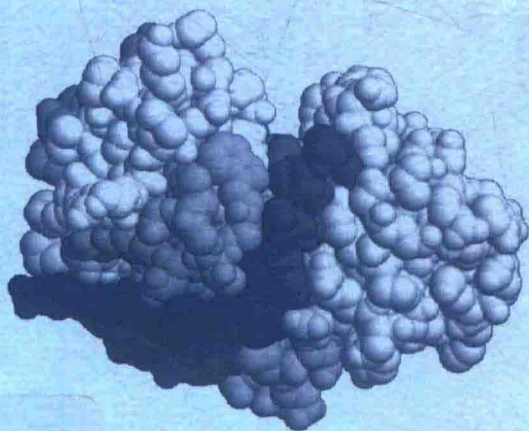


专著

酶催化氧化类固醇 激素研究

李洪枚 李卫民◎著

MEI CUIHUA YANGHUA LEIGUCHUN
JISU YANJIU



知识产权出版社

全国百佳图书出版单位

酶催化氧化类固醇激素研究

李洪枚 李卫民 著



知识产权出版社

全国百佳图书出版单位

图书在版编目 (CIP) 数据

酶催化氧化类固醇激素研究/李洪枚, 李卫民著. —北京: 知识产权出版社, 2016. 3
ISBN 978-7-5130-4019-8

I. ①酶… II. ①李… ②李… III. ①甾体激素—研究 IV. ①Q548

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 010323 号

内容提要

本书介绍了漆酶的组成结构和催化机理, 类固醇环境激素的危害、作用机制和处理方法, 并重点将漆酶催化处理含人工合成雌激素 17- α 乙炔基雌二醇废水的最新研究方法、研究成果和研究趋势等呈现给读者。本书内容翔实、新颖, 对本科生、研究生和大学教师, 以及从事环境激素教育与研究的人员, 均具有一定的参考价值。

责任编辑: 国晓健

责任校对: 谷 洋

封面设计: 刘 伟

责任出版: 孙婷婷

酶催化氧化类固醇激素研究

李洪枚 李卫民 著

出版发行: 知识产权出版社有限责任公司	网 址: http://www.ipph.cn
社 址: 北京市海淀区西外太平庄 55 号	邮 编: 100081
责编电话: 010-82000860 转 8385	责编邮箱: guoxiaojian@cnipr.com
发行电话: 010-82000860 转 8101/8102	发行传真: 010-82000893/82005070/82000270
印 刷: 北京中献拓方科技发展有限公司	经 销: 各大网上书店、新华书店及相关专业书店
开 本: 880mm × 1230mm 1/32	印 张: 3.25
版 次: 2016 年 3 月第 1 版	印 次: 2016 年 3 月第 1 次印刷
字 数: 69 千字	定 价: 18.00 元

ISBN 978-7-5130-4019-8

出版权专有 侵权必究

如有印装质量问题, 本社负责调换。

目 录

1 漆酶概述	1
1.1 漆酶的来源	2
1.2 漆酶的组成、结构与功能	6
1.3 漆酶的性质	13
1.4 漆酶的催化反应机理	14
1.5 漆酶在工业中的应用	16
2 类固醇激素	26
2.1 环境激素概述	26
2.2 类固醇激素	34
2.3 类固醇激素的分析方法	40
2.4 EE2 的来源、危害及含 EE2 废水处理 研究进展	45
3 漆酶催化氧化处理雌激素 EE2	55
3.1 研究目的、内容和方法	56
3.2 材料与方法	57
3.3 分析方法	59

3.4	pH 值对 EE2 去除率的影响	66
3.5	温度对 EE2 去除效果的影响	68
3.6	酶量对 EE2 去除效果的影响	70
3.7	EE2 浓度对去除效果的影响	72
3.8	磁力振荡的原理及对 EE2 去除效果的影响	74
3.9	助催化剂 ABTS 的作用机理及对 EE2 去除效果的影响	76
3.10	不同种类的漆酶对 EE2 去除效果的影响	79
3.11	结论与建议	81
4	酶催化氧化类固醇雌激素现状与展望	86
4.1	有关酶催化氧化类固醇雌激素的研究报道	86
4.2	酶催化氧化类固醇雌激素现状与展望	94

1 漆酶概述

漆酶最先是从小漆树 (*Rhusvenicifera*) 的汁液中提取分离出来的一种酶。1883 年, 日本人吉田 (Yoshi) 在研究生漆液成分过程中发现了生漆中有一种对热敏感, 并能促进生漆变色及硬化的成分, 当时, 吉田推测这种物质是催化生漆成膜固化的一种生物催化剂, 即一种能够催化生漆快速凝固的酶, 并推断可能是淀粉酶类物质 (diastatic matter)。1898 年, 法国人 Bertrand 在研究越南产漆液过程中, 分离出这种具有催化生漆固化作用的物质, 确定是一种金属蛋白质, 并首次将其命名为漆酶 (laccase), 一直沿用至今。漆酶的全称是对 - 二酚: (双) 氧化还原酶, 又名酚酶、多酚氧化酶、漆酚氧化酶等, 通常习惯上将能够氧化多聚酚类、甲氧基酚类和苯胺类等化合物而不能氧化酪氨酸的酶蛋白定义为漆酶。漆酶与植物中的抗坏血酸氧化酶, 哺乳动物的血浆铜蓝蛋白同属于蓝色多铜氧化酶 (blue multi - copper oxidase), 是一种含铜的糖蛋白氧化酶。^[1]

由于漆酶来源比较多, 结构存在一定差异, 因此, 不同来源的漆酶表现出不同的性质或性质差异较大。即使是同一来源

的漆酶，如从同一种白腐菌分泌产生的漆酶，其性质也存在一定的差异，但是这些漆酶都有着共同的活性中心和反应机制，以及许多类似的底物。生物酶学中的趋同进化可能是造成漆酶分布的广泛性与序列的差异性的重要原因。漆酶存在于未加工的生漆中，能够促进生漆固化成膜，是一种生物催化剂，它催化漆酚形成聚合物而使生漆固化。多年来，经过广大研究人员和工程人员不懈地研究和开发，漆酶在食品、医疗、化学分析和环保等多个领域得到了比较广泛的应用，有关漆酶的组成、结构和功能等应用基础研究，以及漆酶生产与应用技术开发已引起国内外的广泛关注。^[2]

1.1 漆酶的来源

漆酶是一种含铜的氧化酶，广泛存在于多种植物、真菌、细菌和动物等生物中，其英文名称是 Laccases，酶命名序号是 EC 1. 10. 3. 2。漆酶不仅存在于漆树中，而且存在于高等植物、真菌分泌物、细菌、昆虫以及动物的肾脏和血清中。^[3-9]通常根据其来源将漆酶分为漆树漆酶、真菌漆酶和细菌漆酶三大类。

在植物中，漆酶主要存在于漆树中，漆树大约有 250 种，如日本漆树 (*Rhusvenicifera*)。漆酶还存在于拟南芥 (*Arabidopsisthaliana*)、棉花 (*Gossypiums*)、松树 (*Pinustaeda*)、水稻 (*Oryzasativa*)、欧亚槭树 (*Acerpseudolantanus*) 和黄杨 (*Populustrichocarpa*) 等物种，广泛分布于亚洲东部、北美洲和中美洲。^[10]漆树 (*Rhusvernificera*) 主要分布在中国和日本，

漆树 (*Rhus succedanea*) 主要分布在越南和柬埔寨, 美国主要分布有漆树 (*Rhus toxicodendron*)。在其他一些高等植物中也发现了漆酶, 如美国加州的胡椒树、东南亚国家的杧果、巴勒斯坦的黄连木等。此外, 在马铃薯、咖啡豆、苜蓿花、香蕉等中也发现了漆酶。来自漆树 (*Rhus vernicifera*) 的漆酶是人们研究最多的一种漆酶。^[11-13]

产生漆酶的真菌主要有担子菌 (*Baidimycetes*)、半知菌、多孔菌 (*Polyporus*)、脉胞菌 (*Neurospora*)、子囊菌 (*Asomycetes*)、柄孢壳菌 (*Podospora*) 和曲霉菌 (*Aspergillus*) 等属种,^[14-16] 其中绝大部分是担子菌, 其次是子囊菌, 研究最多的是担子菌亚门的白腐菌, 但是目前还没有在酵母中发现内源性漆酶的存在。

产生漆酶的细菌主要包括生脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*)^[17]、产黑色素细菌海单胞菌^[18]、链霉菌^[19]、溶杆菌属^[20] 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[21,22]、水生细菌^[23]、海洋细菌^[24] 等。

漆酶在动物生长过程中表现出的生理作用主要是促进动物有关组织角质化, 还与色素的生成有着重要的关系, 但有关动物产生的漆酶报道比较少。^[25] 近年来, 陆续有研究报道了从昆虫的表皮检测和分离得到具有类似漆酶特征的酶, 这些酶能催化氧化酚类物质。^[26-28] 目前, 发现动物漆酶主要存在于内生翅类 (*endopterygota*) 的昆虫、甲壳类 (*litopenaeus vannamei*) 和棘皮动物 (*strongylocentrotus purpuratus*) 中, 有研究表明存在于昆虫的幼虫和成虫的角质层中的漆酶, 其作用主要与昆虫的

骨化和硬化有关。^[29] 在一些动物中, 漆酶与其免疫防御功能有关, 漆酶也是一些人体病原菌的毒力因子。^[30] 另外, 人们还在一些昆虫如红粉甲虫^[31]、烟草天蛾^[32]和疟蚊^[32]等体内也发现了漆酶。有研究人员还在猪的肾脏^[7-9]和红沼小龙虾的血清中分离出漆酶。^[33]

常见含漆酶的植物如图 1.1 ~ 图 1.6 所示。



图 1.1 日本黄栌 (又称日本红叶漆)



图 1.2 漆树



图 1.3 漆树果子

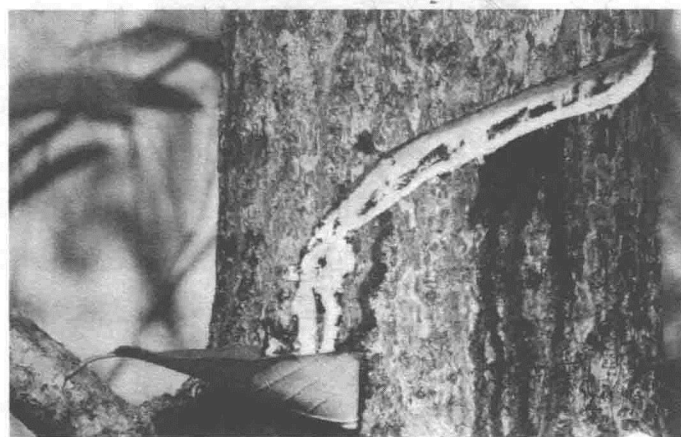


图 1.4 漆树割痕流淌的漆



图 1.5 杧果 (漆树科)

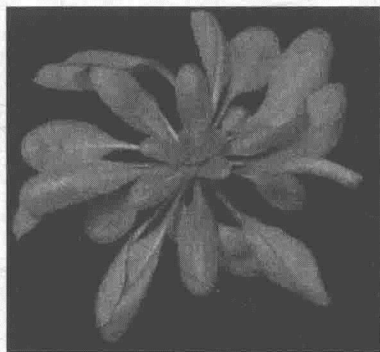


图 1.6 拟南芥 (*Arabidopsisthaliana*)

1.2 漆酶的组成、结构与功能

1.2.1 漆酶的组成

漆酶是一种糖蛋白, 单体的分子量在40 ~ 110kDa 之间, 糖的含量大概占分子量的 10% ~ 45% 不等, 这是由于不同物

种或同一种物种中漆酶的糖基化程度存在较大的差别。漆酶有单体、二聚体和四聚体几种形式。

1.2.2 漆酶结构

与其他酶的结构相似，漆酶空间结构也是具有多维性的。由氨基酸序列构成漆酶的一级结构，即单一肽链是漆酶的线性组成，涉及漆酶重要功能的氨基酸组成在不同种类的漆酶间有一定的相似性和保守性，漆酶一级结构中的某些氨基酸序列的保守性是判定漆酶同源性和物种进化的重要依据。漆酶一般由单一多肽组成，含有 500 ~ 550 个的氨基酸，表观相对分子质量主要集中在 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 之间，由 18 种氨基酸组成，包括 Pro、Lys、Arg、Asp、Ser、Phe、Leu、Thr、Val、Ala、Cys、Met、Ile、Gln、Tyr、His、Gly、Try，不同来源的漆酶，其氨基酸序列相似性并不高。漆酶的二级结构指漆酶肽链按一定方式折叠，形成漆酶的二维空间结构，且与一级序列密不可分，常见有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角以及无规卷曲等类型。在二级结构基础上， α 螺旋、 β 折叠等二级结构单元按照一定方式搭配构成漆酶的结构域（有时称为蛋白质亚基），由这些结构域彼此相互作用构成漆酶的三级结构。

漆酶通常具有 4 个铜离子，并由此组成了两个活性中心：一个是 T1 铜离子活性中心或位点，该位点与漆酶的底物氧化能力有关；另一个是 T2 以及两个 T3 铜原子组成三铜离子还原中心，该活性中心或位点能够接收从 T1 活性中心或位点得到的电子，将氧气还原成水。三铜簇是漆酶与酪氨酸氧化酶

(酪氨酸氧化酶的还原中心只有两个铜离子) 的本质区别之一。也有极少数漆酶含有其他的金属离子, 如铁离子、锰离子和锌离子等。漆酶空间结构参见图 1.7。

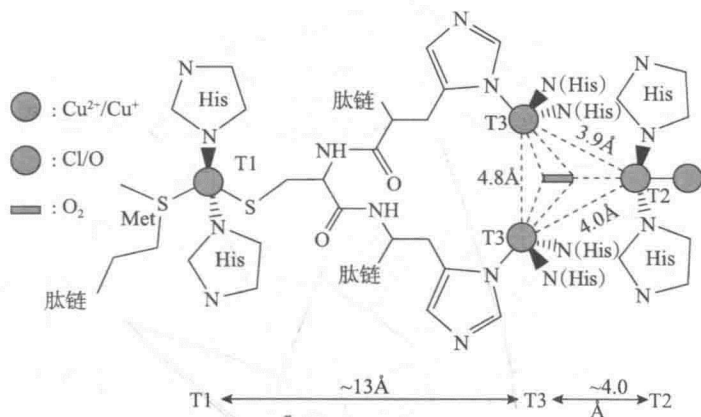


图 1.7 漆酶铜中心和氧的结合^[34]

典型漆酶的 4 个铜离子可分为三种类型^[35-37], 一个 T1 铜离子, 一个 T2 铜离子和两个 T3 铜离子。其中 T1 铜离子是底物反应场所, 底物在此附近被氧化, T1 铜离子接受来自底物的电子转移, 在半胱氨酸 (Cys)、组氨酸 (His)、甲硫氨酸 (Met) 与 Cu 之间产生电荷转移, 结构中的 Cu—S 键, 使得铜离子在 614nm 处产生强烈的蓝色特征吸收带, 而被称为蓝铜。^[38] T1 位点的几何结构与普通的金属蛋白铜位点的几何结构有所不同, 它是一个扭曲的四面体通过半胱氨酸形成一个 Cu—S 键, 此外, 还有两个组氨酸 (His) 的 N 原子以及甲硫氨酸 (Met) 的 S 原子成键 (见图 1.8)。底物和天冬氨酸 (Asp) 残基活性位点的相互作用, 保证了位点结合准确性和

高效率的氧化性。氧化态的 T2 铜离子是由两分子的咪唑和一分子的水配位形成松散的扭曲四面体几何构型，不稳定，容易除去，有氧条件下则不易除去，在三配位中心具有正常的 Cu (II) EPR 信号，具有四方形的几何结构，但无特殊吸收峰；第三种类型的铜离子，即 T3 铜离子中心包含两个无 EPR 信号的反磁性耦合铜原子，由于电子在 OH 和两个 Cu (II) 之间的传递，在 330nm 处有特征吸收带。^[39] 三配位中心的作用是结合分子氧，利用从单核中心 T1 铜离子传递过来的 4 个电子将分子氧还原成水。还原氧分子到水是经过了两步双电子反应，第一步形成超氧化物过渡体，第二步再生成水。

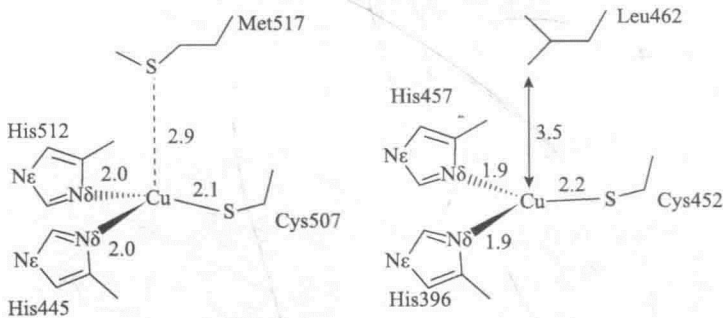


图 1.8 T1 的位点^[42]

另外，在 400/420 ~ 460nm 之间存在的一些小吸收带，可能是一些反应中间体，例如氧/过氧中间体 (PI) 的吸收。^[40,41] T1 中心是相对独立的，离 T2—T3 中心族大概有 1.3nm。T2 和 T3 中心紧密相连形成一个三核族或者三铜中心族，几种可能的模式如图 1.9 所示。

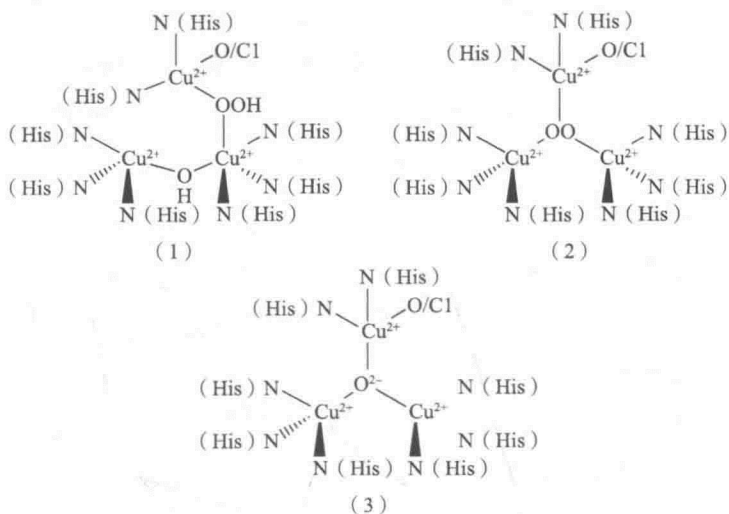


图 1.9 T2 和 T3 铜的过氧基桥连接的可能结构模型^[34]

1.2.3 漆酶晶体空间结构

不同来源的漆酶，晶体空间结构不同。Ducros^[43]从 *Coprinus cinereus* 中获得漆酶，并将其在 *Aspergillus oryzae* 上表达，分离获得漆酶晶体，预测并最早描绘出漆酶的三维草图（见图 1.10）；Hukulinen^[44]从 *M. albomyces* 中分离获得具有比较高的热稳定性漆酶结晶，并描绘出含 4 个铜原子活性漆酶蛋白的三维结构图（见图 1.11）；Kallio, J. P. 等^[45]从子囊菌真菌中分离出漆酶，并进行了有关结构测量，参见图 1.12、图 1.13。

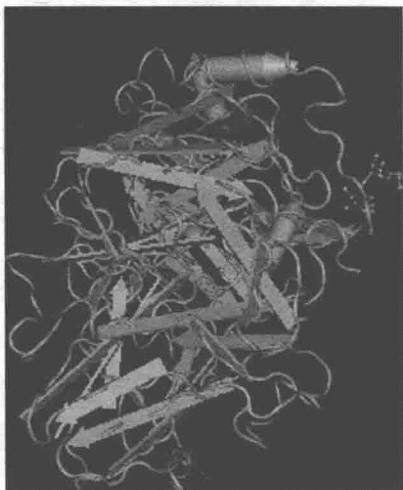


图 1.10 漆酶三维空间结构^[43]



图 1.11 漆酶三维空间结构^[44]

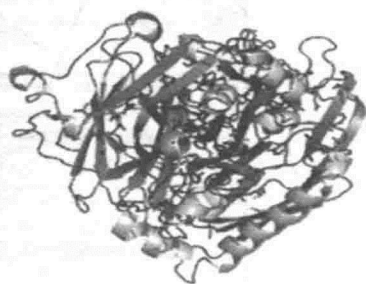


图 1.12 真菌漆酶
三维空间图^[45]

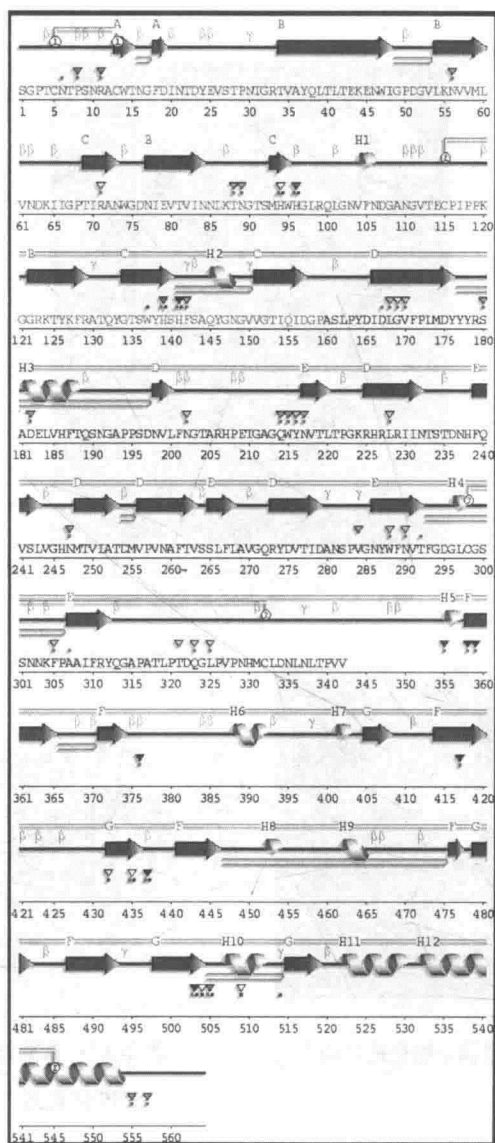


图 1.13 真菌漆酶的一级结构及二级结构图