

前 言

水是生命之源，也是维持生态系统健康与人类社会可持续发展的关键环境要素。随着全球工业化和城市化进程加快，大量复杂有机污染物通过各种途径进入水体，对生态环境和人类健康构成严重威胁。近年来，氯酚、双酚、染料以及药品和个人护理品等新型难降解污染物在环境中不断被检出。这类污染物具有持久性、毒性，并易于迁移和富集。然而，传统物理化学处理方法在应对复杂污染体系时常面临能耗高、速度慢、易产生二次污染等问题。因此，开发绿色、高效且低成本的水处理技术显得尤为迫切。

生物酶催化降解技术，特别是利用氧化还原酶直接作用于污染物的生化反应，因其条件温和、专一性强、环境友好且无二次污染等优势，成为一种极具潜力的绿色处理途径。漆酶作为含铜的多功能酚氧化酶，属于蓝多铜氧化酶家族，能高效催化酚类和非酚类等多种底物的氧化，并同步将分子氧还原为水，过程清洁高效。自 19 世纪末被发现以来，漆酶以其广泛的底物适应性、强氧化能力以及易于从真菌、细菌中获取等优点，在生物制浆、食品加工、生物传感、废物处理与生态修复等领域展现出广阔应用前景。尤其在废水处理中，漆酶可有效降解多种难降解有机物，如染料、双酚 A、抗生素、多环芳烃和农药等，应用价值持续拓展。

本书聚焦于水体中典型新污染物（如双酚类、四环素、布洛芬等），系统阐述漆酶在废水处理中的理论与实践，内容包括漆酶概况、漆酶去除废水中污染物、漆酶透析膜反应器去除废水中污染物、柔性固定化漆酶去除废水中污染物、微气泡协同漆酶去除废水中污染物，以及微塑料存在下漆酶去除废水中污染物。从理论层面揭示多相环境中漆酶的催化机理与协同作用，填补降解路径与过程调控方面的认知空白；在实践层面探索可回收、连续化的漆酶处理工艺，旨在提高酶稳定性与处理效率，降低成本，推动废水处理向低碳化与资源化转型，助力环保产业绿色升级与水环境质量改善。

本书面向环境科学与工程、化学工程、生物技术等领域的研究人员、工程技术人员及高校师生，旨在提供一套系统、深入且反映最新研究进展的漆酶水处理技术参考资料。通过全面介绍漆酶去除污染物的原理、方法、应用与前沿动态，期望推动该技术的研究与实践转化。

全书编写分工如下：第 1 章，张杰、苟珍琼；第 2 章，孙洪飞、张杰；第 3 章，张杰、孙洪飞；第 4 章，苟珍琼、白小霞；第 5 章，胥腾屯、孙洪飞；第 6

章，白小霞、胥腾屯。张马银、刘炯娜、刘心怡、谭丽蓉、蔡琼、张佳颖、吴姗姗、黄劲僖、杜莲、王涛、彭铮鑫、钦赧鹏等参与了实验研究、资料整理与文字处理。全书由张杰、孙洪飞统稿，苟珍琼、胥腾屯、白小霞负责校对。

本研究及成书过程获得了国家自然科学基金委员会、重庆市科学技术局、重庆市教育委员会、重庆市人力资源和社会保障局、重庆工商大学、催化理论与应用技术重庆高校市级重点实验室、环境催化重庆市重点实验室等机构的项目与经费支持。同时，本书参考并引用了大量国内外同行研究成果与数据，在此一并致谢。

尽管本书历经多年撰写，实验成果力求严谨，但因涉及领域广泛，部分结论仍需实践进一步验证，加之作者水平有限，疏漏与不足之处在所难免，恳请专家与广大读者批评指正。

作 者

2025 年 10 月

目 录

前言

第 1 章 漆酶概况	1
1.1 漆酶简介	1
1.1.1 漆酶的定义	1
1.1.2 漆酶的来源	1
1.2 漆酶的性质	5
1.2.1 漆酶的分子质量	5
1.2.2 漆酶的等电点、最适反应温度与 pH	5
1.2.3 漆酶活性的影响因素	6
1.3 漆酶的结构与催化机理	7
1.3.1 漆酶的活性中心	7
1.3.2 漆酶的高级结构	8
1.3.3 漆酶的催化机理	9
1.4 微生物漆酶的合成位置与诱导	11
1.4.1 漆酶的合成位置	11
1.4.2 漆酶的诱导	13
1.5 漆酶的分子生物学研究	13
1.5.1 漆酶的氨基酸序列	14
1.5.2 漆酶基因的克隆	14
1.5.3 漆酶基因的表达	17
1.6 漆酶的应用	18
1.6.1 生物质转化	18
1.6.2 环境修复	20
1.6.3 染料脱色与解毒	21
1.6.4 其他应用	21
1.7 漆酶的循环使用	22
1.7.1 漆酶的固定化	22
1.7.2 漆酶-介体体系	23
1.7.3 酶膜反应器	24
参考文献	26

第 2 章 漆酶去除废水中污染物	36
2.1 漆酶去除废水中氯酚类物质	36
2.1.1 温度对漆酶去除氯酚类物质的影响	36
2.1.2 pH 对漆酶去除氯酚类物质的影响	39
2.1.3 漆酶添加量对降解氯酚类物质的影响	43
2.1.4 漆酶对氯酚类物质降解的构效关系	46
2.1.5 小结	47
2.2 漆酶去除废水中双酚 A	47
2.2.1 不同因素对漆酶去除双酚 A 的影响	48
2.2.2 正交试验分析	51
2.2.3 动力学过程分析	52
2.2.4 小结	53
2.3 漆酶去除废水中四环素	54
2.3.1 漆酶降解四环素的影响因素分析	54
2.3.2 动力学过程分析	60
2.3.3 小结	64
2.4 漆酶去除废水中甲基红	65
2.4.1 漆酶降解甲基红的影响因素分析	65
2.4.2 动力学过程分析	70
2.4.3 小结	71
参考文献	72
第 3 章 漆酶透析膜反应器去除废水中污染物	75
3.1 漆酶静态透析膜反应器去除废水中双酚 A	75
3.1.1 透析膜反应器可行性分析	75
3.1.2 透析降解过程影响因素研究	81
3.1.3 降解产物分析及透析膜反应器运用研究	91
3.1.4 小结	99
3.2 漆酶动态透析膜反应器去除废水中的布洛芬	100
3.2.1 布洛芬高效液相色谱检测方法构建	101
3.2.2 漆酶静态透析膜反应器的可行性研究	106
3.2.3 漆酶动态透析膜反应器降解布洛芬研究	114
3.2.4 小结	126
参考文献	128
第 4 章 柔性固定化漆酶去除废水中污染物	135
4.1 接枝二胺壳聚糖微球制备与表征	135

4.1.1	交联壳聚糖微球制备条件优化	135
4.1.2	二胺柔性链对载体官能团的影响	137
4.1.3	二胺柔性链对载体形貌结构的影响	137
4.1.4	二胺柔性链对载体热重损失的影响	139
4.1.5	二胺柔性链对载体 Zeta 电位的影响	140
4.1.6	二胺柔性链对载体亲疏水性的影响	140
4.1.7	小结	141
4.2	接枝二胺壳聚糖微球固定化漆酶制备与表征	142
4.2.1	BPA 的标准曲线	142
4.2.2	漆酶蛋白质测定标准曲线	142
4.2.3	戊二醛浓度对固定化漆酶降解 BPA 效果的影响	143
4.2.4	加酶量对固定化漆酶降解 BPA 效果的影响	144
4.2.5	固定化时间对固定化漆酶降解 BPA 效果的影响	145
4.2.6	pH 对固定化漆酶降解 BPA 效果的影响	146
4.2.7	载体对固定化漆酶官能团的影响	147
4.2.8	载体对固定化漆酶形貌结构的影响	148
4.2.9	载体对固定化漆酶荧光光谱的影响	149
4.2.10	小结	150
4.3	固定化漆酶去除废水中双酚 A 及其柔性调控机制	151
4.3.1	载体对固定化漆酶最适 pH 的影响	151
4.3.2	载体对固定化漆酶最适温度的影响	152
4.3.3	载体对固定化漆酶热稳定性的影响	154
4.3.4	载体对固定化漆酶动力学的影响	155
4.3.5	载体对固定化漆酶循环使用效果的影响	156
4.3.6	载体对固定化漆酶储存稳定性的影响	157
4.3.7	反应初始浓度对固定化漆酶降解 BPA 的影响	158
4.3.8	反应温度对固定化漆酶降解 BPA 的影响	158
4.3.9	溶液 pH 对固定化漆酶降解 BPA 的影响	160
4.3.10	反应时间对固定化漆酶降解 BPA 的影响	160
4.3.11	固定化漆酶降解 BPA 路径分析	161
4.3.12	二胺柔性链对固定化漆酶酶学性能的调控机制	163
4.3.13	小结	163
4.4	总结	165
	参考文献	167

第 5 章 微气泡协同漆酶去除废水中污染物	170
5.1 微气泡协同漆酶去除废水中双酚类物质	170
5.1.1 MNB-Lac 方法的构建	170
5.1.2 MNB-Lac 影响因素及作用机理研究	174
5.1.3 MNB-Lac 降解双酚类物质及产物研究	183
5.1.4 小结	203
5.2 微气泡协同漆酶去除废水中布洛芬	205
5.2.1 不同操作方式对布洛芬降解率的影响	205
5.2.2 微气泡协同漆酶去除废水中布洛芬单因素实验	206
5.2.3 产物分析	211
5.2.4 小结	212
参考文献	212
第 6 章 微塑料存在下漆酶去除废水中污染物	218
6.1 微塑料存在对漆酶去除废水中双酚 A 的影响与机理	218
6.1.1 PE 对 BPA 的吸附效率	218
6.1.2 PE 对 Lac 去除 BPA 效能的影响	219
6.1.3 PE 的形貌与表征分析	220
6.1.4 MP 吸附过程对 Lac 蛋白含量的影响	222
6.1.5 MP 增强 Lac 去除 BPA 的机制	222
6.1.6 MP 粒径对 Lac 去除 BPA 的影响	227
6.1.7 MP 浓度对 Lac 去除 BPA 的影响	227
6.1.8 MP 种类对 Lac 去除 BPA 的影响	228
6.1.9 PE 存在下 Lac 降解 BPA 的产物及路径分析	228
6.1.10 小结	229
6.2 微塑料存在下 UL-Lac 去除废水中双酚 A	229
6.2.1 PVC 的表征分析	229
6.2.2 引入超声对 Lac 去除 BPA 的影响	231
6.2.3 Lac 与超声技术切换去除 BPA 的效果对比	231
6.2.4 BPA 初始浓度对 UL-Lac 去除 BPA 的影响	232
6.2.5 温度对 UL-Lac 去除 BPA 的影响	233
6.2.6 超声频率对 UL-Lac 去除 BPA 的影响	233
6.2.7 Lac 浓度对 UL-Lac 去除 BPA 的影响	235
6.2.8 pH 对 UL-Lac 去除 BPA 的影响	236
6.2.9 单因素方差分析	236
6.2.10 PVC 存在下 UL-Lac 降解 BPA 的产物及路径分析	237

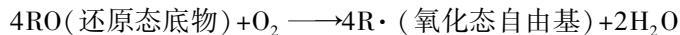
6.2.11 小结	238
6.3 微塑料存在下 MNB-Lac 去除废水中双酚 A	238
6.3.1 MNB-Lac 与其他技术去除 BPA 的效果对比	238
6.3.2 时间对 MNB-Lac 去除 BPA 的影响	239
6.3.3 温度对 MNB-Lac 去除 BPA 的影响	240
6.3.4 BPA 初始浓度对 MNB-Lac 去除 BPA 的影响	241
6.3.5 Lac 浓度对 MNB-Lac 去除 BPA 的影响	241
6.3.6 出水管管长对 MNB-Lac 去除 BPA 的影响	243
6.3.7 pH 对 MNB-Lac 去除 BPA 的影响	244
6.3.8 溶液体积对 MNB-Lac 去除 BPA 的影响	244
6.3.9 单因素方差分析	245
6.3.10 PVC 存在下 MNB-Lac 降解 BPA 的产物及路径分析	246
6.3.11 小结	247
6.4 总结	248
参考文献	249

第 1 章 漆 酶 概 况

1.1 漆 酶 简 介

1.1.1 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四个铜离子，这些铜离子在催化反应中起至关重要的作用，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^[1]。漆酶具有较强的底物专一性，能够氧化多种酚类和非酚类化合物，包括单酚、二酚、多酚、氨基酚、甲氧基酚、芳香胺和抗坏血酸等，并将分子氧四电子还原为水^[2]，其反应通式如下：



这个反应过程不产生有害的过氧化物（如 H_2O_2 ），是一种非常“清洁”的氧化反应。因其强大的氧化能力，目前漆酶已在环境修复、污染物降解、食品工业、纺织印染、生物传感器、生物精炼等领域得到广泛应用。

1.1.2 漆酶的来源

漆酶由日本学者 Yoshida Hikorokuro 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多种生物体中，包括动物、植物、细菌和真菌等，图 1.1 所示为其提取生产流程^[3]，研究后发现其具有多种生理及生态学功能。

1. 微生物漆酶

漆酶最初在真菌和植物中被发现，但随着生物信息学分析和实验数据的积

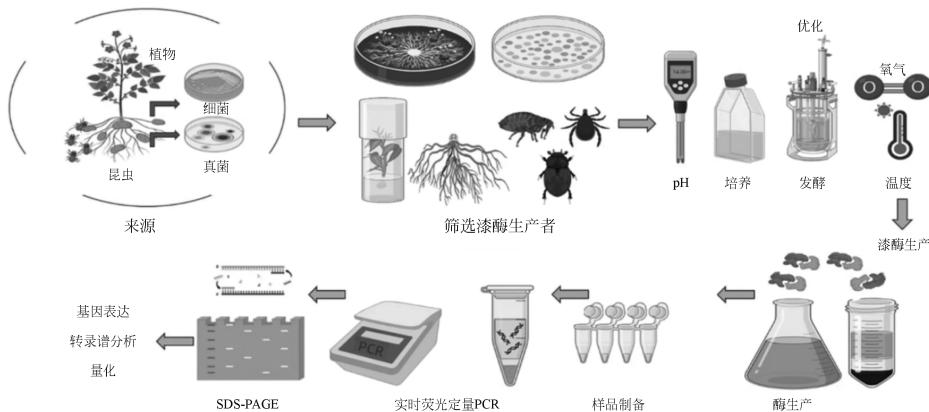


图 1.1 漆酶的来源及生产流程

累，越来越多的证据表明原核生物中也广泛分布着漆酶。

真菌是漆酶最主要、研究最充分、目前工业应用最广泛的来源，主要产生菌属为担子菌门和子囊菌门。担子菌门是真菌漆酶的最核心来源，其中，白腐真菌因其卓越的木质素降解能力而被誉为“漆酶的生产之王”，代表性菌株包括：①云芝（*Trametes versicolor*），是研究最多的漆酶生产菌，其漆酶产量高、稳定性好，是酶学性质和应用研究的模式菌种；②平菇（*Pleurotus ostreatus*）和香菇（*Lentinula edodes*），这些食用菌不仅能产生漆酶，且其菌丝体生长旺盛，易于大规模培养，具有重要的商业化潜力；③灵芝（*Ganoderma lucidum*）和黄孢原毛平革菌（*Phanerochaete chrysosporium*），同样是重要的木质素降解菌，是研究漆酶在生物质转化中作用的典型模型。子囊菌门中一些霉菌也能产生漆酶，但通常产量和活性低于担子菌，如曲霉属（*Aspergillus*）、青霉属（*Penicillium*）和粗糙脉孢菌（*Neurospora crassa*）等，它们的漆酶更多参与色素形成和孢子发育等过程。

相较于真菌，细菌漆酶的发现和研究历史较短，但近年来因其独特的优势已成为研究热点。例如，细菌漆酶通常具有更高的热稳定性和 pH 稳定性，这使得它们在极端工业条件下更具应用前景。细菌漆酶的来源更为多样，广泛分布于各种环境中，其中芽孢杆菌属是研究最深入的细菌漆酶来源之一，包括枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）：其产生的 CotA 蛋白是一种存在于孢子外衣的多铜氧化酶，具有典型的漆酶活性，CotA 漆酶以其卓越的耐热性和耐碱性而闻名；其他如地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）、耐盐芽孢杆菌（*Bacillus halotolerans*）也能产生性质相似的漆酶。链霉菌属如链霉菌（*Streptomyces* spp.）能够产生漆酶，这

些酶常参与次级代谢、色素形成或木质素衍生物的降解。此外, 在一些假单胞菌、水生细菌、嗜热细菌甚至土壤微生物中也发现了漆酶活性, 这表明漆酶在细菌界的分布比人们之前认为的要广泛得多。

原核生物漆酶与真菌漆酶在结构和生化特性上存在差异, 这些差异赋予了原核生物漆酶独特的优势, 与真菌漆酶相比, 细菌漆酶通常体积更小, 且不易糖基化, 这有利于异源表达和工业化生产。尽管 1993 年才首次报道细菌漆酶, 但随着生物信息学分析和实验技术的进步, 越来越多的证据表明漆酶在原核生物中广泛存在, 对超过 2200 个细菌基因组的生物信息学分析揭示了细菌漆酶基因的高度多样性^[4]。例如, 研究人员已从多种细菌中分离出漆酶, 包括铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 等。

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, 其由 CotA 基因编码, 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。

2. 植物漆酶

植物漆酶是一种蓝铜氧化酶, 在植物基因组中以多基因家族的形式广泛分布, 它能催化单木酚氧化生成木质素, 这对于植物的生长和胁迫响应至关重要。研究者在咖啡 (*Coffea canephora*)、玉米 (*Zea mays*)、蓖麻 (*Ricinus communis*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、大豆 (*Glycine max*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、茶叶 (*Camellia sinensis*)、毛竹 (*Phyllostachys edulis*)、核桃 (*Juglans regia*) 以及大麦 (barley) 等植物中也发现了漆酶。通过生物信息学方法, 研究人员在多种植物基因组中识别和鉴定了大量的漆酶基因家族成员。例如, 在毛竹中鉴定了 23 个 PeLAC 基因。在小立碗藓、互叶梅、玉米、蓖麻、葡萄、小麦和大豆中, 分别新鉴定了 4、12、22、26、27、28 和 49 个漆酶基因。系统发育分析揭示了植物漆酶基因的进化分歧, 如毛竹中的漆酶基因被分为 I、II、III、IV 和 V 五个组, 这有助于理解它们的功能多样性。如图 1.2 所示^[5], 展示了不同植物物种中漆酶 (LAC) 蛋白的进化关系, 分为五个不同的组 (I ~ V 组), 有助于理解漆酶蛋白的进化历史和功能预测。

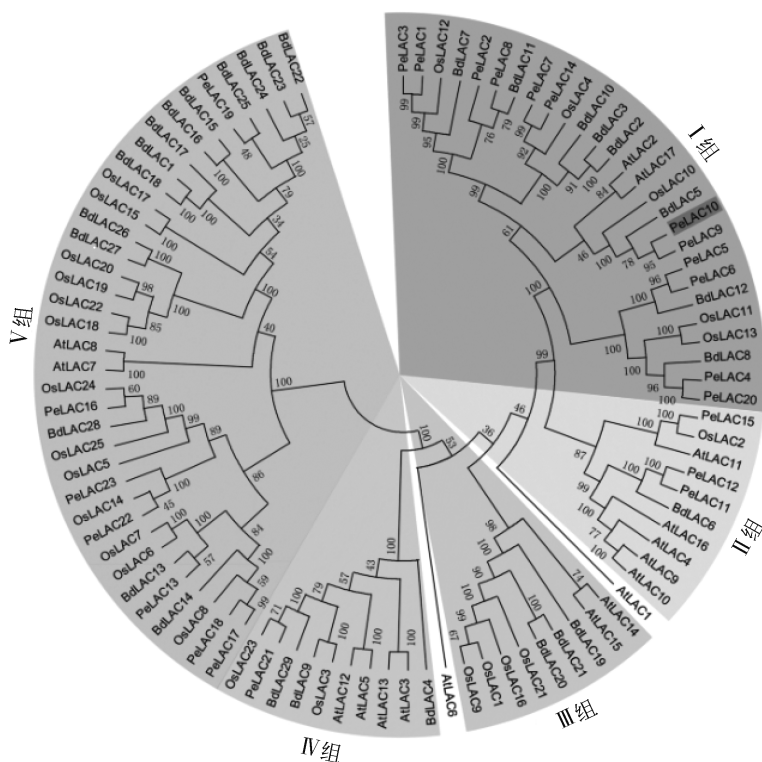


图 1.2 植物漆酶系统发育树图 (分为 I ~ V 组)

3. 动物漆酶

漆酶在生命界的分布广泛,除微生物和植物外,动物体内也被发现存在漆酶。与植物和微生物漆酶相比,动物漆酶的研究相对较少,但其生物学功能和潜在应用正逐步被揭示。

海绵中的漆酶: 2015 年, Li 等^[6]首次从海洋海绵 (*Suberites domuncula*) 研究中发现了一种漆酶。免疫组织化学研究表明,这种漆酶在动物的表面区域表达最高,并且在暴露于细菌后,漆酶基因的表达水平显著上调。这揭示其可能作为宿主防御系统的一部分,参与抵御病原体入侵。漆酶通过氧化酚类化合物,产生抗菌活性物质,或参与形成物理屏障。

虾类中的漆酶: Lima 等^[7]对亚马孙河流对虾 (*Macrobrachium amazonicum*) 的转录组研究也识别出了漆酶编码基因。这种对虾是机会主义的杂食性动物,主

要以植物材料为食。在能够降解原始植物材料的生物体中，漆酶在氧化木质素中的酚类化合物、导致木质素解聚方面发挥着重要作用，其协助降解植物细胞壁中的木质素等复杂多酚化合物，从而促进营养物质的吸收和利用，这对于动物从植物性食物中获取能量和营养至关重要。

昆虫中的漆酶：如家蚕蛾（*Hyalophora cecropia*）的茧中，通过转录组和蛋白质组分析，识别出多种与丝茧相关的蛋白质，其中可能包含漆酶及其相关酶^[8]。在昆虫中，漆酶可能参与生物材料的形成，如昆虫外骨骼的硬化、丝蛋白的交联等。这些过程通常涉及酚类化合物的氧化和聚合，漆酶在此过程中扮演关键角色。

除此以外，寄生虫感染宿主可能引起宿主表型发生显著变化，这与基因及其表达密切相关。漆酶作为一种参与氧化还原反应的酶，其表达变化可能在宿主对寄生虫的响应中起调节作用，但具体机制尚待深入研究。

1.2 漆酶的性质

1.2.1 漆酶的分子质量

漆酶的分子质量不是一个固定的值，它会因其来源（真菌、细菌、植物等）的不同而有显著差异，总的来说，大多数漆酶的分子质量范围在 50 ~ 130 kDa 之间。植物漆酶分子质量通常为 60 ~ 110 kDa，甚至更高，糖基化程度也更高，约占其分子质量的 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%。大部分真菌和细菌漆酶分子质量较低，为 50 ~ 70 kDa，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^[1]。

1.2.2 漆酶的等电点、最适反应温度与 pH

漆酶的等电点是指在电场中不发生迁移的 pH，此时酶分子的净电荷为零，且溶解度通常最低。不同来源的漆酶具有不同的等电点，这反映了它们氨基酸组

成和结构的差异。例如,真菌漆酶的等电点(pI)范围通常在3.0~4.5,来自土壤的 *Chaetomiaceae* 家族真菌分泌的胞外漆酶,其等电点为3.5^[9],其低pI与它们在酸性pH下发挥功能相适应,在纯化过程中,常利用其低pI特性在高于其pI的缓冲液(如中性pH缓冲液)中进行阴离子交换层析。细菌漆酶的等电点(pI)范围通常在5.0~7.5,如枯草芽孢杆菌CotA漆酶的pI为5.7~6.5,这使得它们的纯化策略可能与真菌漆酶相反(如使用阳离子交换层析)。植物漆酶的pI分布较广,既有酸性的也有偏中性的。

与等电点类似,真菌漆酶的最适pH通常为3.0~6.0,绝大多数真菌漆酶的最适pH在4.0~5.0之间,这是因为其天然底物木质素在腐烂的木材环境中通常呈酸性。例如,来自 *Trametes versicolor* (云芝)的漆酶最适pH约为4.5。然而,细菌漆酶的最适pH通常为6.0~10.0,这是细菌漆酶最突出的优势之一,许多细菌漆酶在碱性条件下表现出最高活性。例如,枯草芽孢杆菌的CotA漆酶最适pH通常在7.0~8.0之间,有些甚至更高,这使其非常适合处理碱性废水,如纺织印染废水。植物漆酶的pH曲线多变,但许多也倾向于中性或弱酸性条件。

最适温度是指漆酶催化活性达到最高时的环境温度。真菌漆酶最适温度范围通常为50~65℃,它们在常温下有良好的活性,但高温下容易失活。然而,细菌漆酶的最适温度一般在70℃及以上,卓越的热稳定性是细菌漆酶的标志特征。许多来源于芽孢杆菌(如CotA漆酶)或嗜热菌的漆酶,最适温度非常高,甚至在80℃以上仍能保持高活性。这使得它们在需要高温反应的工业流程中具有不可替代的优势。植物漆酶的最适反应温度通常较低,在30~50℃之间,更接近环境温度。高温意味着更快的反应速率和更低的微生物污染风险,因此细菌漆酶的耐热性使其在生物炼制、高温生物传感等领域潜力巨大。

综上所述,不存在统一的漆酶最适pH、温度或等电点。这些参数强烈依赖于其生物来源,如果需要一种在酸性、中温条件下工作的漆酶,应首选真菌来源的漆酶,若需要一种在碱性、高温条件下仍然稳定高效的漆酶,则细菌来源的漆酶是更为理想的选择。

1.2.3 漆酶活性的影响因素

金属离子对漆酶活性的影响复杂多样,这取决于离子的种类和浓度。例如,漆酶的活性中心含有铜离子,外源性的Cu²⁺常在发酵过程中被用作强效诱导剂,能显著提升菌株产漆酶的能力,在反应体系中,适量Cu²⁺有助于维持活性中心的

结构完整性^[10]。与之类似, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 通常在中低浓度下, 这些二价和一价阳离子对漆酶活性有轻微的激活或稳定作用, 它们可通过稳定酶蛋白的三维结构或优化酶与底物的静电相互作用起作用。与之相反, Hg^+ 、 Ag^+ 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 是强效抑制剂, 它们对硫醇基 ($-\text{SH}$) 有极高的亲和力, 能与漆酶分子中的半胱氨酸残基结合, 破坏其结构, 更重要的是, 它们对铜的亲和力远高于酶本身, 可以竞争性地置换活性中心的铜离子, 导致酶完全失活^[11]。此外, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 、 Zn^{2+} 通常在较高浓度下也会表现出抑制作用。

离子液体 (ionic liquid, IL) 作为一种新型溶剂, 对漆酶活性具有显著影响。吡咯烷酮甲酸盐 ($[\text{pyrr}][\text{Fo}]$) 和吗啉甲酸盐 ($[\text{morph}][\text{Fo}]$) 等离子液体能够影响漆酶的电导率, 进而可能影响其活性。这些影响取决于离子液体的种类、浓度以及温度范围。离子液体能够改变酶周围的微环境, 影响酶分子的构象和底物可及性, 从而调节其催化效率和稳定性^[10]。

为了提高漆酶的活性和稳定性, 研究人员探索了通过辅因子 (cofactor) 和封装技术来优化酶性能。例如, 通过将漆酶与辅因子一同封装在金属有机骨架 (metal-organic frameworks, MOFs) 材料 HKUST-1 中, 可以显著增强其催化活性和稳定性, 并成功应用于双酚 A (BPA) 的降解^[12]。这种策略通过提供一个有利的微环境, 保护酶免受不利条件的影响, 并可能促进底物与活性位点的有效结合。

1.3 漆酶的结构与催化机理

1.3.1 漆酶的活性中心

漆酶的结构是其催化活性的基础。典型的漆酶包含至少四种铜中心, 这些铜中心根据其光谱特性被区分为 Type 1 (T1)、Type 2 (T2) 和双核 Type 3 (T3) 铜位点^[13,14]。T1 铜位点 (Type 1 copper site): T1 铜位点是漆酶中底物氧化的主要场所, 强吸收峰在 610 nm, 因其配位环境 (通常是两个组氨酸和一个半胱氨酸残基) 而呈现强烈的蓝色。因此漆酶也被称为“蓝色多铜氧化酶”^[13,15], 该位点负责从底物中获取电子。T2/T3 三核铜簇 (Type 2/Type 3 trinuclear copper cluster, TNC): T2Cu 和 T3Cu 共同组成一个三核铜簇, 该簇位于蛋白质内部, 距离 T1 铜位点约 13 Å^[13]。TNC 的主要功能是将 T1 铜位点接收的电子传递给氧

气,并将其还原为水。T2Cu 是单核的,与 T3 铜对共同活化氧气,“正常”或“非蓝色”铜在可见光区无特征吸收,可通过 EPR 光谱检测;T3Cu 是双核的,T3 铜对通过一个羟基桥连,是 O₂ 结合和还原的位点,因双核铜之间的抗磁性耦合,EPR 沉默,在 330 nm 处有特征吸收。这三个位点(T1、T2、T3)构成了一个完整的催化单位。T1Cu 是“电子接收站”,而 T2/T3 共同构成一个“三核铜簇”,是“氧气处理厂”。

某些漆酶活性中心含有铜离子以外的其他金属,由于不含蓝色 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;茶藨子木层孔菌(*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 T1Cu 和 T2Cu,辅助基团吡咯并喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)取代了 T3Cu^[2]。

1.3.2 漆酶的高级结构

漆酶作为一种多铜氧化酶,因其在生物技术应用中的巨大潜力而受到广泛关注,其高级结构(包括二级、三级和四级结构)的研究对于理解其催化机制、提高其稳定性和优化其应用至关重要。

许多漆酶由多个杯状蓝蛋白结构域组成。例如,链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中的小漆酶(SLAC)结构独特,仅包含两个杯状蓝蛋白结构域,这与大多数具有三个结构域的铜氧化酶不同^[16]。来自热白丝菌(*Melanocarpus albomyces*)的漆酶(MaL)的三维结构已被解析,其成熟蛋白的 C 端四个氨基酸深入通向三核位点的通道中,C 端羧基与酪氨酸侧链形成氢键,这对于酶的生产、催化特性和结构稳定性具有重要作用^[17]。图 1.3^[18]介绍的是细菌漆酶用于底物氧化的活性位点结构和反应机理:(a)是枯草芽孢杆菌的 CotA 漆酶的铜位点和中心示意,(b)是漆酶参与氧化还原反应的底物氧化的一般表示。四级结构指的是多肽链(亚基)通过非共价相互作用形成的蛋白质复合体^[19]。尽管许多漆酶以单体形式存在,但一些研究也探讨了漆酶的低聚态。例如,对漆酶的组合诱变和选择性研究揭示了其四级结构在决定酶活性中的作用,甚至通过基因选择获得了具有显著催化活性的单体和六聚体酶^[20]。

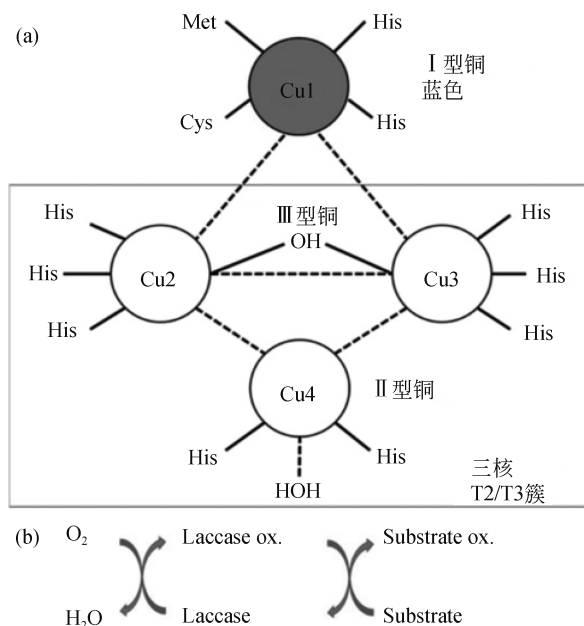


图 1.3 细菌漆酶的活性位点和反应机理

1.3.3 漆酶的催化机理

漆酶参与的催化反应可通过两种方式实现：一是无介体催化（直接氧化），漆酶直接将底物分子氧化为带有自由基的分子，这是漆酶最天然的催化形式；二是有介体催化（间接氧化），当底物分子过大或氧化还原电势较高时，漆酶先与介体分子反应生成含有自由基的分子，进而氧化底物分子。

1. 无介体催化

漆酶的独特之处在于其能够直接将分子氧还原为水，而不是分步生成活性氧中间体，这需要连续的四电子转移过程，由其多铜活性位点协同完成^[21]。在无介体的情况下，漆酶可以直接氧化天然酚类底物，通过其 T1 铜位点直接与酚类底物反应，氧化底物形成自由基，同时 T1 铜被还原。随后，电子从 T1 铜通过内部电子传递路径转移到三核铜簇（T2/T3）。三核铜簇结合分子氧，并在接收到来自 T1 铜的四个电子后，将氧完全还原为水^[22]。

Lee 等根据 Hg 取代 T1Cu 的漆酶催化反应中间体的结果，提出了漆酶催化氧

分子还原成水的反应机理，如图 1.4 所示。漆酶分子的催化反应包括过氧化物中间体（peroxy intermediate, PI）和天然中间体（native intermediate, NI）两种形式的转变。完全还原态的三核铜簇与氧分子反应生成 PI。在天然酶中，PI 仅在 NI 的形成过程中短暂存在。PI 通过 NI 向静息氧化态（resting oxidized state, ROS）形式衰减。NI 桥连了三核铜簇中的 T2Cu 和 T3Cu。在 NI 状态下 T1Cu 已被氧化，因此氧分子被进一步还原了 1 个电子。漆酶通过一个两步二电子反应将氧分子还原。第一步是限速步骤，第二步是快速步骤。还原需要断裂过氧化物的 O—O 键（尤其是氢过氧化物的强 O—O 键），要克服巨大的弗兰克-康登障碍（Franck-Condon barrier），体系中更倾向于发生二电子还原而非单电子还原，进而产生强烈的热力学驱动力，实现高速电子传递^[1]。

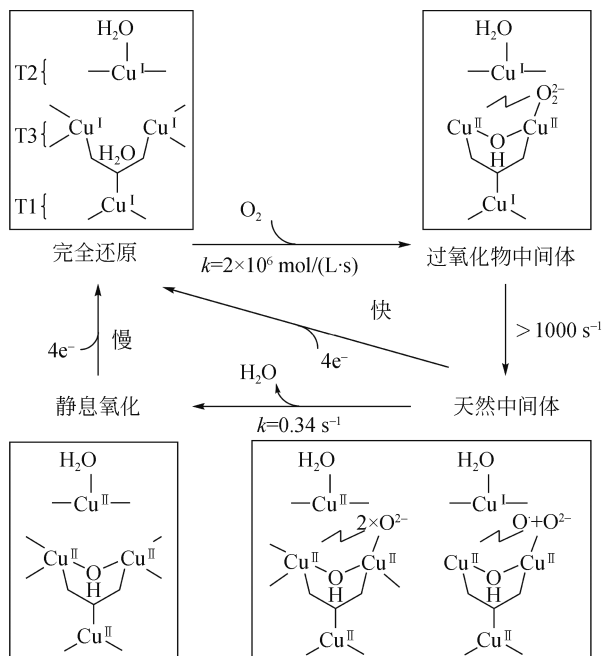


图 1.4 漆酶催化氧分子还原成水的反应机理

2. 有介体催化

尽管漆酶对多种酚类化合物具有直接催化能力，但其对非酚类或大分子底物的氧化能力有限。为了拓宽漆酶的应用范围，通常会引入小分子介体（mediators）协