

综 述 评 论

漆酶催化活性中心结构及其特性研究进展*



胡 平 平, 付 时 雨*

(中国科学院广州化学研究所 纤维素开放实验室, 广东 广州 510650)

HU P P

摘 要: 漆酶是一种多酚氧化酶, 参与木质素的降解或聚合, 具有氧化木质素的能力。但不同来源的漆酶其氧化降解木质素的能力相差很大。漆酶的结构决定了漆酶的特性, 因而也就决定了漆酶氧化降解木质素的能力。本文综述了近 10 年来漆酶分子催化活性中心的结构与功能及其特性的研究进展。

关键词: 漆酶; 催化活性中心; 特性; 白腐菌

中图分类号: Q 554

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2001)03-0069-07

漆酶是一种多酚氧化酶(*p*-diphenol oxidase EC. 1. 10. 3. 2), 最早是从漆树的分泌物中发现, 后来人们发现许多生物, 包括植物、微生物(主要是真菌)、甚至昆虫体内皆存在漆酶。由于漆酶是一种氧化还原酶, 其作用主要是催化氧化还原反应。在植物体内, 它主要是催化木质素的聚合过程, 使木质素沉积, 而真菌产生的漆酶则进行相反的过程, 使木质素发生降解。利用漆酶的催化氧化还原性能可以进行化学催化反应, 季立才等在这方面已做过综述^[1]。然而不同来源的漆酶氧化还原能力相差较大, 这些差别决定于漆酶分子的结构。本文就近 10 年来漆酶的结构及其特性的研究进展作扼要综述。

1 漆酶分子催化活性中心的结构与功能

漆酶是一种最简单的多铜过氧化酶, 一般含有 4 个铜原子(*P. radiate* 漆酶除外, 仅含 2 个铜原子, 无 3 号铜原子^[2])。根据其光谱特征, 可划为 3 种类型的铜: 1 号铜具有典型的蓝铜谱带: 紫外可见光谱上 600 nm[ϵ : 5000(mol·L⁻¹ cm⁻¹)]处出现峰值, 在 EPR(电子顺磁共振)谱上有一个小的平行超精细耦合结构[A₁₁: (4070) × 10⁻⁴ cm⁻¹], 它参与分子内的电子传

* 收稿日期: 2000-11-06

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2KM06403S, 990748)

作者简介: 胡平平(1973-), 女, 湖南平江人, 在读硕士研究生, 主要从事漆酶研究。

* 通讯联系人

递,把电子从底物传递到其他铜原子上;2号铜只具一般的EPR谱带($A_{11} > 140 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$);3号铜区由2个3号铜原子通过一个-OH桥配位连接起来,组成双核铜区,具有抗磁性,因而在EPR上无谱带,紫外可见光谱上330 nm处的肩峰是3号 Cu^{2+} 的特征峰。1号铜与2个组氨酸(his)和1个半胱氨酸(cys)配位;2号铜与2个his和1个水分子配位,形成T型几何结构^[3],这种结构对一价铜比二价铜更有利;3号铜与3个his和一个氢氧桥配位,形成四面扭曲的四方立体结构^[4];2号铜和2个3号铜原子组成的三核铜簇中所有铜原子彼此之间的距离都是0.38 nm。1号蓝铜离三核铜簇距离大约为1.25 nm,中间通过-cys-his-联系起来,形成 $\text{Cu(I)}-\text{cys-his}-\text{Cu(III)}$ 电子传递通道。Leif J等人^[5]对 *T. versicolor* 活性中心研究发现其含有2个二硫桥:cys-85与cys-487形成一个二硫桥,把1号铜区与3号铜区联系起来;cys-117与cys-205形成另一个二硫桥,把2号铜区和1号铜区联系起来。

漆酶催化活性中心与4个铜原子配位的10个His以及与1号铜配位的Cys相对而言是比较保守的。在Cys的下侧,相应于1号铜的第4个配体的位置对1号铜的还原电势有决定作用。此位置的疏水基团越大,则其还原电势越强。依据该位置基团的不同,可将漆酶序列分为3类:Lac I(甲硫氨酸:Met)还原电势最低;Lac II(亮氨酸:Leu)还原电势次之;Lac III(苯丙氨酸:Phe)还原电势最高。在细胞色素C中,这个位置是Met^[3],在 *N. crass* 中是Leu^[6],而大多数的担子菌漆酶中一般则是Phe。这与以前的报道真菌漆酶比别的蓝铜蛋白具有更高的还原性一致^[7]。可可碱乙酸钠的基因定点诱变^[8]的研究以及Xu, F^[9]等人所做的工作也支持这一结论。同时Xu, F等人^[9]还通过比较真菌漆酶的活性与还原电势关系,发现还原电势越高,漆酶活性越大,并得出结论:1号蓝铜区的结构差异决定了漆酶还原电势以及漆酶对底物的专一性。

表1 靠羧基端最近的组成铜区的部分真菌漆酶的氨基酸序列分布

Table 1 Alignment of the amino-acid sequences constituting the copper-binding domain closest to the carboxyl terminus in laccases from amino-acid sequences

菌种 organism	氨基酸片段 amino acid sequences	漆酶类别 assignment of laccase
<i>P. cinnabarinus</i>	N P G P W F L H C H I C F H L E A G F A V	
<i>C. hirsutus</i>	N P G P W F L H C H I D F H L E A G F A V	Lac III (Phe)
<i>T. versicolor</i>	N P G P W F L H C H I D F H L E A G F A I	
<i>A. bisporus</i>	N P G P W F L H C H I D W H L E I G L A V	Lac II (Leu)
<i>P. radiate</i>	N P G P W F L H C H I D W H L E A A L A V	
<i>A. psuedoplaturus</i>	N P G V W F L H C H I D W H T T W G M A V	Lac I (Met)
<i>A. nidulans</i>	D K F D S I L H C H I A S H Q M G G M A V	

3 1 3 1 1

* 分隔号内的氨基酸与1号铜、3号铜密切相关,底下的数标表示该氨基酸与哪号铜有关。最右边分隔号内的氨基酸与漆酶的还原电势密切相关。

为了确定漆酶催化活性中心的4个铜原子功能,1976年,Grazian^[10]等人选择性地整合2号铜原子,而1号铜和3号铜原子保持完整,这种衍生物称为T₂D漆酶(Type 2 depleted),分离后,发现制得的T₂D漆酶含有氧化态的1号铜和还原态的3号铜,又称为脱氧T₂D漆酶,以区别于完全被还原了的T₂D漆酶(fully reduced laccase),T₂D漆酶对于确定2号铜在漆酶催化反应中的作用非常有用。相应于T₂D漆酶,1984年Mc.Millin^[11]及他的同事合成了另一种漆酶衍生物T₁HgLc,即1号铜被Hg²⁺代替,2号铜和3号铜保持完整,制得的T₁HgLc中的2

号铜和3号铜都呈氧化态, T_1HgLc 是验证三核铜簇在无1号铜的情况下是否能和氧气反应的最理想的衍生物^[12]。

1979年, Reinhammar^[13]等人用完全被还原了的 T_2D 漆酶与 O_2 反应, 发现 T_2D 中1号铜与3号铜的氧化速率与天然漆酶中的一样, 并且出现相似的氧中间体光学特征及EPR信号, 因而推断2号铜与漆酶还原 O_2 并无直接的联系。但据Graziani^[10]等人报道通过处理1号铜, T_2D 漆酶可以转变成天然漆酶。另外, Solomon等人观察到在还原气氛中, T_2D 漆酶可以自发地转变成天然漆酶, 推测其中可能经过1号铜的转化, 随后, 他们在尽可能减小天然漆酶产生的条件下, 观测完全被还原了的 T_2D 漆酶与 O_2 的反应, 同时利用电子顺磁共振(EPR)、X射线吸收光谱及其他光学吸收谱直接定性铜的氧化还原态, 结果发现 T_2D 漆酶几乎不和 O_2 反应, 这就表明了2号铜的存在是漆酶催化还原 O_2 必不可少的条件, 同时也说明了Reinhammar观察到的快的氧化还原反应实际上与天然漆酶的氧化有关^[14]。

Takeshi S等人^[4]用抑制剂处理漆酶后, 发现漆酶的3号铜在EPR上有裂分峰出现, 表明外源性配体与3号铜发生了配位, 当外源性配体与3号铜配位后, 3号铜有了5个配体, 这种结构对 Cu^{2+} 比 Cu^{1+} 更有利, 从而导致3号铜的还原受到限制, 氧化性降低, 同时也抑制 O_2 进入三核中心区。另据Messerschmidt等人^[15]报道, 在已被完全还原了的漆酶晶型结构中, 1号铜和2号铜的配位环境不变, 而3号铜的OH桥配体丢失, 2个3号铜之间的距离增至0.51 nm, 所有这些都说明3号铜与漆酶的催化作用密切相关。

Cole等人^[14]除观测 T_2D 与 O_2 反应外, 还研究了 T_1HgLc 与 O_2 的反应, 结果发现 T_1HgLc 非常易于和 O_2 反应, 导致2号铜和3号铜完全氧化, 这就表明了 $Cu(II)/Cu(III)$ 三核铜簇是 O_2 还原的最小结构单位, 是最终的电子接受者。1994年, Marie等人^[16]对漆树漆酶三核铜簇的研究发现三核铜簇的结构具有可变性, 因而能与多种外源性配体发生作用。三核铜簇与外源性阴离子配位时, 铜原子之间存在强烈的相互作用, 2号铜的几何结构要受3号铜氧化态的影响^[17]。漆酶能催化 O_2 通过4电子还原成水。据1976年报道^[18], 天然漆酶还原 O_2 分两步进行: 第一步: 1号铜、3号铜被氧化, 产生3电子还原了的氧中间体; 第二步: 2号 Cu^+ 还原氧中间体形成完全被氧化了的酶及一分子水, 在第一步中2号 Cu^+ 并没有被氧化。后来, Cole等人^[12]推测2号 Cu^+ 可能有稳定中间体的作用。但Clark等人^[19]通过对漆酶还原 O_2 形成中间体的圆二色谱(MCD)的研究结果得出结论: 实验中观测到的中间体的 $S=1/2$ EPR信号表示一定有二价铜离子的存在, 也就意味着生成的天然中间体是一个4电子还原了的氢氧化物连在一个完全氧化了的三核二价铜簇区。近来Woonsup S等人在Clark P A的工作基础上进一步提出了以上机理^[20]。

2 特性

漆酶的结构决定了漆酶的特性。漆酶的来源很多(真菌, 植物, 昆虫, 细菌), 结构各异, 因而也决定了不同的漆酶表现出来的特性相差很大。

2.1 理化特性

2.1.1 含糖量 漆酶是糖蛋白, 不同漆酶分子糖基化的程度不同, 其糖基化一直被认为与漆酶的分泌、铜原子的保留以及热稳定性的提高有关^[21,22]。但是近来Kaichang Li^[23]等人测

试了4种含糖量差别显著的漆酶的稳定性,发现含糖量高的漆酶既不能提高漆酶的热稳定性,也不能阻止由紫尿酸自由基引起的漆酶失活。

2.1.2 氧化还原电势 木材中最主要的木质素结构单元是非酚型单元,其氧化还原电势较高。长期以来,人们以为木质素降解酶的还原电势的大小是影响木质素降解的关键因素。到目前为止,已发现的漆酶的最高氧化还原电势都不超过800 mV,这对氧化非酚型单元显然是不够的。但有报道^[24]漆酶能氧化一些氧化还原电势高于漆酶的介体,尽管其中的机理还不清楚。后来,Kaichang Li等人^[23]研究发现漆酶的氧化还原电势与其对介体的氧化并未有直接的联系,但是对一个有效的漆酶-介体体系来说,漆酶必须有一个足够高的氧化还原电势使漆酶对介体的氧化在动力学上成为可能。

2.1.3 等电点(PI) 漆酶是一种蛋白质,蛋白质由氨基酸组成,氨基酸中含有氨基与羧基,是一个两性化合物,其分子带有正电荷和负电荷,当正负电荷相等时,分子在电场中不泳动,此时的pH值即为PI值。一般来说,大多数漆酶的PI值在35范围内变动。

2.1.4 分子质量 不同的漆酶,氧化能力不一样,其分子质量也相差很大。如:*A. mellea* 漆酶分子质量80 000^[24],而*T. sanguinea* M-85-2漆酶的分子质量为62 000^[25],见表2。

表2 不同漆酶的部分特性

Table 2 Some properties of various laccases

菌种 organism	分子质量 mol. mass	等电点 isoelectric point	含糖量(%) carbohydrate content	还原电势(mV) redox potentials
<i>A. mellea</i>	80 000	3.1	3740	
<i>B. cinerea</i> 6f-34	74 000	4.0	4.9	780±20
<i>P. cinnabarinus</i>	81 000	3.7	9.0	750±20
<i>D. squalens</i> I	66 000	3.5	10.5	
<i>D. squalens</i> II	66 000	3.6	8.0	
<i>T. sanguinea</i> M-85-2	62 000	3.5	9.1	

2.2 N端氨基酸序列

漆酶的来源很多,其氨基酸序列差异很大。目前,研究得最多的是N端氨基酸序列。同源性担子菌漆酶的N端氨基酸序列具有很大的相似性,而已知的子囊菌N端氨基酸序列都不具有相似性,与担子菌漆酶序列也相差很大。对于同一种漆酶的同工酶来说,它们的N端氨基酸序列非常相似,甚至完全相同。

2.3 氧化特性

不同的漆酶其氧化能力不一样,而且其氧化的方式也不相同,甚至完全相反,如:植物漆酶氧化木质素单体形成木质素聚合物而白腐菌漆酶则降解和降聚木质素。漆酶氧化速率的大小不仅与漆酶本身的稳定性有关,而且也与漆酶与底物作用的一些动力学参数如 K_{cat} ^[23](表观速率常数)有关。而 K_{cat} 值的大小又取决于电子从底物传递到1号铜原子上的难易程度,因此底物与漆酶之间的还原电势差势必会影响 K_{cat} 值,但这并不是决定因素。 K_{cat} 值的大小还受漆酶其他参数如漆酶与底物的亲和力的影响。另外,底物酚氧环上取代基性质也是影响漆酶氧化率的一个重要因素,对*C. thermophilum*^[26]来说,单羟基取代酚比甲氧基取代酚有一个更低的氧化率,羧基取代则能增加其氧化率。底物酚氧环上不同位置的取代也同样影响漆酶的氧化率,如*C. versicolor*漆酶氧化2,4-二氯取代酚的氧化率要高于3,5-二氯取代酚^[27]。如果底物一定,对漆酶的结构进行修饰,也可使其氧化率提高,这一点近来已有

研究, Xu, F^[28] 等人对真菌漆酶的基因进行定点诱变, 发现修饰后漆酶的 K_{cat} 值大大增加, 稳定性提高, 氧化性增强。

2.4 对抑制剂的敏感性

一般来说, 铜整合剂对漆酶的活性都有抑制作用[但 EDTA(乙二胺四乙酸) 能增加 *P. conchatus* 漆酶的反应活性], 不同的抑制剂对漆酶活性的抑制作用不一样, 如 DEDTC(二乙基二硫代氨基甲酸盐) 和巯基乙醇对 *P. spino-trinus* 漆酶活性有强烈的抑制作用, 而羟胺、EDTA 对其基本上无抑制影响^[29]。同一种抑制剂对不同的菌种其抑制作用也不一样, *C. thermophilum* 漆酶对 EDTA 的敏感性要比 *C. hirsutus*、*P. cinnabarinus* 小^[30]。抑制剂对漆酶活性的影响随抑制剂浓度的不同而不同, 抑制剂浓度越大, 其抑制作用越强。氯化钠的浓度为 0.001 $\mu\text{mol/L}$ 时, *D. squalens* 漆酶活性为 100%; 浓度为 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 时, 酶活降至 38%; 当浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 漆酶完全失活^[31]。

2.5 反应动力学

在一定的温度范围内, 随着反应温度的升高, 漆酶的酶活力增加。但是, 温度越高, 漆酶越不稳定, 也就越易失活。pH 值对漆酶活性亦有类似影响, 一般来说, 大多数漆酶在碱性环境中不稳定、易失活。因此, 把漆酶用于纸浆漂白时应同时考虑漆酶的稳定性和反应的最适温度及 pH 值, 以达到最佳的漂白效果。如何提高漆酶的稳定性已成为许多研究者研究高效漆酶的一个重要内容。近来有报道^[26] *C. thermophilum* 漆酶比一般的真菌漆酶具有更高的热稳定性并在 pH 值 68 时反应较适宜。

漆酶反应的最适 pH 值随反应底物的不同而不同。 *P. cinnabarinus* 漆酶与邻联苯甲胺反应最适 pH 值为 4.0, K_m (米氏常数) 为 385 $\mu\text{mol/L}$; 与丁香醛连氮的最适 pH 值为 5.8^[32], K_m 为 833 $\mu\text{mol/L}$ 。 K_m 值的大小可以反映出漆酶对底物亲和力的大小, 而漆酶对底物的亲和力又是影响漆酶氧化底物速率的一个重要因素。 K_m 值越小, 亲和力越大, 漆酶对底物的氧化率也就越高。

表 3 不同漆酶氧化不同底物时的动力学参数

Table 4 Kinetic parameters of various laccases for oxidation of various substrates

菌种 organism	反应底物 substrates	最适反应温度(°C) optimum temperature	最适反应 pH 值 optimum pH	K_m ($\mu\text{mol/L}$)
<i>B. anæra</i> 6t-34	2,6-甲基苯酚 2,6-dimethoxyphenol	60	3.5	100
<i>P. cinnabarinus</i>	邻联苯甲胺 <i>O</i> -tolidine	30	4.0	385
<i>P. cinnabarinus</i>	丁香醛连氮 syringaldazine	30	5.8	833
<i>C. thermophilum</i>	丁香醛连氮 syringaldazine	60	6.0	34
<i>C. graminicola</i>	丁香醛连氮 syringaldazine		6.0	0.214
<i>L. tigrinus</i> IBR-101	丁香醛连氮 syringaldazine	50	5.3	3.5
<i>P. conchatus</i> ^[52]	ABTS 2,2'-azino-bis(3-ethylthiazoline-6-sulfonate)	70	4.0	22.2

3 结语

漆酶在造纸、食品、染料及废水处理等工业领域有着广阔的应用前景, 但漆酶的某些性质, 如其本身只能氧化酚型化物, 高温易失活等又是目前其应用受阻的一个重要原因。对漆酶分子结构及其特性的研究就是为了有目的地改善漆酶的特性, 增加其氧化性和稳定性, 但

目前对漆酶分子结构尤其是空间结构的认识还有待进一步的研究。纯化分离检测技术手段的快速发展, 酶化机理认识的加深以及基因工程的运用将会有效促进对漆酶分子结构的认识和漆酶特性的改善, 为获得高效漆酶打下坚实的基础。

参考文献:

- [1] 季立才, 等. 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.
- [2] KARHUNEN E, et al. A novel combination of prosthetic groups in a fungal laccase: PQQ and two copper atoms [J]. FEBS Lett., 1990, 267: 6-8.
- [3] MESSERSCHMIDT A, et al. Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution [J]. J. Mol. Biol., 1992, 224: 179-205.
- [4] TAKESHI S, et al. EPR spectra of type 3 coppers in *Rhus vernicifera* laccase and *Cucumis sativus* ascorbate oxidase [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1248: 143-148.
- [5] LEIF J, et al. Characterization of a laccase gene from the White-rot fungus *Trametes versicolor* and structure features of basidiomycete laccases [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1995, 1251: 210-215.
- [6] MESSERSCHMIDT A, et al. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin, modeling and structural relationships [J]. Eur. J. Biochem., 1990, 187: 341-352.
- [7] PERRY C R, et al. Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* [J]. J. Gen. Microbiol., 1993, 139: 1209-1218.
- [8] CATERS G, et al. Engineering type-1 copper sites in proteins [J]. FEBS Lett., 1993, 325: 39-48.
- [9] XU F, et al. A study of a series of recombinant fungal laccase and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity and stability [J]. Biochim. Biophys. Acta, 1996, 1292: 303-311.
- [10] GRAZIANI M T, et al. Selective removal of type 2 copper from *Rhus vernicifera* laccase [J]. FEBS Lett., 1976, 70: 87-90.
- [11] ERIE-BEBEL M M, et al. Multi-frequency EPR studies of a mercury (II) containing mixed metal derivative of laccase [J]. Biochem. J., 1986, 235: 415-420.
- [12] JAME L C, et al. Spectroscopic and chemical studies of the laccase trinuclear copper active site: geometric and electronic structure [J]. J. Am. Chem. Soc., 1990, 112: 9534-9548.
- [13] REINHAMMAR B, et al. Spectroscopic and catalytic properties of *Rhus vernicifera* laccase depleted in type 2 copper [J]. Inorg. Biochem., 1979, 11: 115-127.
- [14] JAME L C, et al. Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen; an x-ray absorption edge study [J]. J. Am. Chem. Soc., 1990, 112: 2243-2251.
- [15] MESSERSCHMIDT A, et al. X-ray structures and mechanistic implications of three functional derivatives of ascorbate oxidase from Zucchini, reduced, peroxide and azide forms [J]. J. Mol. Biol., 1993, 230: 997-1014.
- [16] MARIE S P, et al. EPR studies of ligand binding to the type 2/type 3 cluster in tree laccase [J]. Chives of Biochemistry and biophysics, 1994, 2: 405-411.
- [17] DARLENE J SPIRA-SOLOMON, et al. Low-temperature magnetic circular dichroism studies of trinuclear copper active site [J]. J. Am. Chem. Soc., 1986, 105: 5318-5332.
- [18] ANDREASSON I E, et al. Kinetic studies of *Rhus vernicifera* laccase, evidence for multi-electron transfer and oxygen intermediate in the reoxidation reaction [J]. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 438: 370-379.
- [19] CLARK P A, et al. Magnetic circular dichroism spectroscopic definition of the intermediate produced in the reduction of dioxygen to water by native laccase [J]. J. Am. Chem. Soc., 1992, 114: 1108-1120.

- [20] WOONSUP SHIM, et al. Chemical and spectroscopic definition of the peroxide-level intermediate in the multicopper oxidases: relevance to the catalytic mechanism of dioxygen reduction to water [J]. J. Am. Chem. Soc. , 1996, 118 (13) : 3202-3215.
- [21] HATAKKA A, et al. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation [J]. FEMS. Microbiol. Rev. , 1994, 13: 125-135.
- [22] KURTZ M B, et al. Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans* [J]. J. Bacteriol. , 1982, 151: 1338-1345.
- [23] KAICHANG L, et al. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound [J]. Appl. Environ. Microbiol. , 1999, 65: 2654-2660.
- [24] BOURBONNAIS, et al. Electrochemical analysis of the interaction of laccase mediators with lignin [J]. Biochim. Biophys. Acta, 1998, 1379: 381-390.
- [25] YOSHINORI N. Purification and characterization of laccase from white rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2 [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 80: 91-93.
- [26] BENNYCHEGETZ, et al. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification [J]. Appl. Environ. Microbiol. , 1998, 64: 3175-3178.
- [27] KADHIM H, et al. Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran [J]. Enzyme and Microbiology Technology, 1999, 24: 303-307.
- [28] XU F, et al. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile [J]. Biochem. J. , 1998, 334: 63-70.
- [29] GOSHADZEM M K, et al. Biosynthesis and some properties of laccase from *Lentinus tigrinus* IBR-101 [J]. Biokhimiya (Moscow), 1993, 58(12) : 1959-1964.
- [30] EGGERT C, et al. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase [J]. Appl. Environ. Microbiol. , 1996, 62: 1151-1158.
- [31] FREDERIC H P, et al. Purification and characterization of laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998, 353: 349-355.
- [32] 秦小琼, 等. 红栓菌胞外漆酶的诱导、纯化及特性研究 [J]. 微生物学报, 1996, 36(3) : 360-366.

ADVANCES IN THE STUDIES ON STRUCTURE OF CATALYTIC ACTIVE SITE AND CHARACTERISTICS OF LACCASE

HU Ping-ping, FU Shi-yu

(Laboratory of Cellulose and Lignocellulosic Chemistry, Guangzhou Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: In nature, laccases play an important role in degrading lignin. However, the abilities to degrading lignin by different laccases vary widely, which depend on the structure of laccases, especially the structure of the tri-nuclear copper site. This text summarizes the studies on the structure of the active site and the characteristics of laccases in the past ten years.

Key words: laccase; active site; characterization; white rot fungus