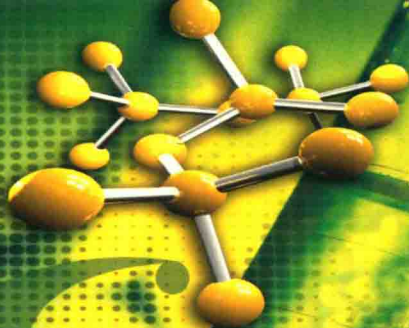




芽孢漆酶的研究

汪春蕾 卢 磊 赵 敏 著



东北林业大学出版社

芽孢漆酶的研究

汪春蕾 卢 磊 赵 敏 著

东北林业大学出版社

版权专有 侵权必究

举报电话：0451 - 82113295

图书在版编目 (CIP) 数据

芽孢漆酶的研究 / 汪春蕾, 卢磊, 赵敏著. -- 哈尔

滨 : 东北林业大学出版社, 2012. 9

ISBN 978 - 7 - 5674 - 0097 - 9

I. ①芽… II. ①汪…②卢…③赵… III. ①芽孢杆

菌属-研究 IV. ①Q939. 124

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 231223 号

责任编辑: 李学忠

封面设计: 刘长友

出版发行: 东北林业大学出版社

(哈尔滨市香坊区哈平六道街 6 号 邮编: 150040)

印 装: 哈尔滨圣铂印刷有限公司

开 本: 880mm × 1230mm 1/32

印 张: 8.375

字 数: 225 千字

版 次: 2012 年 9 月第 1 版

印 次: 2012 年 9 月第 1 次印刷

定 价: 28.00 元

如发现印装质量问题, 请与出版社联系调换。(电话: 0451 - 82113296 82191620)

前 言

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,其作用的底物特异性不强,能催化多种反应,在纸浆的漂白、染料脱色、果酒加工及废水处理等领域应用广泛,并具有重要的环保意义。漆酶的生产系高新生物产业,核心技术被极少数国际化公司所掌控,它们利用构建的真菌工程菌株生产真菌漆酶。与真菌漆酶相比,细菌的芽孢漆酶由于具有无糖基化、在含卤素和碱性的环境中表现稳定及细菌生长速度快的优点而成为近年来的研究热点。《芽孢漆酶的研究》一书是作者所在的课题组在“国家林业局 948 项目(2012-4-03)、国家自然科学基金项目(No. 31170553; 30671702; 30170775)、黑龙江省自然科学基金项目(No. C201025; No. C201132)、中央高校基本科研业务费专项资金项目(DL12CA08; DL10BA09)”的资助下的部分研究成果的总结。

本书包括以下主要内容。

1. 从森林土壤分离筛选出 6 株具有漆酶活性的细菌,从活性污泥样品中分离筛选出 2 株具有漆酶活性的细菌,通过形态学鉴定这些菌株都为杆状,产芽孢,通过生理生化研究和 16S rDNA 序列分析表明,所筛选到的菌株分别属于芽孢杆菌属的 *Bacillus. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* 和 *B. licheniformis*,其中包括 2 株分离自森林土壤的 *B. amyloliquefaciens* 菌株 LS01 和 LS05, 3 株分离自森林土壤的 *B. subtilis* 菌株 LS02, LS03 和 WD23, 2 株分离自活性污泥的 *B. subtilis* 菌株 WN01 和 WN02, 还有 1 株分离自森林土壤的 *B. licheniformis* 菌株 LS04。16S rDNA 序列的 Blast 结果表明,所筛选的菌株与数据库其他相应种的菌株的序列相似性均在 99% 以上,系统发育分析表明所筛选的 8 株芽孢杆菌

菌株与芽孢杆菌属的不同芽孢杆菌亲缘关系较近,其中 *B. amyloliquefaciens* 的 2 个菌株与 *B. subtilis* 的 4 个菌株在亲缘关系上更近,而 *B. licheniformis* 菌株 LS04 与上述 8 个菌株的亲缘关系相对较远。

2. 详细研究了 *B. amyloliquefaciens* 菌株 LS01 和 LS05, *B. subtilis* 菌株 LS02 和 WN02 以及 *B. licheniformis* 菌株 LS04 的漆酶酶学特征。结果表明:所有芽孢漆酶均具有较广泛的 pH 值适应性,在酸性、中性和碱性范围内均表现出催化活性。芽孢漆酶催化漆酶三种底物的最适 pH 值范围有所差异,催化 ABTS 的最适 pH 值在酸性条件下,催化 SGZ 的最适 pH 值在中性条件下,而在碱性条件下对 DMP 表现出更好的催化活性。各菌株芽孢漆酶在酸性条件下(pH 值 3.0)稳定性较低,在中性(pH 值 7.0)和碱性条件(pH 值 9.0 和 10.0)下具有较好的稳定性。此外芽孢漆酶也具有较好的抗高温能力,最适反应温度在 60 ~ 70℃,在 90℃ 下仍可保持较好的活性。还原剂半胱氨酸和二硫苏糖醇对芽孢漆酶抑制效果比较明显,而其他抑制剂只有在高浓度下才表现出明显的抑制效果。金属离子中 Hg^{2+} , Ag^+ , Mn^{2+} 和 Al^{3+} 对芽孢漆酶具有不同程度的抑制效果,其他金属离子则表现出促进作用。10% 的有机溶剂对芽孢漆酶的催化活性影响不大,浓度增加到 30% 以上时活性明显下降。芽孢漆酶在碱性、高温等条件下较好的稳定性以及对抑制剂、金属离子和有机溶剂的较好的耐受性表明细菌芽孢漆酶在工业废水处理上具有比真菌漆酶更好的应用前景。

3. *B. amyloliquefaciens* 菌株 LS01 和 LS05, *B. subtilis* 菌株 LS02 和 WN02 以及 *B. licheniformis* 菌株 LS04 的芽孢漆酶对四种合成染料 RBBR、活性黑、靛红和结晶紫的脱色效果有所差异。在无介体存在时,结晶紫是所有染料中脱色效果最好的,所有芽孢漆酶均能有效脱色结晶紫。其他几种染料在无介体时脱色效果不理想,菌株 LS01 的漆酶对 RBBR、活性黑和靛红均不能脱色,

菌株 LS05 的漆酶对这三种染料也基本不脱色。相比较而言, *B. subtilis* 菌株 LS02 和 WN02 以及 *B. licheniformis* 菌株 LS04 的漆酶对 RBBR、活性黑和靛红的脱色效果要好于 *B. amyloliquefaciens* 的两种菌株的漆酶。

在介体存在时, 芽孢漆酶对三种难脱色的染料 RBBR、活性黑和靛红的脱色能力提升较快。靛红的脱色效果最好, 多数介体能快速有效地促进靛红的脱色, 使其脱色率达到 80% 以上。较难脱色的 RBBR 和活性黑在 Ace, ABTS 或 SyT 存在时也能被有效脱色, 其中 Ace 是所有介体中效果最好的, 对所有染料均表现出较好的促进作用, 而 VA, HBT 和 TE 对多数染料脱色没有较明显的促进作用。以 Ace 为介体时在 pH 值 9.0 的碱性条件下, 所有芽孢漆酶对四种染料仍保持了较高的脱色率, 并且在 pH 值 9.0 的脱色率要稍高于中性偏酸条件下的脱色率, 显示在碱性染料废水处理中具有较好的工业应用前景。

4. 以菌株 WD23 为研究材料, 采用延时包埋法制得的固定化微胶囊, 具有颗粒强度大, 颗粒生物活性高和稳定性好等优势。不同延时时间中, 24 h 的包埋性能最好, 硬度大, 为规则的圆形, 膨胀性小。

固定化芽孢漆酶的最适反应温度为 70 ℃, 比非固定化芽孢漆酶最适温度提高了 10 ℃。非固定化酶和固定化酶的最适 pH 值均在 6.8 处, 在 6.0 ~ 7.6 之间都具有很高的活性。pH 值 < 6.8 时, 固定化漆酶的酶活更高, 说明固定酶更具耐酸性, 作用范围更广。将固定化芽孢漆酶贮存于 30 ℃, pH 值 6.8 的条件下, 其活性半衰期超过 7 个月, 比非固定化芽孢漆酶多 1 个月。固定化的芽孢漆酶, 使用稳定性更强, 能达到 12 次之多。固定化芽孢漆酶的米氏常数 K_m 较游离酶的米氏常数 K_m 小, 即固定化酶对底物的亲和力比游离酶大。

采用固定化微胶囊处理造纸黑液, 能够使黑液中 COD 有明显

下降。菌株 WD23 芽孢漆酶处理黑液的 COD 去除率为 31.19%，新月弯胞霉 *Curvularia lunata* 处理黑液的 COD 去除率为 45.86%，菌株 WD23 和新月弯胞霉联合处理黑液的 COD 去除率为 61.31%。这说明共代谢作用更有利于处理像造纸黑液这样难处理的废水。

5. 采用芽孢杆菌漆酶基因特异性引物通过 PCR 扩增出所筛选菌株的漆酶基因，并将序列提交到 GenBank 上。通过 Blast 比对分析发现各菌株漆酶基因与数据库中相同芽孢杆菌的序列相似性均在 98% 以上。芽孢漆酶蛋白序列与拟南芥及链霉菌属的漆酶蛋白序列同源性较高，与其他细菌漆酶和白腐菌漆酶的蛋白序列同源性相对较低。芽孢漆酶具有三个铜离子结合保守结构域，参与 II 型和 III 型铜三核中心形成的 8 个 His 以 4 个高度保守的 His-X-His 形式出现，其中 6 个参与 III 型铜的结合，其余 2 个参与 II 型铜的结合。

利用一系列生物信息学软件对芽孢漆酶蛋白序列进行了分析，结果表明三种类型的芽孢漆酶的氨基酸长度基本相同，分子质量为 58~59 ku，等电点介于 5.9~6.3 之间，所有芽孢漆酶蛋白序列上均不存在信号肽，有 3~4 个疏水区域。三种不同的芽孢漆酶基因编码的成熟蛋白的二级结构非常相似，都富含无规则卷曲结构， α -螺旋含量最低。此外，在空间三维结构上，三种不同来源的芽孢漆酶也比较相似，都由三个结构域组成，近似球形，具有结合底物的口袋结构，在 I 型铜结合位点上方具有细菌漆酶特有的一段含有 α -螺旋的环状结构，与已报道的 *B. subtilis* CotA 蛋白的三维结构相似性较高。

6. 将克隆到的 *B. subtilis* LS02 和 WN02，*B. amyloliquefaciens* LS01 和 *B. licheniformis* LS04 的漆酶基因重组到大肠杆菌表达质粒 pET-22b(+) 中，成功构建重组表达质粒 pET-22b(+)/lac。含有漆酶基因的重组大肠杆菌在添加 IPTG 诱导后，培养液的上

清液中未检测到漆酶活性,而菌体细胞破碎粗提液中均检测到漆酶活性,说明重组漆酶表达在宿主细胞内,其中来自菌株 LS01 的重组漆酶活性最高,达到 23.7 U/L;其他重组漆酶活性较低,且随着诱导时间的延长活性逐渐降低。重组漆酶表达活性较低的可能原因包括:重组蛋白在胞内形成不溶的包涵体,宿主蛋白酶系统降解部分重组漆酶或者是培养基中铜含量较低导致重组漆酶活性中心铜离子的占有率不足。优化表达条件包括培养基铜离子含量、诱导剂浓度、诱导时间和温度等将有利于提高重组漆酶的表达活性。

7. 采用特异的 His 标签纯化试剂盒对 CotA 蛋白进行纯化的效果比较好,经 Native - PAGE 纯化的 CotA 蛋白在 pH 值 5.0 条件下被 0.1% 丁香醛连氮染成红色。

以丁香醛连氮为底物测定 CotA 漆酶的最适反应温度为 45 ℃,比 *B. subtilis* WD23 芽孢漆酶的低一些,这说明芽孢漆酶由于有芽孢组分的保护作用而较稳定。以丁香醛连氮作为底物测定 CotA 漆酶的最适反应 pH 值为 7.2,比 *B. subtilis* WD23 芽孢漆酶的最适反应 pH 值向碱性偏移了 0.4 个单位。

pH 值 7.2 条件下,在 80 ℃,CotA 漆酶活性半衰期 $t_{1/2}$ 为 0.5 h,在 60 ℃, $t_{1/2}$ 能达到 7.5 h,而在最适反应温度 45 ℃, $t_{1/2}$ 能达到 76 h。在最适反应温度 45 ℃下, pH 值 5.0 ~ 7.0 的范围内漆酶活性半衰期 $t_{1/2}$ 超过 23 h,在 pH 值 9.0 环境中,其 $t_{1/2}$ 能达到 8 h,其温度稳定性和 pH 值稳定性均比芽孢漆酶低很多,但在碱性 pH 值条件下显示的漆酶活性均强于真菌漆酶。

1 mmol/L 金属离子螯合剂 EDTA, NaN_3 , 半胱氨酸和二硫苏糖醇对 CotA 漆酶的活性有强烈的抑制作用,但对这几种抑制剂的抵抗作用均强于 *B. subtilis* WD23 的芽孢漆酶。甲醇和二甲苯强烈地抑制 CotA 漆酶的活性, Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 对漆酶活性有明显的激活作用,而 Zn^{2+} 则对 CotA 漆酶活性有很强的抑制作用。

CotA 蛋白的 K_m 值小于芽孢漆酶的 K_m 值。与芽孢漆酶相比, CotA 蛋白与底物丁香醛连氮的亲合力大。CotA 漆酶对 RBBR 和刚果红的脱色率在 87% 以上, 对靛红和结晶紫的脱色率也为 55% 以上, 此 CotA 漆酶在短时间内对染料能够有效地脱色, 可以成为有潜力的工业用酶。

本书的第 4, 5, 6, 7 章及参考文献部分(13.5 万字)为汪春蕾所著; 第 1, 2, 3 章(7 万字)为卢磊所著; 第 8 章及结论部分(2 万字)为赵敏所著。

本书可供相关研究的专业技术人员及高等学校的广大教师及学生参考。限于知识水平, 书中难免有不妥之处, 恳请读者批评指正。

著 者

2011 年 8 月

目 录

1 绪论	(1)
1.1 漆酶及其分布	(1)
1.2 细菌漆酶的性质及结构	(11)
1.3 细菌漆酶的催化机理	(13)
1.4 细菌漆酶基因的克隆	(16)
1.5 细菌漆酶的工业应用	(17)
1.6 大肠杆菌表达系统	(20)
1.7 本课题研究内容、目的和意义	(27)
2 产漆酶细菌的筛选和鉴定	(29)
2.1 材料	(29)
2.2 方法	(33)
2.3 结果与分析	(41)
2.4 讨论	(52)
2.5 本章小结	(54)
3 芽孢漆酶的酶学性质	(55)
3.1 材料	(55)
3.2 方法	(56)
3.3 结果与分析	(60)
3.4 讨论	(81)
3.5 本章小结	(85)
4 芽孢漆酶在染料脱色中的应用	(86)
4.1 材料	(86)
4.2 方法	(88)

4.3	结果与分析	(89)
4.4	讨论	(106)
4.5	本章小结	(109)
5	细菌芽孢漆酶的固定化及其应用	(111)
5.1	材料	(111)
5.2	方法	(112)
5.3	结果与分析	(118)
5.4	讨论	(124)
5.5	本章小结	(125)
6	芽孢漆酶基因的克隆及序列分析	(127)
6.1	材料	(127)
6.2	方法	(128)
6.3	结果与分析	(133)
6.4	讨论	(156)
6.5	本章小结	(158)
7	芽孢漆酶基因在大肠杆菌中的表达	(160)
7.1	材料	(160)
7.2	方法	(162)
7.3	结果与分析	(171)
7.4	讨论	(183)
7.5	本章小结	(188)
8	CotA 蛋白的纯化及其酶学特性的研究	(190)
8.1	材料	(190)
8.2	方法	(193)
8.3	结果与分析	(200)
8.4	讨论	(208)
8.5	本章小结	(209)
结论		(211)

参考文献	(217)
附录	(231)
附录 1 筛选菌株 16S rDNA 测序结果	(231)
附录 2 筛选菌株漆酶基因测序结果	(239)
附录 3 筛选菌株漆酶的二级结构预测	(247)
附录 4 <i>Bacillus subtilis</i> WD23 的 CotA 基因的核苷酸序列和 推导的氨基酸序列	(253)

1 绪 论

1.1 漆酶及其分布

漆酶(EC 1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO),属于铜蓝氧化酶家族中的一员。漆酶可利用活性中心的铜离子催化氧化多种结构的芳香化合物,同时将分子氧还原成水^[1]。漆酶最早于1883年发现存在于日本漆树(*Rhus vernicifera*)中,后来大量研究表明漆酶在自然界分布十分广泛,在植物、真菌和细菌中广泛存在^[2~4]。漆酶和植物中的抗坏血酸氧化酶(ascorbic acid oxidase)、哺乳动物的血浆铜蓝蛋白(ceruloplasmin)属铜蓝氧化酶(multicopper oxidase)家族中的同一小族,在结构和功能上存在着许多相似之处,三者的催化机理也相同^[1]。

漆酶的底物范围十分广泛,包括许多与对二酚结构类似的化合物,如氨基苯酚、多酚、木质素、多胺、芳基二胺和特定的无机离子的氧化反应。这些酚类和芳香类的底物被脱去羟基上的电子或质子形成自由基,而且形成的自由基可以继续引发高聚物的解聚、重聚、脱甲基和苯酮类的生成等次级反应^[5]。在一些小分子氧化还原介质的协同作用下,漆酶具有更强的催化氧化能力,作用的底物范围可进一步扩大^[6],因此,漆酶在食品工业、制浆造纸工业、污染物降解、有机合成和生物传感器等领域得到了广泛的研究与应用^[7]。

漆酶来源很多,结构各异。由于漆酶的结构决定其特性,因此不同来源的漆酶表现出来的催化特性差异较大。即便是同一来

源也可能产生具有不同理化性质的同工酶,其催化氧化作用也各不相同。目前已有越来越多不同来源的漆酶被分离纯化,并进行了理化性质和功能分析,相关的漆酶基因也被克隆和分析鉴定,其中一些还实现了异源表达^[2~4,8~9]。本节主要介绍漆酶的几种主要来源及其相关功能。

1.1.1 植物漆酶

漆酶广泛存在植物和真菌中,关于真菌漆酶的研究和应用已有大量的报道,但高等植物漆酶的报道则较少。漆酶在一些高等植物中可能结合在细胞壁上,而植物的粗提液中往往含有大量的多酚氧化酶和过氧化物酶,给漆酶的活性测定带来很大的干扰,增加了从植物中分离漆酶进行相关研究的难度^[1]。

产漆酶的植物主要分布在漆树科植物中,研究最为详尽的是日本漆树(*Rhus vernicifera*),在日本漆树分泌的汁液中,有60%~65%的漆酚(urushiol)、6.5%~10%的糖分、20%~25%的水,漆酶所占的比重可达0.1%~1%。在氧气存在的条件下,漆树的汁液会变成韧性很强的固体,保护伤口,除了空气的直接氧化作用外,漆酶氧化漆酚形成高聚物对汁液的固化起了非常重要的作用^[1]。除了漆树科植物外,漆酶在松树(*Pinus taeda*)、黄杨(*Populus trichocarpa*)和欧亚槭树(*Acer pseudoplatanus*)的木质部,以及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、棉花(*Gossypium* spp.)等物种中也有报道^[2]。此外,在单子叶植物黑麦草(*Lolium perenne*)^[10]和玉米(*Zea mays*)^[11]中也克隆得到了漆酶基因。

漆酶在植物中的生物学功能主要是参与木质素的合成。木质素是植物体内含量仅次于纤维素的复杂酚类聚合物,主要由香豆醇、松柏醇和芥子醇3种单体组成^[12]。真菌漆酶是第一个被证实可在体外催化聚合木质素单体的酶,Freudenberg等首先提出了漆酶参与高等植物体内木质素合成的假说^[13]。Freudenberg随后推

断在木质素单体聚合形成木质素的过程中,起决定作用的是两类不同类型的酶:需氧的漆酶和需 H_2O_2 的过氧化物酶^[14]。后来 Nakamura 发现日本漆树分泌的漆酶不能氧化木质素单体松柏醇^[15], 以及 Harkin 等报道在裸子植物和被子植物的木质化部位未检测到漆酶活性^[16], 致使该理论一度被弃用。直至 Sterjiades 等从槭树 (*Acer pseudolantanus*) 中分离到漆酶, 并证明其在完全缺少过氧化物酶的条件下, 可以聚合木质素单体, 漆酶参与木质素合成的可能性才再次被提出^[17]。Sterjiades 等还认为漆酶是参与木质素单体氧化聚合形成寡聚物, 而过氧化物酶则参与后期形成高聚物的反应^[17]。Bao 等研究发现漆酶存在于火炬松的木质部, 与细胞壁形成有关, 能够氧化木质素单体^[18]。Wang 等将棉花漆酶基因 GaLAC1 导入新疆杨中, 发现 GaLAC1 参与了转基因植株内木质素的合成, 导致转基因植株中总木质素含量的增加, 首次利用转基因植物证实植物漆酶基因参与木质素的合成^[19]。Zhou 等近期在拟南芥中发现 MYB58 基因可作为转录因子激活漆酶基因和其他一些相关基因的表达, 促进其参与木质素的生物合成^[20]。

此外, 植物漆酶在植物中还具有其他一些生物学功能。如在高等植物的防御反应中起一定的作用, 某些植物伤口分泌的汁液中漆酶参与氧化反应以促进伤口的愈合^[1]。在拟南芥中漆酶还涉及种皮黄酮类物质的氧化聚合, 其突变体表型是种皮颜色变浅、萌发率降低以及主根生长受抑制^[21,22]。

1.1.2 真菌漆酶

在真菌中, 漆酶主要分布于担子菌 (Basidiomycetes)、子囊菌 (Ascomycetes) 和半知菌 (Deuteromycetes) 等真核微生物中, 担子菌类的白腐真菌 (White-rot fungi) 是自然界中最主要的漆酶生产者^[3]。产漆酶的子囊菌包括 *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium* 属的一些菌及一些植物致病菌, 如 *Neurospora crassa*,

Podospora anserina, *Magnaporthe grisea* 和 *Melanocarpus albomyces* 等^[3]。在产漆酶酵母中, 研究最多的人类致病菌 *Cryptococcus* (*Filobasidiella*) *neoformans* 为免疫缺陷者常见的条件致病真菌, 研究表明主要有三个毒性因子在其致病过程中发挥着重要作用: 在 37℃ 正常生长的能力、产生多糖荚膜以及多酚氧化酶-漆酶^[23]。担子菌中几乎所有的白腐菌都具有产漆酶的能力, 常见的产漆酶的白腐菌包括 *Cerrena unicolor*, *Coriolus hirsutus*, *Lentinus edodes*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Trametes versicolor*, *Trametes hisute* 等^[3]。

根据真菌漆酶的生成方式不同, 可将其分为组成型漆酶和诱导型漆酶两种。组成型漆酶的合成贯穿于菌体生长的各个阶段, 在菌体初级生长阶段已经合成, 较少受到诱导物的影响。诱导型漆酶的合成一般发生在菌体生长代谢次级阶段, 酶活易受营养条件和多种外界因素影响, 目前发现的大多数真菌漆酶为诱导型漆酶^[3]。漆酶的诱导剂多为酚类底物类似物, 此外铜离子对漆酶的诱导产生也有一定的促进作用^[24]。多数白腐菌可以产生一种以上的漆酶同工酶, 同工酶的产生与菌株的生长环境、营养条件和诱导剂的存在等有很大的关系。少数菌可以产生很多种同工酶, 如 *Pleurotus ostreatus* 可以产生至少 8 种以上的漆酶同工酶, 目前已有 6 种被分离纯化出来, 这些同工酶在分子量和催化性质等方面都表现出较大的差异^[3]。

到目前为止, 有超过 100 种不同来源的真菌漆酶被分离纯化, 并进行了相关的酶学性质研究^[3]。真菌漆酶是一种含铜糖蛋白, 多为单一多肽, 个别为二聚体或四聚体, 分子质量为 60 ~ 70 ku, 约由 500 个氨基酸组成, 且一般含有 N-末端分泌信号肽段。大多数真菌漆酶糖配基占整个分子的 10% ~ 45%, 由于分子中糖基的差异, 漆酶的分子质量随来源不同会有很大差异, 甚至来源相同的漆酶分子质量也会不同, 其糖基化被认为可能与漆酶的热稳

定性有关^[3]。真菌漆酶适宜反应温度较低,酸性 pH 值下催化效率较高;具有广泛的底物专一性,不同漆酶之间的作用范围也不尽相同,涉及的底物主要包括单酚、邻-苯二酚、对-苯二酚、甲氧基酚、抗坏血酸、二胺化合物(如苯二胺、多巴胺等)^[3]。真菌漆酶分子中一般都含有 4 个铜原子,而某些酶蛋白的辅基有例外的情况。Karhunen 等的研究指出,*Phlebia radiata* 产生的漆酶中只含有 2 个铜原子,另外还有一分子的有机小分子辅基吡咯喹琳醌(pyrroloquinolinequinone, PQQ),该辅基在分子中扮演类似Ⅲ型铜原子的功能^[25]。1997 年 Palmieri 等从 *Pleurotus ostreatus* 纯化了一种新型漆酶,该酶中只含有一个铜原子,却含有 2 个锌原子和 1 个铁原子,因此在 600 nm 处没有吸收,表现为白色,而最普遍的含 4 个铜原子的漆酶是蓝色蛋白^[26]。而来自 *Phellinus ribis* 的漆酶则不属于铜蓝蛋白,因为其缺少 I 型铜原子而含有 1 个锰原子^[27]。

真菌漆酶具有多种生物学功能,包括色素形成、子实体形成、木质素降解和作为致病真菌的致病因子等。漆酶脱氧聚合作用形成的黑色素(与醌的形成有关),可能是香菇、灵芝等菌类外皮是深褐色的真正原因所在,漆酶在食用菌的菇伞与柄的带色外皮中活性最高^[28]。植物果实的发育同样包括漆酶(酚氧化酶等)催化胞外色素产生、氧化细胞壁组分偶联聚合等过程,并与漆酶的合成调控相关^[28]。在 *Schizophyllum commune* 中,能产生子实体的双核菌株可分泌高水平的漆酶,而同类系的单核菌株却不能,说明该漆酶与子实体发育有关^[29]。在 *Agaricus bisporus* 的营养生长期,漆酶活性积累与菌丝体的量精确平行,但当子实体形成开始后漆酶即迅速失活^[30]。与植物漆酶参与合成木质素的功能不同,漆酶是白腐菌木质素降解酶系统的一部分,在木质素的降解过程中发挥着重要作用^[31]。Eggert 等发现 *Pycnoporus cinnabarinus* 不产生木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶,这种真菌在液体培养基中仅产