

综述

漆酶空间结构、反应机理及应用

葛宏华, 武贇, 肖亚中

安徽大学现代实验技术中心&生命科学学院, 合肥 230039

摘要: 漆酶 (EC 1.10.3.2) 属于多铜氧化酶家族, 可以催化氧化酚类和芳香类化合物, 利用自由基反应机理完成 4 个电子的转移, 并将分子氧还原成水。漆酶具有非常保守的拓扑学结构, 结合作者自身工作实践, 对漆酶结构与功能的最新研究进展进行综述, 其中对漆酶的三维结构、活性中心、催化机理研究和最新的应用进展作重点阐述。

关键词: 多铜氧化酶, 漆酶结构, 三核中心

Structure, catalytic mechanism and applications of laccases: a review

Honghua Ge, Yun Wu, and Yazhong Xiao

Modern Experiment Technology Center & School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China

Abstract: Laccases (benzenediol: oxygen oxidoreductases; EC 1.10.3.2) are copper-containing polyphenol oxidases that can oxidize a wide range of aromatic compounds, concomitantly with the transfer of four electrons and the reduction of molecular oxygen to water. The progress on the research of laccases structure and function is reviewed. Their three-dimensional structures and catalytic mechanism, as well as their applications in different fields are emphasized.

Keywords: multicopper oxidases, laccase structure, trinuclear cluster

漆酶 (EC 1.10.3.2) 是一种含铜的多酚氧化酶, 是蓝色多铜氧化酶家族 (MCO) 中最主要的成员。它利用铜离子特有的氧化还原能力氧化酚类和芳香类化合物, 同时将分子氧还原成水^[1]。在 200 多种氧化还原酶当中, 只有 6 类酶可以催化这种有氧的反应 (细胞色素氧化酶、漆酶、L-抗坏血酸氧化酶、

血浆铜蓝蛋白、胆红素氧化酶和吩恶嗪合成酶)。

漆酶最初发现于日本漆树的汁液中, 之后, 在各种担子菌与子囊菌中均发现有大量的漆酶存在, 真菌漆酶具备多种生理生化功能, 如形态发生、真菌与植物寄主相互作用、应激防御以及木质素降解^[2]。目前, 几乎所有的白腐真菌中均发现有漆酶

Received: May 11, 2010; **Accepted:** June 25, 2010

Supported by: Natural Science Foundation of Department of Education of Anhui Province (No. KJ2008A127), Start-up Foundation for Doctor. of Anhui University. (No. 02203105).

Corresponding author: Honghua Ge. Tel: +86-551-5107224; Fax: +86-551-5107240; E-mail: hhge@ustc.edu
安徽省教育厅自然科学基金重点项目 (No. KJ2008A127), 安徽大学博士启动基金项目 (No. 02203105) 资助。

的存在,同时该酶也广泛存在于植物、部分细菌和昆虫中。植物漆酶与木质素的生物合成密切相关;细菌漆酶主要参与形态发生、芽胞外被抵御紫外与过氧化物的伤害、孢子色素的生物合成和铜离子的体内平衡;而昆虫漆酶蛋白的主要功能是控制表皮的骨化作用^[3-4]。

1 漆酶的结构与功能

1.1 一级序列与空间结构

大部分漆酶以胞外单分子球状蛋白形式存在,其分子量约为 60~70 kDa,等电点 pI 4.0 左右。漆酶分子均有不同程度的糖基化,其含量为 10%~25%,也有一些大于 30%^[5]。每个漆酶分子内含有 4 个铜离子,根据光谱学特性可以分成 3 类,包括 1 个 I 型 (T1) 铜离子 (Cu1)、1 个 II 型 (T2) 和 2 个 III 型 (T3) 铜离子 (Cu2 和 Cu3),其中 Cu2 和 Cu3 形成了 1 个三核中心 (TNC)^[6-7]。通过对 100 多个漆酶的序列比对和分析,发现有 4 个特征性序列区 (L1-L4) 可以用来鉴别漆酶^[8](表 1),12 个与铜离子结合的氨基酸残基均位于这 4 个保守区域,其中 L2 和 L4 与之前报道的 MCO 含铜蛋白特征性序列相符,而 L1 和 L3 则是漆酶特有的序列区。此外,根据目前漆酶已知空间结构的比对,可以鉴定出与底物结合相关的 4 个 loop 区 (loop I、II、III、IV)(表 2)。相对于特征性序列区,这些 loop 区无论从一级序列还是空间位置及长度都有着较为明显的不同,

导致了各种漆酶拥有不同的底物特异性。例如笔者解析的栓菌 *Trametes* sp. AH28-2 的 LacB 晶体结构 (PDB 注册号为 3KW7) 具有较长的 loop IV,大大延伸了底物结合区域,同时该 loop 带有较强的负电荷,并在漆酶分子表面形成了一个凸起,因此可能对调节底物的结合发挥着重要作用^[9]。

迄今有下列担子菌漆酶的三维结构被解析:灰盖鬼伞 *Coprinus cinereus* 的漆酶 Lac-Cc (CcL: pdb 注册号 1A65)^[10],变色栓菌 *Trametes versicolor* 的 Lcc I (TvL: 1GYC)^[11]和 Lac IIIb (TvL: 1KYA)^[12],木硬孔菌 *Rigidoporus lignosus* 的 RIL (R1G: 1V10)^[7],虎皮香菇 *Lentinus tigrinus* 的 LtL (2QT6)^[13],毛栓菌 *Trametes trogii* 的 TtL (2HRG)^[14],毛栓菌 *Trametes hirsuta* 的 ThL (3FPX)^[15]以及 *Trametes* sp. AH28-2 的 LacB (3KW7)^[9]。另外,有晶体结构报道的还有来自子囊菌热白丝菌 *Melanocarpus albomyces* 的天然漆酶 MaL (1GWO) 及其重组形式蛋白 rMaL (2Q9O)^[16-17]、以及个别细菌漆酶^[4]。

表 1 漆酶特异性序列

Table 1 laccase signature sequences

	Observed signature sequences in laccases
L1	64 H-W-H-G-X9-D-G-X5-QCPI
L2	104 G-T-X-W-Y-H-S-H-X3-Q-Y-C-X-D-G-L-X-G-X-(FLIM)
L3	400 H-P-X-H-L-H-G-H
L4	450 G-(PA)-W-X-(LFV)-HCHI-DAE-X-H-X3-G-(LMF)-X3-(LFM)

The start position is shown with respect to LacB from *Trametes* sp. AH28-2.

表 2 漆酶的底物结合 loop 序列比对

Table 2 Structural alignment of substrate binding loops

Protein	Substrate binding loops			
	Loop I	Loop II	Loop III	Loop IV
1GYC	159GPRFPLG	261ANPNFGTVGF	332FNGTNFF	386ATALAPGAP
1KYA	159GPAFPLG	261ANPNFGNVGF	332FNGTNFF	386ATAAAPGAP
1A65	159IQGAAQ	260AQPKNKGRNLAGTF	335FSGGRFT	389AGVLGGP
2HRG	159GSPVPTA	260ALPNSGTRNF	331FAGGKFTI	385ATAAAPGFP
2QT6	159GPRFPKG	261ANPNFGTTGF	331FDGNTFFI	385ATTAAPGAP
3FPX	159GPRFPPG	261ANPNFGNVGF	332FNNGSNFFI	386ATAAAPGAP
3KW7	159GPAFPPN	261AIPNTGTIDY	332FNGTNFFI	386ITTVNGVTNAPGAP

所有的这些漆酶结构均采用一种相似的拓扑学结构,以笔者解析的 *Trametes* sp. AH28-2 的 LacB 晶体结构为例 (图 1) (本文中蛋白结构示意图均使用 Pymol 软件绘制^[18]), 整个单体分子由 3 个杯状 (Cupredoxin-like) 结构域 (Domain 1、2、3) 组成, 每个结构域均有 1 个希腊花边 (Greek key) β 桶状结构。CuI 位于 domain 3, 而 TNC 则深埋于 domain 1 和 3 之间, 并与它们的一些保守残基相互作用。此外, LacB 分子内还有 2 个二硫键连接着 domain 1 和 2 以及 domain 1 和 3, 但也有些真菌漆酶含有 3 个二硫键, 比如 MaL^[16]。和大部分漆酶一样, LacB 是一个糖蛋白, 糖的含量约 25%, 在预测的 11 个糖基化位点中, 晶体结构清楚地显示有 8 个位点被不同程度地糖基化^[9]。

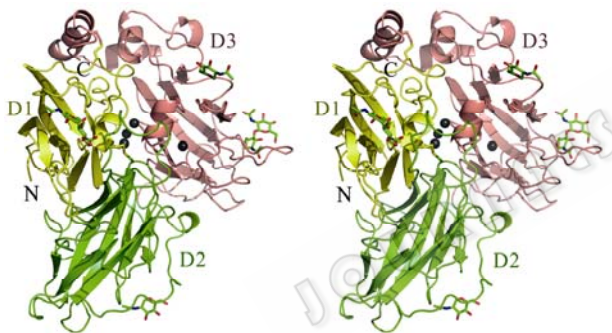


图 1 *Trametes* sp. AH28-2 的 LacB 晶体结构立体视图
Fig. 1 Stereo view of *Trametes* sp. AH28-2 LacB structure.

1.2 CuI 结合位点及与还原性底物的反应

典型的 MCO 成员一般都有 4 个氨基酸残基 (通常有 1 个 Met) 围绕着 CuI 形成了第 1 个配位球体结构^[1], 但在漆酶结构中, CuI 与 1 个 Cys 的硫原子、2 个 His 的氮原子 (Nd1) 组成了 1 个平面三角配位体结构。Cys 的硫和 Cu 的配位键在 614 nm 处有特征性吸收峰, 这也是漆酶呈现蓝色的原因^[19]。在漆酶催化反应中, 底物的 4 个单电子被转移, 而 CuI 是初级电子受体位点, 之后电子通过高度保守的 His-Cys-His 转移到 TNC 三核中心, 进而传递给分子氧使之还原成水^[20] (图 2A)。CuI 的还原是催化过程的限速反应, 采取的是 Marcus 的“outer-sphere”机理, 即 CuI 与底物之间氧化还原电势差 ΔE^0 决定了电子转移速率^[21]。CuI 的 E^0 基本上在 420~790 mV 之间, 高于其他的多铜氧化酶^[22], 目前普遍认为漆酶 CuI 位点缺乏第 4 个配位残基是造成这种高氧化还原电势的重要因素。但这些具有相似的 CuI 配位体结构的漆酶成员如何呈现出不同的氧化还原电势还需要进一步阐明。

CuI 位点是底物反应场, 位于漆酶的表面并形成了一个比较大的凹槽, 从而能够宽松地容纳多种底物。结构 TvL1KYA (TvL 表明漆酶的来源, 1KYA 表示 PDB 注册号, 下同) 第一次展示了高分辨率的漆酶与底物 2,5-二甲苯胺形成的复合物结构^[12], 结

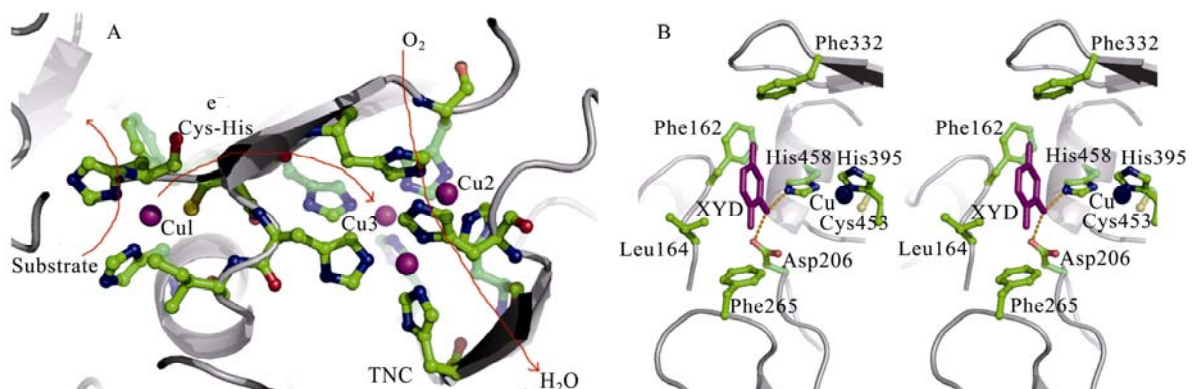


图 2 漆酶活性中心结构示意图 (A) 及 TvL1KYA 与 2,5-二甲苯胺相互作用立体示意图 (B)

Fig. 2 The structure of the laccase active site (A) and stereo view of the active site of TvL1KYA, which binds substrate 2,5-dimethylaniline (B).

构表明 2,5-二甲苯胺结合于底物结合区域, 并于 4 个 loop 上的若干疏水性残基发生相互作用 (图 2B)。此外, His458 和 Asp206 在酶与底物的氨基相互作用中发挥重要作用, His458 与 Cu1 配位成键并在所有 MCO 中高度保守, 其侧链咪唑环与 2,5-二甲苯胺上的氮形成氢键, 这表明在电子传递给 Cu1 过程中, His458 起到了一个入口的作用。与此同时, 2,5-二甲苯胺上的氨基与结合区域背面的 Asp206 的侧链氧形成了另一个氢键^[16], 在担子菌的真菌漆酶中, Asp206 位点相当保守, 而来自于子囊菌的漆酶在这个位置则用 Glu 替代了 Asp。Asp 与底物的相互作用决定了漆酶的 pH 依赖性^[23]: 当 pH 从 3 上升到 5, 由于 Asp206 侧链的去质子化, 使得酚类化合物底物反应的 K_m 值下降。在 pH 5 时, Asp206 的羧基发生解离, 使得活性位点带上负电荷, 从而有利于带羧基或氨基的底物的结合^[12]。

Piontek 等认为 Cu1 与配位基团之间的距离与其氧化还原电势密切相关: 较长的距离会产生较高的氧化还原电势^[11]。在结构 TvL1GYC 中, 由于 Cu-N 键的延长使得自由电子对铜的贡献降低, 造成铜表现出更多的“缺电子”特性, 引起这种较高氧化态的不稳定, 因而提高了氧化还原电势。而 Cu-N 键的增加可能是由于 Ser113 和 Glu460 形成了氢键, 导致 His458 远离了 Cu1 (图 3)。R1G1V10 的结构也验证了上述猜想^[7], 该酶也同样属于高 E^0 的漆酶, 其 Glu459 与 Ser113 形成了一个很强的氢键, 使得 Cu1-His 配位键的距离达到了 2.2Å。序列数据显示 Glu460 和 Ser113 在所有高电势漆酶中高度保守。根据 TtL2HRG 结构, Matera 等^[14]提出, 在 Cu1 附近的 2 个疏水性氨基酸残基 Phe460 和 Ile452 导致了高氧化还原电势的产生, 此外, Phe460 周边大量的疏水性残基也可能对 Cu1 的高电势作出了贡献。

综上所述, 漆酶 Cu1 的氧化还原电势不能归结于某单一结构, 而是多种因素共同作用的结果, 如 Cu1 的配位体结构和周边残基的特性。此外, 底物的位阻效应也是影响漆酶反应偏好性的重要因素^[24], 来自 *T. villosa* 和 *M. thermophila* 的 2 个漆酶具有显

著不同的氧化还原电势 (分别为 0.79V 和 0.46V), 2 个苯丙氨酸 (Phe332 和 Phe265) 形成了进入活性位点的入口, 因为它们之间距离的不同从而决定了进入活性位点的底物具有不同的氧化还原电势 (图 2B)。

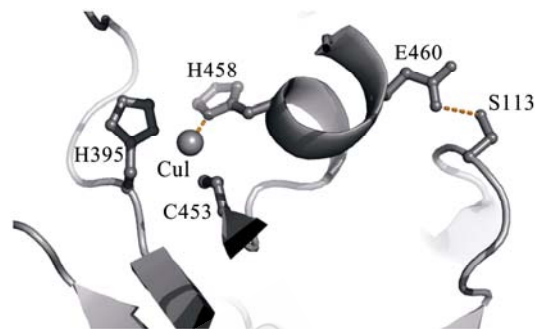


图 3 TvL1GYC 结构中由于 Ser113 和 Glu460 形成了氢键, 导致 His458 远离了 Cu1

Fig. 3 The His458 moved a way from Cu1 as a result of the H bond between Ser113 and Glu460 in TvL1GYC structure.

1.3 TNC 及其与分子氧的反应

另外 3 个铜离子分别属于 Cu2 和 Cu3, 以三角形式形成三核中心 (TNC), 与 4 个非常保守的 His-X-His 序列配位, 其中 6 个组氨酸与 2 个 Cu3 形成配位键, 另 2 个组氨酸与 Cu2 配位。Cu2 离子呈顺磁性, 而 2 个 Cu3 离子为耦合的离子对, 为抗磁性。Cu3 在 330nm 处有宽的吸收峰, Cu2 则没有特征的吸收峰^[25]。TNC 的作用是结合分子氧, 利用从单核中心 Cu1 传递过来的 4 个电子将分子氧还原成水^[10]。对具体催化细目前还比较有争议。Lee 等认为^[19]: 从全还原状态的酶到氧分子的 2 个连续的双电子转移过程中产生 2 个中间体形式, 即过氧中间体 (PI: peroxy intermediate) 和天然中间体 (NI: native intermediate) (图 4)。第一步双电子转移是限速步骤, 而包括 2 个电子还原性的切割 O-O 键的第二步反应则快得多。处于完全还原状态时, TNC 具有配体不饱和性^[26], 附近残基的阴离子电荷则稳定了带有高正电荷的 TNC, 特别是在 Cu2 附近高度保守的阴离子残基 (如在 TvL1KYA 的 D77) 在这个反应过程中起着非常关键的作用^[20,26]。NI 时氧分子被

完全还原成水但还保持在三核中心，其所有连接键的结构更有利于电子在三核中心重排^[20]。相反，当酶处于静止态形式 (Resting form) 时，Cu₂ 就会从这些连接键中脱离出来。在没有还原性底物存在时，NI 衰减成静止态会非常缓慢，因此 NI 应该是酶完全氧化时的形式^[19]。事实上 NI 衰减成静止态过程涉及到氧原子从三核中心由内而外的结构重组，1 个剩余的氧原子以 OH⁻ 的形式与 Cu₂ 结合，2 个 Cu₃ 核心也与 1 个 OH⁻ 配位成键^[27]。大致上，4 个铜原子在还原底物的作用下，首先 Cu₁ 被还原，然后通过 Cu-S(Cys)-N(His) 途径，将 TNC 的 3 个铜逐个还原。对于还原顺序，Yoon 等提出了一个比较合理的机制^[27]，因为在 Cu₂ 和 Cu₃ 附近存在有带负电荷的残基，因此 Cu_{3a} 第一个被还原，之后，Cu₂ 会被还原，剩下的 Cu_{3b} 通过位于 Cu₁ 和 Cu₃ 核心之间的 Cys-His 途径得以快速还原并伴随着 2 个水分子的释放。如果 Cu_{3b} 的还原早于 Cu₂ 就会导致 OH⁻ 配位键的质子化，造成 Cu₂-Cu_{3b} 间电子耦合力的下降，最终无法将电子传递给 Cu₂。

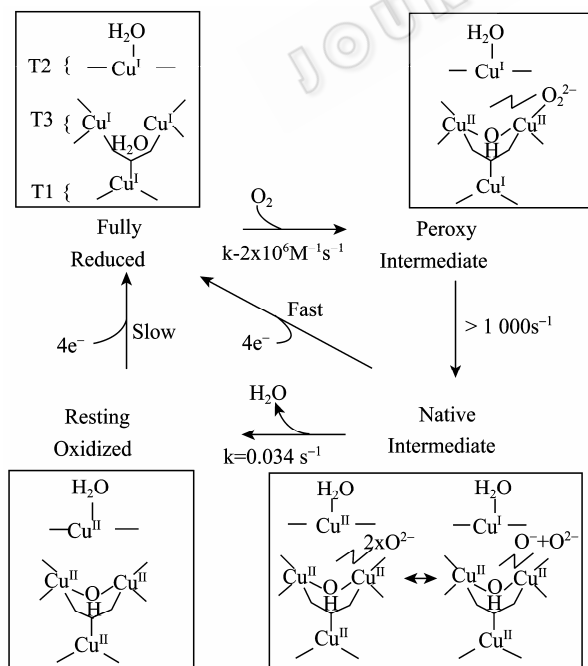


图 4 MCO 还原分子氧成水分子的机理

Fig. 4 Mechanism of O₂ reduction to water by the MCOs.

在蛋白结构内部有 2 个通向 TNC 的溶剂通道，第 1 个指向 2 个 Cu₃ 离子，使得氧分子可以进入并结合 TNC，第 2 个通道位于 TNC 另一边通向 Cu₂，当氧分子还原成水分子后从该通道释放^[11,13]。

2 漆酶的反应及其应用前景

酚类化合物是典型的漆酶底物，它们的氧化还原电势较低，可以允许电子传递给 Cu₁。丁香醛连氮 (Syringaldazine)、DMP 和邻甲氧基苯酚是最常见的酚类底物，但漆酶也能氧化其他的一些电子供体底物如 ABTS 或氰亚铁酸盐^[28]。反应过程中，酚被氧化成苯氧自由基，根据反应条件的不同，可以进一步通过自由基耦合反应产生聚合、或重排产生苯醌、或导致烷基-芳香基断裂、C α 的氧化以及 C α -C β 和芳香环的断裂^[29]。Xu 比较了若干漆酶对一系列苯酚类、苯胺类和苯硫酚类底物的催化反应，发现催化效率与底物结构以及 Cu₁ 和底物间单电子氧化还原电势差密切相关^[30]，而当底物在 *o*-和 *p*-位置同时存在基团时，*T. troglia* 漆酶催化底物反应效率会明显增加。因此，底物的原子空间排布和氧化还原电势与漆酶催化反应效率密切相关^[24]。

漆酶不能直接氧化具有高氧化还原电势的底物，但一些白腐真菌漆酶在木质素降解中发挥着重要作用。一些相应的化合物 (称为介体 mediator) 作为漆酶的中介底物，使漆酶可以间接催化大分子底物和非芳香族化合物的氧化反应^[31]。针对纸浆去木质素的漆酶/介体系统 (LMS) 使用的第一个介体是 ABTS，之后大约有 100 多个化合物用作介体来测试氧化木质素的能力。一个有效的介体应该是一个合适的漆酶底物，它氧化后的自由基具有较长的半衰期，并带有较高的氧化电位。N-O \cdot 自由基在活性和稳定性方面比苯氧自由基显得更加平衡^[32]，因此木质素降解中最有效的介体都含有 N-OH 基团的氮杂环化合物，特别是 1-羟基苯并三唑 (HBT)。

Jeon 等比较了在含有不同介体组成的“鸡尾酒”配方下 *G. lucidum* 漆酶氧化五氯苯酚 (PCP) 的能

力,发现“鸡尾酒”混合物比单个介体更能提高漆酶氧化 PCP 的能力。相比较香草醛和乙酰香兰酮, *G. lucidum* 漆酶更倾向于利用 ABTS 作为介体,但 ABTS 自由基和香草醛(或乙酰香兰酮)的同时存在可以显著地加快 PCP 的氧化并伴随着电子从香草醛(或乙酰香兰酮)到 ABTS 自由基的转移^[33]。这些结果显示香草醛和乙酰香兰酮介导 ABTS 和 PCP 之间的反应是通过漆酶和这些介体之间连续的电子传递而实现的。

漆酶具有宽泛的底物氧化能力,并能够利用氧分子作为电子受体,因此作为生物催化剂被广泛地应用于多个领域。在纸浆去木质素、生物漂白、工业废水净化、纺织染色工业、饮料果汁加工以及生物传感器和生物电池的加工等领域都具有很大的潜在应用价值^[34]。近年来的若干研究集中在如何利用漆酶对工业染料进行降解,大部分工作都利用了可用的商业化染料作为模型污染物^[35],并取得了很好的效果,甚至对皮革工业中使用的偶氮染料,漆酶亦具有较好的脱色效果^[36]。从 *P. ostreatus* 中制备的漆酶混合物甚至可以对 RBBR 蒽醌染料进行脱色反应并达到 70% 的效果,当该制备物被固定化后还可以重复使用^[37]。然而,真正的工业废水常常包括多种染料,对于混合的染料降解取得的数据还比较有限。这也是今后漆酶在应用领域的研究热点。目前,利用漆酶对模拟的纺织工业废水染料混合物的降解作用已经在 SOPHIED EU 计划(NMP2-CT-2004-505899, 6FP) 框架下进行了成功的测试,标志着这项技术在纺织染料废水处理中实际应用的可能性。

漆酶亦可应用于化学合成。例如漆酶催化反应可用来将儿茶酚单体聚合成聚邻苯二酚或产生惰性苯酚类聚合物(如多聚萘酚)^[38]。这些聚合物可以用于复合木材、纤维焊接、薄片材料、涂料和粘合剂的制备。而利用漆酶催化的交联反应原理设计的一个酶促聚合反应系统可以用来生产人造漆聚合膜(日本传统涂料)。漆酶也被用于染料合成和制药业,

如制备抗癌剂 actinocin 或植物抗毒素 resveratrol^[39]。

此外,合适的 LMS 系统能够很有效地降解芳香族化合物、漂白纸浆、控制树脂障碍以及进行染料脱色^[40]。但利用工业合成这些介体并不可取,因为成本较高并且可能会产生有毒物质。天然介体的使用更有利于 LMS 系统的应用。事实上,一些木质素衍生的苯酚类化合物已经被证实可以介导漆酶的染料脱色、纸浆木质素去除和 PAH 的氧化作用,比如天然对香豆酸(对羟基苯基丙烯酸)作为漆酶介体在降解 3,4-苯并芘时比合成的介体具有更高的效率^[41]。

3 展望

对于漆酶的研究与应用已有一百多年的历史,特别是现代光谱学、晶体学和结构量子化学等方法的应用极大地推动了对漆酶的结构和催化机理的了解,进而对漆酶在各个领域的应用具有建设性的指导意义。然而,对漆酶的研究和了解远没有达到预期的程度,还存在着诸如糖基如何发挥作用、电子如何在残基之间传递等难题有待解决,同时如何通过蛋白质工程来改造漆酶,进一步提高其实际应用范围也是漆酶研究中的一个焦点。这些也为我们今后研究漆酶提供了丰富的素材,而未来更多更高分辨率漆酶结构的解析以及各种新技术新方法的引入则是解答这些难题的关键。

总之,漆酶是一个古老的酶蛋白,具有很广阔的应用前景。无论是作为一个结构与功能关系的研究模型,还是在不久的将来作为绿色环保工具(Green tool)应用于生物技术工业,都具有非常巨大的实用性价值。

REFERENCES

- [1] Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev*, 1996, 96(7): 2563-2606.
- [2] Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties.

- FEMS Microbiol Rev, 2006, 30(2): 215–242.
- [3] Bao W, O'Malley D M, Whetten R, et al. A laccase associated with lignification in Loblolly Pine Xylem. Science, 1993; 260(5108): 672–674.
- [4] Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, et al. Crystal structure of a bacterial endospore coat component – A laccase with enhanced thermostability properties. J Biol Chem, 2003, 278(21): 19416–19425.
- [5] Shleev SV, Morozova OV, Nikitina OV, et al. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. Biochimie, 2004, 86(9/10): 693–703.
- [6] Palmer AE, Lee SK, Solomon EI. Decay of the peroxide intermediate in laccase: reductive cleavage of the O-O bond. J American Chemical Society, 2001, 123(27): 6591–6599.
- [7] Garavaglia S, Cambria MT, Miglio M, et al. The structure of *Rigidoporus lignosus* Laccase containing a full complement of copper ions reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. J Mol Biol, 2004, 342(5): 1519–1531.
- [8] Kumar SV, Phale PS, Durani S, et al. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. Biotechnol Bioeng, 2003, 83(4): 386–394.
- [9] Ge H, Gao Y, Hong Y, et al. Structure of native laccase B from *Trametes* sp. AH28-2. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2010, 66(Pt 3): 254–258.
- [10] Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, et al. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. Nat Struct Biol, 1998, 5(4): 310–316.
- [11] Piontek K, Antorini M, Choinowski T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. J Biol Chem, 2002, 277(40): 37663–37669.
- [12] Bertrand T, Jolival C, Briozzo P, et al. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. Biochemistry, 2002, 41(23): 7325–7333.
- [13] Ferraroni M, Myasoedova NM, Schmatchenko V, et al. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. BMC Struct Biol, 2007, 7: 60.
- [14] Matera I, Gullotto A, Tilli S, et al. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate. Inorganica Chimica Acta, 2008, 361(14/15): 4129–4137.
- [15] Polyakov KM, Fedorova TV, Stepanova EV, et al. Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å resolution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2009, 65(Pt 6): 611–617.
- [16] Hakulinen N, Kiiskinen LL, Kruus K, et al. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. Nat Struct Biol, 2002, 9(8): 601–605.
- [17] Hakulinen N, Andberg M, Kallio J, et al. A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccase. J Struct Biol, 2008, 162(1): 29–39.
- [18] DeLano WL. The PyMOL molecular graphics system. <http://www.pymol.org> 2002.
- [19] Lee SK, George SD, Antholine WE, et al. Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. J American Chemical Society, 2002, 124(21): 6180–6193.
- [20] Solomon EI, Augustine AJ, Yoon J. O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases. Dalton Trans, 2008(30): 3921–3932.
- [21] Xu F, Shin W, Brown SH, et al. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. Biochim Biophys Acta, 1996, 1292(2):303–311.
- [22] Gray HB, Malmstrom BG, Williams RJ. Copper coordination in blue proteins. J Biol Inorg Chem, 2000, 5(5): 551–559.
- [23] Xu F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. J Biol Chem, 1997, 272(2): 924–928.
- [24] Tadesse MA, D'Annibale A, Galli C, et al. An assessment of the relative contributions of redox and steric issues to laccase specificity towards putative substrates. Org Biomol Chem, 2008, 6(5): 868–878.
- [25] Torres J, Svistunenko D, Karlsson B, et al. Fast reduction of a copper center in laccase by nitric oxide and formation of a peroxide intermediate. J American Chemical Society, 2002, 124(6): 963–967.
- [26] Quintanar L, Yoon J, Aznar CP, et al. Spectroscopic and electronic structure studies of the trinuclear Cu cluster active site of the multicopper oxidase laccase: nature of its

- coordination unsaturation. *J American Chemical Society*, 2005, 127(40): 13832–13845.
- [27] Yoon J, Liboiron BD, Sarangi R, et al. The two oxidized forms of the trinuclear Cu cluster in the multicopper oxidases and mechanism for the decay of the native intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(34): 13609–13614.
- [28] Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, et al. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*1. *The Bio-chemical J*, 1999, 341(Pt 3): 655–663.
- [29] Kawai S, Umezawa T, Higuchi T. Degradation mechanisms of phenolic beta-1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. *Archives Biochem Biophys*, 1988, 262(1): 99–110.
- [30] Xu F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, 1996, 35(23): 7608–7614.
- [31] Bourbonnais R, Paice MG. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett*, 1990, 267(1): 99–102.
- [32] Xu F, Kulys JJ, Duke K, et al. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(5): 2052–2056.
- [33] Jeon JR, Murugesan K, Kim YM, et al. Synergistic effect of laccase mediators on pentachlorophenol removal by *Gano-derma lucidum* laccase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(4): 783–790.
- [34] Abadulla E, Tzanov T, Costa S, et al. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(8): 3357–3362.
- [35] Pereira L, Coelho AV, Viegas CA, et al. Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase. *J Biotechnol*, 2009, 139(1): 68–77.
- [36] Couto SR. Decolouration of industrial azo dyes by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *J Hazardous Materials*, 2007, 148(3): 768–770.
- [37] Palmieri G, Giardina P, Sannia G. Laccase-mediated remazol Brilliant Blue R decolorization in a fixed-bed bioreactor. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(5): 1436–1441.
- [38] Ceylan H, Kubilay S, Aktas N, et al. An approach for prediction of optimum reaction conditions for laccase-catalyzed bio-transformation of 1-naphthol by response surface methodology (RSM). *Biores Technol*, 2008, 99(6): 2025–2031.
- [39] Ossiadacz J, Al-Adhami A, Bajraszewska D, et al. On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. *J Biotechnol*, 1999, 72: 141–149.
- [40] Gutierrez A, Del Rio JC, Ibarra D, et al. Enzymatic removal of free and conjugated sterols forming pitch deposits in environmentally sound bleaching of eucalypt paper pulp. *Environ Sci & Technol*, 2006, 40(10): 3416–3422.
- [41] Canas A, Alcalde M, Plou FJ, et al. Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environ Sci & Technol*, 2007, 41: 2964–2971.