera*) 的浸出液中发现,后来被发现广泛存在于自然界的动物、植物及微生物中,具有多种生理及生态学功能。

1.2.1 动物漆酶

漆酶在动物的表皮、中肠、唾液腺、胰腺和生殖器官组织中都曾被发现,与动物体的形态发生、免疫及生殖等功能密切相关。昆虫漆酶能够将邻苯二酚磷二酚转化为相应的苯醌类物质,进而催化昆虫表皮蛋白的交联反应。Dittmer 等人分别克隆了烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 和冈比亚疟蚊 (*Anopheles gambiae*) 漆酶的三条 cDNA 序列,利用 RT-PCR (反转录 PCR) 技术研究了其在昆虫表皮骨化中的作用。Hattori 等人的研究表明,水稻黑尾叶蝉 (*Nephotettix cincticeps*) 中存在着具有酚氧化酶活性的漆酶蛋白,参与唾液鞘凝结过程,同时可以将植物类食物中的酚类进行解毒。Luna-Acosta 等人发现太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 血浆中存在一种酚氧化酶类的漆酶蛋白,与软体动物抗细菌侵扰有关。

1.2.2 植物漆酶

植物漆酶均为胞外单体蛋白,糖基含量在 22%~45% 之间。漆树漆酶是研究最为深入、广泛的植物漆酶,存在于漆树表皮的汁液中,通过自由基取代和亲电取代作用,催化漆酚 (urushiol)

聚合为含有二苯基和芳香基侧链的漆类(lacquer)物质,从而促进漆树损伤表皮的愈合。此外研究者在野漆树(*Rhus succedanea*)、大槭树(*Acer pseudoplatanus*)、火炬松(*Pinus taeda*)、杨树(*Populus euramericana*)、鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)和玉米(*Zea mays*)等高等植物中也发现了漆酶。植物漆酶大多位于植物木质部组织的细胞壁中,主要功能是参与木质素的合成,即催化木质素结构单体的自由基,如香豆醇(*p*-coumaryl alcohols)、松柏醇(coniferyl alcohols)和芥子醇(sinapyl alcohols)等,使其聚合为双体或三体。

1.2.3 微生物漆酶

大部分高等真菌中的子囊真菌(Ascomycetes)和担子真菌(Basidiomycetes)具有胞外漆酶活性。子囊真菌漆酶主要有四个来源:一是植物致病菌,如小麦纹枯病菌(*Gaeumannomyces graminis*)和稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*);二是土壤中的曲霉菌属(*Aspergillus*)、弯孢霉菌属(*Curvularia*)和青霉菌属(*Penicillium*);三是净水中的某些菌属;四是某些木腐菌(wood-rotting fungi),如木霉属(*Trichoderma*)和葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)。在担子真菌中,几乎所有的木腐菌均具有漆酶活性,如褐腐菌中的绵腐卧孔菌(*Postia placenta*)和粉孢革菌(*Coniophora puteana*);白腐菌(*Termetes versicolor*)中的密褐褶菌(*Gloeophyllum trabeum*)、偏肿拟栓菌(*Pseudotrametes gibbosa*)和多带革孔菌(*Coriolopsis polyzona*)。某些真菌可以与特定的植物根系形成相互作用的共生联合体,即菌根。近年来研究者在外生菌根真菌(ectomycorrhizal fungi, ECM fungi)中纯化得到了有漆酶活

性的蛋白,如鸡油菌(*Cantharellus cibarius*)和双色蜡蘑(*Laccaria bicolor*)。

酵母菌是一类在自然界中占有重要地位的真菌。目前只有在人类致病菌新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)中纯化才能得到酵母漆酶,这种担子酵母蛋白能够氧化酚类和胺类物质,不能氧化色氨酸,能与细胞壁紧密结合,具有真菌剂抗性。虽然子囊酵母中尚未发现漆酶活性,但子囊酵母中酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞质膜上的多铜氧化酶蛋白(Fet3P),其序列、结构同源性,尤其是光谱学性质与真菌漆酶十分相似。

原核生物的细菌漆酶在底物范围、序列同源性、动力学特性和催化条件等方面与真菌漆酶相比存在着差异,因此其活性常被定义为类漆酶-多铜氧化酶(laccase-like multicopper oxidase, LMCO),简称类漆酶(laccase-like)。Givaudan 等人在一种固氮螺菌(*Azospirillum lipoferum*)中首次发现了原核生物类漆酶活性,这是一种由一个催化亚基和一至两个长链构成的多体蛋白,与细胞色素生成、微生物对植物中酚类物质的利用或电子传递过程有关。Solano 等人在一种能够形成黑色素的海洋单胞菌(*Marinomonas mediterranea*)中发现了两种多酚氧化酶,一种具有色氨酸酶活性,另一种具有类漆酶活性。此后研究者在多种原核细菌中发现了类漆酶活性,如丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)CopA 和大肠杆菌(*Escherichia coli*)PcoA 类漆酶蛋白均含有铜结合位点,与细菌的铜抗性密切相关;灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)EpoA 类漆酶蛋白参与微生物形态发生过程。

目前研究最为深入的细菌类漆酶是枯草芽孢杆菌的芽孢外衣(endospore coat)CotA 蛋白,由 *cotA* 基因编码,相对分子质量

约为 65 kDa。CotA 蛋白参与棕色芽孢色素的生物合成,并且赋予细菌特殊的紫外抗性、过氧化物抗性及耐热性。Enguita 等人成功地解析了 CotA 蛋白的晶体结构。目前研究者已经开始了 CotA 蛋白在染料降解及生物燃料电池制备等领域的应用研究。

第二章 漆酶的性质

2.1 漆酶的相对分子质量

漆酶是相对分子质量为 50 ~ 130 kDa 的球状单分子糖蛋白,不同来源的漆酶相对分子质量及化学组分差异较大。植物漆酶糖基组分约占其相对分子质量的 55%,主要成分为甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺和半乳糖,蛋白组分约占 45%。大部分真菌漆酶糖基含量较低,仅为 10% ~ 20%。灰霉菌(*Botrytis cinerea*)漆酶糖基含量高达 49%。去糖基化研究表明,糖基组分有助于维持蛋白质球状结构的稳定性,同时保护漆酶分子免受蛋白水解剂的侵害以及自由基的失活。当培养条件发生变化或在培养基中添加诱导物时,某些真菌能够产生相对分子质量不等的同工酶。大部分真菌漆酶是单体蛋白,并含有数量不等的蛋白亚基。

2.2 漆酶的等电点、最适反应温度与 pH 值

微生物漆酶与植物漆酶和动物漆酶相比,具有来源广、易纯

化、底物专一性宽泛,以及作用条件温和等优点,因此成为漆酶蛋白性质及应用研究的主要目标。真菌漆酶为酸性蛋白质,等电点 pI 在 2.6 ~ 7.4 之间,绝大部分集中在 4 左右。不同种属的真菌漆酶蛋白最适反应温度范围差异较大,如姬松茸 (*Agaricus blazei*) 漆酶在 20 ℃ 时稳定性最好,在 40 ℃ 时迅速失活;一株担子真菌 PM1 漆酶活性随温度升高而增强,在 60 ℃ 保温 1 h 后仍十分稳定,最适反应温度高达 80 ℃。真菌漆酶的最适作用 pH 值因底物种类不同而有所差异,大部分集中在 pH 值为 2 ~ 7 的酸性条件下。钟形花褶伞 (*Panaeolus campanulatus*) 漆酶以邻苯二甲酸二甲酯 (DMP) 为底物时,最适作用 pH 值为 8。细菌类漆酶多以芽孢漆酶形式进行研究,其最适反应温度范围较为宽泛,最适作用 pH 值在中性至碱性范围内。

2.3 影响漆酶活性的因素

金属离子对漆酶蛋白活性有很大影响。许多研究表明,低浓度的 Cu^{2+} 对漆酶活性有较大的促进作用, Na^+ 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 和 Mo^{6+} 等离子也能不同程度地促进漆酶活性。漆酶活性受常规蛋白抑制剂 (如叠氮化合物、SDS、DTT 和 EDTA 等) 抑制,卤族元素阴离子是漆酶的特异抑制剂。此外,漆酶溶液中随着有机溶剂 (如甲醇、乙醇、丙酮和乙腈等) 浓度的增加,蛋白活性逐渐下降。

第三章 漆酶的结构与催化机理

3.1 漆酶的活性中心

大部分漆酶分子的活性中心含有 4 个铜离子,可根据光谱学(spectroscopy)性质和电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)特征划分为 3 种类型: I 型铜离子即 T1Cu,单电子受体,在 610 nm 处有强烈的蓝色特征吸收峰,同时产生超精细耦合的 EPR 信号,呈顺磁性; II 型铜离子即 T2Cu,单电子受体,无特征光吸收,具有正常的 EPR 信号,呈顺磁性; III 型铜离子即 T3Cu,双核双电子受体,在 330 nm 处有较弱的光吸收带,无 EPR 信号,呈反磁性,与 T2Cu 构成三核铜簇(TNC)。某些漆酶活性中心含有铜离子以外的其他金属,由于不含有蓝色的 T1Cu,因此被称为白色漆酶(white laccase),如平菇(*Pleurotus ostreatus*)同工酶 POXA1w 活性中心含有 1 个铜离子、1 个铁离子和 2 个锌离子;木层孔菌(*Phellinus ribis*)漆酶含有 1 个铜离子、1 个锰离子和 2 个锌离子。糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)漆酶虽然含有 T1Cu,但在 610 nm 处无蓝色特征吸收峰,因此定义为黄色漆酶(yellow laccase)。射脉菌(*Phlebia radiata*)只含有