

文章编号: 1673-1689(2011)02-0166-06

## 真菌漆酶高级结构研究进展

高玉千, 张利明, 张世敏, 徐淑霞, 吴坤\*

(河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 白腐菌分泌的木质素降解酶主要有木质素过氧化物酶、锰依赖过氧化物酶和漆酶3种。漆酶属于蓝色多铜氧化酶家族, 可以催化氧化多种有机化合物, 伴随着分子氧还原成水, 但不同来源的漆酶降解能力差异很大, 而此恰与漆酶的结构密切相关。作者综述了漆酶尤其是真菌漆酶结构特征、催化活性中心和高级结构等方面的研究进展。

**关键词:** 漆酶; 真菌漆酶; 活性中心; 高级结构

中图分类号: Q 554; Q 93-936

文献标识码: A

### Research Progress of Fungal Laccase Structure

GAO Yu-qian, ZHANG Li-ming, ZHANG Shi-min, XU Shu-xia, WU Kun\*

(College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Three different enzymes are involved in lignin degradation produced by the white rot fungi, they are lignin peroxidases, manganese peroxidases and laccase. Laccase, a member of the blue multicopper oxidase family, catalyzes the oxidation of a variety of organic substrates coupled to the reduction of molecular oxygen to water. The abilities to degrade lignin by different laccases vary widely, which depend on the structure of laccases, especially the structure of the trinuclear copper site. The structure characteristics, active site and three dimension structure of fungal laccase were summarized in this review.

**Key words:** laccase; fungal laccase; active site; structure

自然界中木素的降解主要是通过丝状真菌, 其中主要由白腐担子菌的分解作用来完成。白腐菌降解木质素, 是通过其分泌的酶的作用来实现的。白腐菌所分泌的木素降解酶主要有3种, 即木素过氧化物酶(Lignin peroxidase, 简称LiP), 依赖锰的过氧化物酶(Manganese dependent peroxidase, 简称MnP)和漆酶(苯二酚: 氧氧化还原酶, p-diphenol: oxygen oxidoreductase, EC1.10.3.2)<sup>[1]</sup>。

漆酶是一种含铜多酚氧化酶, 与植物抗坏血酸氧化酶和哺乳动物血浆铜蓝蛋白同源, 都属于蓝色多铜氧化酶家族<sup>[2]</sup>。作为一种多酚氧化酶, 漆酶能氧化酚类和芳香类化合物, 同时分子氧还原成水。这一过程中, 漆酶从氧化底物分子中提取一个电子, 使之形成自由基, 该自由基不稳定, 进一步发生聚合或解聚反应<sup>[3]</sup>。由于漆酶来源很多, 结构各异, 因此不同来源的漆酶表现出来的催化特性相差

收稿日期: 2010-04-20

基金项目: 河南省科技厅重点攻关项目(82102220011)。

作者简介: 高玉千(1974-), 女, 湖北黄陂人, 农业生物技术博士研究生。Email: yqgao2005@163.com

\* 通信作者: 吴坤(1963-), 男, 河南平舆人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事环境微生物方面的研究。

Email: wukun63@126.com

很大,其催化氧化作用各不相同<sup>[4-5]</sup>。作者拟从真菌漆酶的结构特征、活性中心和高级结构等方面的研究进展进行综述,以供从事该领域研究的学者参考。

## 1 真菌漆酶的结构特征

漆酶皆为糖蛋白,糖配基主要有氨基己糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、岩藻糖和阿拉伯糖<sup>[6]</sup>。漆酶的来源不同,含糖质量分数约 3%-49% 不等。这些组分在植物漆酶的质量分数约为 45%,真菌漆酶的糖类物质质量分数较低,大约 10%~20%。同为真菌漆酶,杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)的漆酶糖类物

质质量分数为 1%~7%,而 *Corioloropsis fulvocinerea* 和 *Botrytis cinerea* 的漆酶糖质量分数分别为 32% 和 49%。灵芝(*Ganoderma lucidum*)漆酶去糖基化导致完全失活,因此许多研究者认为,漆酶分子中糖类物质的作用是稳定蛋白质,同时也可使酶分子免遭蛋白酶解和自由基钝化<sup>[7]</sup>。由于分子中糖基的差异,漆酶的相对分子质量随来源不同会有很大差异,甚至来源相同的漆酶相对分子质量也会不同。

目前已有多种漆酶被分离纯化,近 4 年来分离纯化的部分真菌漆酶酶学性质见表 1。可知相对分子质量在 50 000~130 000 之间,等电点 pI 为 3~6。

表 1 分离纯化的部分真菌漆酶酶学性质

Tab. 1 The properties of some fungal laccase

漆酶来源	相对分子质量(Mr)	等电点 pI	最适 pH 值	最适温度/℃	温度稳定性 $T_{1/2}^*$ , h	$K_m$ /( $\mu\text{mol/L}$ )	参考文献
<i>Trametes hirsute</i> 1g 9	$90 \times 10^3$	4.3	2.4 (ABTS) 2.5 (DMP)	85 (DM P)	$T_{1/2}^{65} = 5$ , $T_{1/2}^{75} = 1.17$	-	[8]
<i>Low eporus lividus</i> MT CG-1178	$64.8 \times 10^3$	-	5.0 (DMP)	60 (DM P)	$T_{1/2}^{60} = 2$	480 (DM P) 230 (邻苯二酚) 210 (间甲酚) 320 (邻苯三酚) 350 (丁香醛连氮)	[9]
<i>Trametes versicolor</i>	$64 \times 10^3$	-	-	-	-	-	[10]
<i>Fomitella fraxinea</i>	$47 \times 10^3$	3.8	3.0 (ABTS)	70 (ABTS)	$T_{1/2}^{70} = 1$	270 (ABTS) 426 (DM P)	[11]
<i>Myriocoonium</i> sp. UHH F13184	$88 \times 10^3$	2.8	2.5 3.0 (ABTS) 6.0 (丁香醛连氮) 6.5 (DMP)	70 (ABTS) *	-	4.2 (丁香醛连氮) 104.9 (ABTS) 67.8 (DMP)	[12]
<i>Perenniporia tephropora</i>	$63 \times 10^3$	3.3	4.0 (DMP) 5.0 (ABTS)	-	-	-	[13]
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	$61.4 \times 10^3$	-	3.0 (ABTS) 4.0 (DMP) 5.0 (丁)	65 (ABTS)	-	91 (丁香醛连氮) 77 (ABTS) 203 (DM P)	[14]
<i>Panustigrinus</i> CBS 577.79	$69.1 \times 10^3$	3.15	3.75 (DMP) 2.7 3.2 (ABTS)	55 (DM P)	$T_{1/2}^{50} = 4.68$ , $T_{1/2}^{30} = 0.42$	119 (DM P) 31 (ABTS)	[15]
<i>Pleurotus eryngii</i>	$34 \times 10^3$	-	-	70 (ABTS)	-	-	[16]
<i>Ganoderma lucidum</i>	$75 \times 10^3$	-	3.5 (ABTS)	70 (ABTS)	-	-	[17]
<i>Pleurotus sajorcaju</i>	$61 \times 10^3$	-	5.0 (ABTS)	40 (ABTS)	-	56 (ABTS) 42 (丁香醛连氮)	[18]
<i>Pleurotus ostreatus</i> D1	$64 \times 10^3$	-	7.0 (丁香醛连氮) 8.0 (邻苯二酚) 4.0 (ABTS)	-	-	-	[19]
<i>Cerrena unicolor</i> Lacc I	$64 \times 10^3$	3.6	2.5 (ABTS) 3.5 (DMP) 4.5 (丁香醛连氮)	60	-	7 (ABTS) 86.5 (DMP) 9.8 (丁香醛连氮)	[20]
<i>Cerrena unicolor</i> Lacc II	$57 \times 10^3$	3.7	3.0 (ABTS) 4.5 (DMP) 5.5 (丁香醛连氮)	60	-	27 (ABTS) 88.9 (DMP) 13.3 (丁香醛连氮)	[20]

注: \* 表示再高温未作, - 表示未报道

多数真菌漆酶都是单体蛋白质,但也发现了寡聚糖漆酶。木腐真菌 *Phellinus ribis*<sup>[21]</sup>、*Pleurotus pulmonarius*<sup>[22]</sup> 和 *Trametes villosa*<sup>[23]</sup>, 菌根真菌 *Cantharellus cibarius*<sup>[24]</sup>, 子囊菌 *Rhizoctonia solani* 的漆酶都是由两个相对分子质量相似的亚基组成,每个亚基的相对分子质量与单亚基漆酶相对分子质量相当<sup>[25]</sup>。平菇(*Pleurotus ostreatus*)漆酶同工酶 POXA3a 和 POXA3b 则是由 2 种相对分子质量不同的亚基组成<sup>[7]</sup>。子囊菌 *Monocillium indicum* 的漆酶相对分子质量经凝胶过滤确定为 100 000, SDS 电泳结果表明此漆酶由相对分子质量为 24 000、56 000 和 72 000 的 3 个亚基组成<sup>[26]</sup>。禾顶囊壳菌(*Gaeumannomyces graminis*)的漆酶相对分子质量为 190 000,由 3 个 60 000 亚基组成<sup>[27]</sup>; 柄孢壳(*Podospora anserina*)的漆酶则是 80 000 亚基组成的四聚体,相对分子质量为 390 000<sup>[28]</sup>。

## 2 漆酶催化活性中心

多数漆酶含有 4 个  $\text{Cu}^{2+}$ 。根据光谱学特性和电子顺磁共振技术(Electron Paramagnetic Resonance, EPR)特性,漆酶活性中心 4 个铜离子分成 3 类:I 型  $\text{Cu}^{2+}$  (T1Cu)和 II 铜  $\text{Cu}^{2+}$  (T2Cu)各一个,是单电子受体,呈顺磁性; III 型  $\text{Cu}^{2+}$  (T3Cu)两个,是双电子受体,反磁性<sup>[3]</sup>。

T1 铜接受来自底物的电子转移,在 Cys、His、Met  $\rightarrow$  Cu 之间产生电荷转移,由于铜离子和 Cys 硫原子  $\rho\pi$  间的高度共价结合,使得铜离子在 614 nm ( $\epsilon = 5\ 000\ \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ) 处产生强烈的蓝色特征吸收带(因此也称作蓝铜),同时产生小股 EPR 信号的超精细偶合( $g_{\parallel} = 2.30$ ,  $A_{\parallel} = (40-95) \cdot 10^4/\text{cm}$ ),和 T1 铜相连的配体是 His 和 Cys,两个 His 的咪唑基和 Cys 的巯基组成双锥几何形——三角结构,铜离子可被 Hg 或 Co 替代。

T2 位点配位中心具有正常的 EPR 信号( $g_{\parallel} = 2.24$ ,  $A_{\parallel} = (140-200) \cdot 10^4/\text{cm}$ ),单核铜离子位于四方形的几何结构中,表现超细分裂(ultrafine splitting)。T2 铜离子不稳定,不容易被一些弱的配体(如 Cys)配位,在有螯合剂存在时,可以被选择性地还原去除,常常伴随着酶活性的显著下降。

T3 位点中心包含两个铜离子,是两个反磁性偶合铜原子通过氢氧化物桥配对,无 EPR 信号;由于电子在 OH 和两个铜离子间传递,在 330 nm 紫外区域有特征吸收带。T2/T3 簇通过 8 个 His 的咪唑基形成配体,各自呈略微扭曲的三角双锥形,T2 铜还可能和一个  $\text{Cl}^-$  相关。

值得注意的是不同的漆酶具有不同的结构活性中心。在 600 nm 处没有最大吸收峰的酶通常称为类漆酶,也具有典型蓝色漆酶所固有的 T1Cu。比如平菇(*P. ostreatus*)产生相对分子质量为 61 000 的漆酶同工酶 POXA1,不具有对愈创木酚的活性。POXA1w 的最大吸收值不是在 605 nm 处,而是在 400 nm 处,活性中心是一个 Cu、一个 Fe 和两个 Zn,缺少 I 型铜,不能显示漆酶特征的蓝色,为“白漆酶”<sup>[29]</sup>。射脉侧菌(*Phlebia radiata*)的漆酶活性中心包含两个 Cu(T1 和 T2 位点)和一个辅基焦磷酸吡咯喹啉醌(pyroquinolinequinone, PQQ),此时辅基充当 T3 位点<sup>[30]</sup>。木层孔菌(*P. ribis*)只产生一种同工酶,由 2 个 76KD 亚基组成的二聚体,活性中心包含 1 个 Cu、1 个 Mg 和 2 个 Zn,缺少 I 型铜,不能显示漆酶特征的蓝色,为“白漆酶”<sup>[21]</sup>。

## 3 漆酶的高级结构

由于真菌漆酶的含糖量较高,一直难以获得 X-衍射分析用的单晶,因此关于漆酶结构的研究进展比较缓慢。1998 年, Ducros 和 Brzozowski 等从灰色鬼伞菌(*Coprinus cinereus*)中获得漆酶,并将其在米曲霉(*Aspergillus oryzae*)上表达,然后用获得的晶体进行研究,最早描绘出漆酶的三维草图<sup>[31]</sup>见图 1。晶体分辨率 2.24 Å,晶体生长条件为 PEG8000 沉淀剂, pH 5.5 的乙酸钠/乙酸缓冲液,空间群为  $P2_1 2_1 2_1$ ,晶胞参数为  $a = 45.4\ \text{Å}$ ,  $b = 85.7\ \text{Å}$ ,  $c = 143.1\ \text{Å}$ 。所得单晶在 2.24 Å 分辨率的数据以抗坏血酸氧化酶为研究模型,以分子置换法解其结构。但为了获得高质量的衍射图,漆酶蛋白经内切糖苷酶 F 去 N 糖基化处理,导致其结构缺失了不稳定的 T2 Cu,因而没有活性。



图 1 缺失 T2 的 *Coprinus cinereus* 漆酶的三维晶体结构(PDB code: 1HFU, 2001)

Fig. 1 Three dimensional crystal structure of laccase from *Coprinus cinereus*

该漆酶蛋白的单体分子由 3 个连续的 cupredoxin like 结构域组成,每区均具有  $\beta$  圆筒状(由  $\beta$

绳带排成 $\beta$ -折叠形成所谓的希腊图状)拓扑结构,三者紧密相连在一起,形成一个紧密的球形结构(70 Å×50 Å×45 Å)。红色区(I区)包含1~157号氨基酸残基,参与和三核位的连接;绿色区(II区)包含158~341号氨基酸残基,是底物结合部位;蓝色区(III区)包含342~559号氨基酸残基,同时参与对单核铜和三核铜原子的结合,还在底物结合中起作用<sup>[31]</sup>。

单核的T1Cu位于结构域3中,与两个His的N和一个Cys的S配位结合,其中共价键Cu-S<sub>cys</sub>使酶呈现蓝色。T2/T3三核簇在结构域1和结构域3的界面上,每个位点都有氨基酸配体。结构域2和结构域3的氨基酸残基参与底物结合位点(电子供体底物的结合位点)的形成。第三个结构域中除了有 $\beta$ -sandwich外,还有4个短的螺旋区,最后一个螺旋位于C-末端,由结构域1的Cys85和结构域2的Cys48形成的二硫键来稳定。漆酶的第二对二硫键(Cys117-Cys204)存在于结构域1和结构域2之间。一个伸展的loop(氨基酸284-327)连接结构域2和3,Asn343上则有N-连接的N-乙酰葡糖胺<sup>[31,32-33]</sup>。

*C. cinereus* 漆酶结构见图2。T1Cu和Cys452的硫,His396、His457的ND1氮配位结合,键长分别为2.19、2.07、2.03 Å。与抗坏血酸氧化酶不同的是,在抗坏血酸氧化酶中轴向Met配基的位置,*C. cinereus*漆酶中为Leu462,大多数其他真菌漆酶中通常为Phe,距离T1Cu 3.51 Å,因此不能成为T1Cu的配基。T1Cu一侧被疏水性口袋围绕,Leu462两边为Phe340和Phe398,T1Cu位于Ile454的一侧。T1Cu距离分子表面6 Å位于一个约6 Å深、12 Å宽的凹陷中,凹陷的表面由结构域1和结构域3的3个loop(AA152-165,AA336-340,AA387-395)构成。这个区域与还原底物的结合有关。抗坏血酸氧化酶中有许多伸展的loop区,决定了底物特异性,而漆酶中缺少这些区域,且结合位点相对较大,序列变异性也较大,加上可能存在的loop构象上的变化(表现在室温和100 K结构之间的不同),这些因素都导致了真菌漆酶极度广泛的底物专一性<sup>[33]</sup>。

在已知三维结构的多铜氧化酶中,T2/T3Cu三核中心与高度保守的4个His-X-His花样的8个His配位结合。T3Cu结合6个,T2Cu结合2个。T3Cu原子对之间还有氧桥,具有强反磁性,导致T3Cu原子对电子顺磁共振效应的消失。*C. cinereus*漆酶结构中,T2/T3三核中心也被8个His包

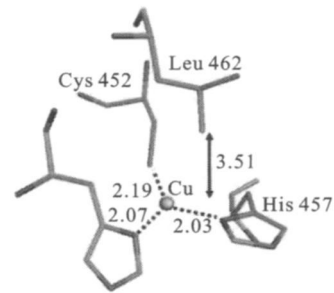


图2 *C. cinereus* 漆酶一型铜结合模式图

Fig.2 T1 copper center of the *C. cinereus*

围,但由于T2Cu缺失,与抗坏血酸氧化酶相比,构象发生了变化<sup>[33]</sup>。T3两个Cu原子间相距5.3 Å,而抗坏血酸氧化酶中只有3.7 Å,含氧的配基只结合T3Cu原子对中的一个,而且在两个Cu原子间的排列是不对称的,距离Cu3(a)和Cu3(b)分别为2.17 Å和3.26 Å,见图3。

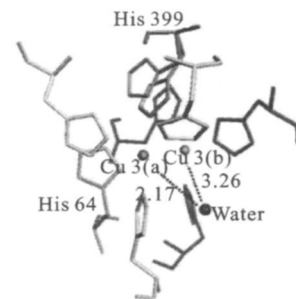


图3 *C. cinereus* 漆酶三核铜中心配位结合模式图

Fig.3 Trinuclear centers of the *C. cinereus*

继*C. cinereus*漆酶晶体结构被解析出后,Hukulinen等则从子囊菌*Melanocarpus albomyces*中获得有很高热稳定性、最适pH值在中性范围的漆酶结晶,并直接获得了含4个铜原子活性的漆酶蛋白三维结构。分辨率为2.4 Å,见图4。其C-端深埋于蛋白质内,可能会阻碍氧通道,图中灰色链状结构表示糖链。*M. albomyces*漆酶有3个二硫键桥:4Cys-Cys12在第一个结构域里,114Cys-Cys540连接第一和第三个结构域,298Cys-Cys332在第二个结构域中,紧靠底物结合位点<sup>[2]</sup>。

除此以外,*Rigidoporus lignosus*漆酶晶体结构图见图5。*Bacillus subtilis*内生孢子中分离出的衣壳蛋白漆酶CotA的三维结构见图6。*T. versicolor*漆酶蛋白大小为65 Å×55 Å×45 Å,具有二硫键桥,一个桥(8Cys-Cys488)连接第一个结构域的C-端,一个桥(117Cys-Cys205)连接第一个和第二个结构域。*C. maxima*漆酶有两个二硫键,一个是85Cys-Cys488,稳定C-端的 $\alpha$  helix;一个是117Cys-Cys205,连接第二和第一个结构域<sup>[33]</sup>。



图4 *M. albomyces* 漆酶的三维晶体结构

Fig. 4 Three dimensional structure of laccase from *M. albomyces*

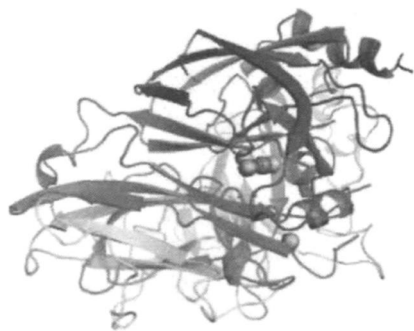


图5 *Rigidoporus lignosus* 漆酶晶体结构图 (PDB code: 1V10, 2004)

Fig. 5 Crystal structure of laccase from *Rigidoporus lignosus* (PDB code: 1V10, 2004)

通过已获得的不同真菌漆酶的结构与其他蓝色多铜氧化酶(如抗坏血酸氧化酶)的结构比较可以看出,他们在催化中心的结构上是高度保守的,主要表现在铜的几何配位、T2/T3Cu 三核中心分子氧进入和水释放的两个通道以及 His-Cys-His 三肽序列(T1Cu 位点和 T2/T3Cu 三核中心之间的电子传递路径)。

#### 参考文献(References):

- [1] 宋安东,王艳捷,王松江,等. 漆酶的分子生物学研究及其应用[J]. 信阳师范学院学报:自然科学版, 2004, 17(2): 244-248.  
SONG An dong, WANG Yan jie, WANG Shong-jiang, et al. Molecular biology and applications of laccase[J]. **Journal of Xinyang Normal University: Natural Science Edition**, 2004, 17(2): 244-248. (in Chinese)
- [2] Hakulinen N, Kiiiskinen L L, Kruus K, et al. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. [J]. **Natural Structure Biology**, 2002, 9(8): 601-605.
- [3] Ducros V, Brzozowski A M, Wilson K S, et al. Crystal structure of the type 2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. [J]. **Natural Structure Biology**, 1998, 5(4): 310-316.
- [4] 季立才,胡培植. 漆酶催化氧化反应研究进展[J]. 林产化学与工业, 1997, 17(1): 79-84.  
JI Li cai and HU Peizhi. Research progress of laccase catalytic oxidation[J]. **Chemistry and Industry of Forest Products**, 1997, 17(1): 79-84. (in Chinese)
- [5] 胡平平,付时雨. 漆酶催化活性中心结构及其特性研究进展[J]. 林产化学与工业, 2001, 21(3): 69-75.  
HU Ping ping, FU Shi yu. Advances in the studies on structure of catalytic active site and characteristics of laccase[J]. **Chemistry and Industry of Forest Products**, 2001, 21(3): 69-75. (in Chinese)
- [6] 刘淑珍,钱世钧. 担子菌漆酶的分离纯化及其性质研究[J]. 微生物学报. 2003, 43(1): 73-78.  
LIU Shi zhen, QIAN Shi jun. Purification and properties from basidiomycete[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2003, 43(1): 73-78. (in Chinese)

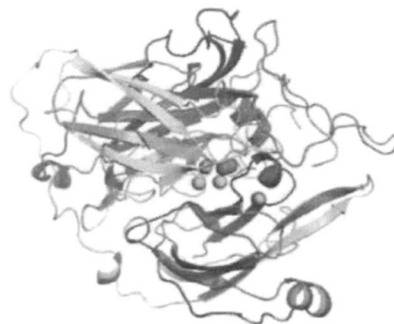


图6 枯草杆菌衣壳蛋白 CotA 漆酶晶体图(PDB code: 1UVW, 2004)

Fig. 6 The crystal structure of CotA from *Bacillus subtilis* (PDB code: 1UVW, 2004)

#### 4 结 语

漆酶的催化特异性能和宽泛底物作用,使其在纺织业废水处理、纸张和纸浆的低污染生产(生物处理和生物漂白)、芳香族化合物转化、生物传感器、生物燃料电池、饮料加工、食药用菌生产、食品保护、家具成套设备和内部装修材料的无毒胶联等方面具有广阔的应用前景,但漆酶的低产量、高温易失活等又是其应用受阻的一个重要原因,需加强对不同漆酶分子晶体结构的研究,通过比较其结构异同来研究漆酶的性质与功能;通过研究不同漆酶分子活性中心的序列与结构差异,研究不同漆酶间不同的催化机制,为高活性漆酶在蛋白质水平的改造提供依据;加强分子生物学及分子遗传学领域的研究,了解漆酶基因的结构、功能及其在转录、翻译等各个水平的表达调控机制,进而从基因水平对漆酶及产酶菌株进行优化。

- [ 7 ] Morozova O, Shumakovich G, Gorbacheva M, et al. "Blue" laccases[J]. **Biochemistry**, 2007, 72(10): 1136– 1150.
- [ 8 ] Zhang Hai bo, Zhang Ying long, Huang Feng, et al. Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta*[J]. **Biotechnology Letter**, 2009, 31(6): 837– 843.
- [ 9 ] Sahay R, Yadav R S, Yadav K D. Purification and characterization of laccase secreted by *L. lividus*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2009, 157(2): 311– 320.
- [ 10 ] Guo Mei, Lu Fu ping, Liu Mir gao, et al. Purification of recombinant laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolicola* and its use for the decolorization of anthraquinone dye[J]. **Biotechnology Letter**, 2008, 30(12): 2091– 2096.
- [ 11 ] Park K M, Park S S. Purification and characterization of laccase from basidiomycete *Fomitella fraxinea*[J]. **Journal of Microbiology Biotechnology**, 2008, 18(4): 670– 675.
- [ 12 ] Martin C, Pecyna M, Kellner H, et al. Purification and biochemical characterization of a laccase from the aquatic fungus *Mycroconium* sp. UHH 13184 and molecular analysis of the laccase encoding gene[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007, 77(3): 613– 624.
- [ 13 ] Ben Y S, Mechichi T, Sayadi S. Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenoporia tephropora* and its role in the decolorization of synthetic dyes[J]. **Journal of Apply Microbiology**, 2007, 102(4): 1033– 1042.
- [ 14 ] Lu Lei, Zhao Min, Zhang Bei bei, et al. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007, 74(6): 1232– 1239.
- [ 15 ] Quarantino D, Federici F, Petruccioli M, et al. Production, purification and partial characterisation of a novel laccase from the white rot fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79[J]. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 2007, 91(1): 57– 69.
- [ 16 ] Wang He xiang, Ng T B. Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006, 69(5): 521– 525.
- [ 17 ] Wang He xiang, Ng T B. A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006, 72(3): 508– 513.
- [ 18 ] Murugesan K, Arulmani M, Nam I H, et al. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes.[J]. **Apply Microbiology Biotechnology**, 2006, 72(5): 939– 946.
- [ 19 ] Pozdniakova N N, Turkovskaia O V, Iudina E N, et al. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: purification and characterization[J]. **Prikl Biokhim Mikrobiology**, 2006, 42(1): 63– 69.
- [ 20 ] Michniewicz A, Ullrich R, Ledakowicz S, et al. The white rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physicochemical and catalytic properties[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006, 69(6): 682– 688.
- [ 21 ] Min K L, Kim Y H, Kim Y W, et al. Characterization of a novel laccase produced by the wood rotting fungus *Phellinus ribis*[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2001, 392(2): 279– 286.
- [ 22 ] Marques D S C, Peralta R M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2003, 43(4): 278– 286.
- [ 23 ] Yaver D S, Xu F, Golightly E J, et al. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996, 62(3): 834– 841.
- [ 24 ] Ng T B, Wang He xiang. A homodimeric laccase with unique characteristics from the yellow mushroom *Cantharellus cibarius*[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2004, 313(1): 37– 41.
- [ 25 ] Wahleithner J A, Xu F, Brown K M, et al. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*[J]. **Current genetics**, 1996, 29(4): 395– 403.
- [ 26 ] Thakker G D, Evans C S, Rao K K. Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1992, 37(3): 321– 323.
- [ 27 ] Edens W A, Goins T Q, Dooley D, et al. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1999, 65(7): 3071– 3074.
- [ 28 ] Esser K, Minuth W. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospira anserina* communication 4. genetic regulation of the formation of laccase. [J]. **Genetics**, 1970, 64(3): 441– 458.
- [ 29 ] Palmieri G, Giardina P, Bianco C, et al. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*[J]. **Journal of Biology Chemistry**, 1997, 272(50): 31301– 31307.
- [ 30 ] Karhunen E, Niku Paavola M L, Viikari L, et al. A novel combination of prosthetic groups in a fungal laccase: PQQ and two copper atoms. [J]. **FEBS Letter**, 1990, 267(1): 6– 8.
- [ 31 ] 万云洋, 杜予民. 漆酶结构与催化功能[J]. 化学通报, 2007, 70(9): 662– 670.  
WAN Yur yang, DU Yur min. Structure and catalytic mechanism of laccases[J]. **Chemistry**, 2007, 70(9): 662– 670. (in Chinese)
- [ 32 ] 李旭. 大肠杆菌漆酶 CueO 的结构与功能研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2006.
- [ 33 ] 谯斌. 粗糙脉孢菌漆酶基因的克隆、定点诱变及其在毕赤酵母中的表达[D]. 无锡: 江南大学, 2006.