

文章编号: 1673 1689(2010)05-0748-07

毛云芝菌固体发酵产漆酶的分 离纯化及酶学性质

孙巍^{1,2}, 夏春雨^{1,2}, 蔡和辉^{1,2}, 刘学铭^{*1}

(1. 广东省农业科学院 蚕业与农产品加工研究所, 广东 广州 510610; 2. 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘 要: 作者对毛云芝菌利用桑叶和麸皮固体发酵所产漆酶进行了分离纯化, 并研究了纯化后漆酶的酶学性质。将毛云芝菌固体发酵漆酶粗提液通过离心、过滤、大孔树脂脱色、硫酸铵分级盐析、DEAE-Sephadex fast flow 层析、Sephadex G-100 凝胶过滤层析, 结果得到电泳纯的漆酶, 纯化倍数 15.53, 酶活回收率 51.21%。用 SDS-PAGE 测得该酶相对分子质量 62 600; 该酶反应的最适温度为 50 ℃, 在柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中最适 pH 值为 4.0, 在醋酸缓冲液中最适 pH 值 3.0; 氧化 ABTS 的 K_m 为 0.093 mmol/L, 对邻苯二酚的 K_m 为 3.71 mmol/L。

关键词: 毛云芝菌; 漆酶; 固体发酵; 纯化; 酶学性质

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Purification and Properties of Laccase Produced by *Coriolus hirsutus* in Solid State Fermentation

SUN Wei^{1,2}, XIA Chunyu^{1,2}, CAI Hehui^{1,2}, LIU Xueming^{*1}

(1. Sericulture & Farm Produce Processing Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China; 2. Bioscience & Bioengineering College, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In this paper, purification and properties of laccase produced by *Coriolus hirsutus* in solid state fermentation were studied. Crude extract of laccase from *Coriolus hirsutus* was collected after solid state fermentation. The laccase was purified to electrophoretic homogeneity by the serials of steps of centrifugation, filtration, ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex fast flow and gel filtration on sephadex G-100. Purification of 15.53 fold was achieved with an overall yield of 51.21%. Its molecular weight was estimated to be about 62 600 by SDS-PAGE. Studies on the properties of the laccase showed that the optimum temperature was 50 ℃ and the optimum pH were 4.0 in citrate buffer and 3.0 in sodium acetate buffer. The laccase catalyzed the oxidation of ABTS and catechol with a michaelis constant of 0.093 mmol/L and 3.71 mmol/L, respectively.

收稿日期: 2009-11-01

基金项目: 教育部留学回国科研启动基金(教外司留[2007]1108号)。

作者简介: 孙巍(1982-), 女, 吉林省吉林市人, 微生物发酵工程博士研究生。Email: sunwei19820619@126.com

* 通信作者: 刘学铭(1967-), 男, 江西兴国, 工学博士, 研究员, 主要从事农产品加工方面的研究。Email: xuemingliu37@126.com

Key words: *Coriolus hirsutus*, laccase, solid state fermentation, purification, enzymatic properties

漆酶(Laccase, EC1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶,多为分泌型糖蛋白,含糖10%~80%不等。漆酶能氧化酚类和芳香族化合物,同时伴随4个电子的转移,将分子氧还原成水^[1]。漆酶最早发现于日本漆树的汁液中,后来证实,漆酶除了存在于植物中,还广泛地存在于真菌(尤其是白腐菌)中^[2]。最近,也有报道称漆酶存在于细菌中^[3]。漆酶具有广泛的底物专一性,用于多种加工行业,如纺织染料脱色、纸浆漂白、废水处理、生物传感器及生物修复等^[4],因而成为生物学、化学和环境科学等领域的一个研究热点^[5]。

毛云芝菌是一种具有较高产酶能力的白腐真菌,漆酶在白腐真菌降解体系中起着非常重要的作用。作者对毛云芝菌固体发酵产生的漆酶进行了分离纯化,并对其酶学性质进行了初步研究,为克隆此酶的基因或应用研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

毛云芝菌(*Coriolus hirsutus*):澳大利亚联邦科学工业研究组织食品科学研究所(Food Science Australia, CSIRO)赠送,作者所在实验室保藏。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂 ABTS[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)]和小牛血清白蛋白:购自Sigma公司;DEAE-Sepharose fast flow:购自Pharmacia公司;低相对分子质量标准蛋白质(相对分子质量范围144 000~97 400):国产;Sephadex G-100:购自Whatman公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2.2 仪器 GL-20G-II冷冻离心机,EDWARD冷冻干燥机,DYCE垂直电泳槽,核酸蛋白检测仪,LM17型记录仪,SBS数控计滴部分收集器,恒流泵,UV1700分光光度计,层析柱(1.6 cm×20 cm, 1.6 cm×50 cm),冷冻层析柜。

1.3 培养基

1.3.1 PDA斜面培养基 马铃薯20 g/dL,葡萄糖2 g/dL,琼脂2 g/dL。

1.3.2 液体菌种培养基 马铃薯20 g/dL,葡萄糖2 g/dL,酵母膏0.5 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/dL, KH_2PO_4 0.3 g/dL, VB_1 0.001 g/dL, 121℃

30 min 灭菌。

1.3.3 固体发酵培养基 桑叶48.15 g/dL,麸皮48.15 g/dL,葡萄糖1.05 g/dL,草酸铵1.4 g/dL, KH_2PO_4 0.75 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/dL, CuSO_4 0.03%,充分混匀后按湿物料(g):水(mL)为1:3向培养料中加水,121℃灭菌35 min。

1.4 测定方法

1.4.1 蛋白质质量浓度测定 考马斯亮蓝法^[6],牛血清白蛋白作为标准蛋白质。

1.4.2 漆酶活力测定 3 mL反应总体积中,含0.1 mL适当稀释的粗酶液,2.7 mL、0.1 mol/L醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5),加入0.2 mL、0.5 mmol/L的2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)[2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)简称ABTS],室温条件下,采用UV-1700紫外可见分光光度计测定420 nm下反应前3分钟内的吸光值变化^[7]。

1.4.3 脱色率的测定

脱色率(%) = $(\text{OD}_{\text{前}} - \text{OD}_{\text{后}}) \times 100 / \text{OD}_{\text{前}}$

式中: $\text{OD}_{\text{前}}$ 、 $\text{OD}_{\text{后}}$ 分别为脱色前后粗酶液在510 nm处测得的吸光度值。

1.5 粗酶液制备

毛云芝菌固体发酵10 d后,按湿物料(g):水(mL)为1:3加入蒸馏水,40℃浸提4 h,挤出浸提液,以手握无水滴出为度,3 000 r/min转速离心10 min,上清液即为漆酶粗提液。

1.6 漆酶的分离与纯化

1.6.1 粗酶液脱色 取离心后的粗酶液10 mL,按3%的加入量分别加入活性炭、硅胶、硅藻土和高岭土,另外取10 mL粗酶液分别加入2 g处理过的不同树脂,放入恒温摇床中,28℃、150 r/min处理3 h,4 000 r/min离心10 min,过滤后观察并测定色素的去除情况,计算脱色前后的脱色率及酶活回收率。

1.6.2 硫酸铵分级沉淀漆酶蛋白样品的制备 向粗酶液中分别加入0、40、50、60、70、80、90 g/dL饱和度的硫酸铵进行盐析沉淀,于4℃、10 000 g离心10 min后,然后分别测定上清液中的酶活,确定一级和二级盐析浓度。首先将脱色后的粗酶液进行分级盐析沉淀,于4℃静止过夜后,10 000 g离心30 min,取其沉淀重新溶于dd H_2O 中,然后将所得

酶液置于处理好的透析袋中于 0.01 mol/L 的磷酸钠缓冲液(PBS pH 7.8)中进行透析除盐,于 4℃、10 000 g 离心 30 min,取上清液在-20℃冷冻过夜,冷冻干燥 96 h,获得样品冻干粉于-20℃保存备用。

1.6.3 DEAE-Sephrose fast flow 柱层析 将上述所得冷冻干燥粉末重溶后加到已用 PBS(0.01 mol/L、pH 7.8)平衡过的 DEAE-Sephrose fast flow 柱(1.6 cm×20 cm)上,先用 PBS 洗柱,后改用含 0~0.5 mol/L 氯化钠的磷酸盐缓冲液进行梯度洗脱,洗脱流速 20 mL/h,按 3 mL/管收集洗脱峰,用核酸蛋白监测仪检测 280 nm 处的光吸收值,并逐管测定 280 nm 处的光吸收值和漆酶活力,合并有酶活力组分。

1.6.4 Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析 将上述所得活力经冷冻干燥浓缩后,溶解于初始缓冲液 PBS 中,所得酶液加到平衡好的层析柱(1.6 cm×50 cm)上,用洗脱液(pH 7.8 的 PBS 缓冲液)以 0.2 mL/min 的流速洗柱并收集洗脱液,每 10 min 收集一管。分别测定各管洗脱液在 280 nm 处的吸光度和漆酶活性,收集合并酶活性峰值组份于透析袋内,真空冷冻干燥后,-20℃保存备用。

1.7 酶学性质

1.7.1 纯度及表观相对分子质量测定 SDS-PAGE 分析漆酶纯度和亚基大小。浓缩胶质量浓度 5 g/dL,分离胶质量浓度 10 g/dL,垂直平板不连续电泳,考马斯亮蓝 R250 染色。根据标准蛋白质的相对迁移率 R_f 对相对分子质量作 R_f - $\lg M_r$ 图,求出该酶的相对分子质量。

1.7.2 酶的最适反应 pH 值及 pH 值稳定性 分别在不同 pH 值条件下(pH 2.5~6.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;pH 3.0~6.2 乙酸-乙酸钠缓冲液)测定酶液的相对酶活(酶活力最高者为 100%)。为考察酶的酸碱稳定性,分别测定不同 pH 2.8~7.2 的醋酸缓冲液下 28℃保温 1、5、20 h 后酶液的残余相对酶活(以储存于 4℃未保温酶液的酶活为 100%)。

1.7.3 酶的最适反应温度及热稳定性 分别在不同温度下测定酶液的相对酶活(以酶活最高者为 100%)。为考察酶的热稳定性,将酶液分别在不同温度下保温 20、40、60、80、100 min,迅速冷却至室温,按标准方法测残余酶相对活力(以贮存于 4℃未保温酶液的酶活 100%)。

1.7.4 动力学常数测定 在不同底物(ABTS、儿茶酚)质量浓度的反应体系中,在 30℃、pH 4.5 的

醋酸缓冲液中,反应 3 min,测定 OD₄₂₀ 以计算酶反应的初速度,做 Lineweaver-Burks 双倒数图。

2 结果与分析

2.1 粗酶液的脱色

毛云芝菌固体发酵漆酶的粗提液中颜色较深,呈深棕色,这些色素物质成分复杂,在酶的分离提纯中会污染色谱分离填料,给漆酶的分离纯化带来困难。因此选用活性炭、硅胶、硅藻土和高岭土对粗酶液进行脱色,离心去除活性炭、硅胶、硅藻土和高岭土后,发酵液颜色仍然很深,脱色效果不好,且酶活都有较大的损失,不同树脂的脱色效果见表 1。

表 1 漆酶提取液的树脂脱色效果
Tab. 1 Decolorization of laccase extract with resins

树脂类型	脱色率/%	酶活保留率/%
D291	10.5	6.5
D293	27.1	13.3
D303	81.3	49.5
HZ-816	62.2	97.3
HZ-818	87.7	37.6
X-5	43.3	16.3
AB-8	85.0	4.8
NKA	82.1	2.7
NAK-9	77.1	1.6
HD-1	80.9	66.5

筛选树脂时应该综合考虑脱色率和酶活保留率两个因素。比较以上脱色效果较好树脂的酶活保留率,HZ-816 的脱色效果虽然不是最佳的,但是它对酶的吸附较少,酶活保留率最高。因此,选择 HZ-816 作为粗酶液的脱色树脂。

采用 HZ-816 树脂,在 pH 值自然(约为 6 左右)、温度 30℃,以 1 BV/h 的流速脱色条件下对粗酶液进行脱色时,脱色率可达到 64.2%,酶活保留率为 96.6%,并且在脱色的过程中能除去一部分杂蛋白质,经过该树脂脱色后,酶的比活力有一定提高。

2.2 漆酶的纯化

2.2.1 硫酸铵饱和度对盐析沉淀漆酶的影响 向脱色后的粗酶液中分别加入不同饱和度的硫酸铵进行盐析沉淀后,分别测定上清液残留酶活,以未加硫酸铵的酶液的酶活为 100%,结果见图 1。

用 40% 饱和度的硫酸铵进行盐析沉淀时,其上清液中保留了大部分的酶活力,而 70% 饱和度的硫酸铵盐析上清液中剩余的酶活仅为粗酶液的 3.49%,因此确定 40% 和 70% 饱和度为一级和二级

盐析浓度。发酵液经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀,不仅去除发酵液中杂质,同时浓缩酶液。

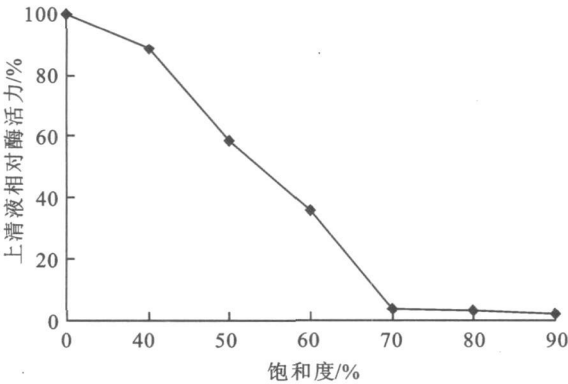


图 1 硫酸铵盐析曲线

Fig. 1 Curve of ammonium sulphate fractionation

2.2.2 DEAE-Sephacrose fast flow 柱层析纯化漆酶效果 将上述所得酶液加到DEAE- Sepharose

fast flow 柱子上,其层析流出图谱见图 2。收集合并漆酶活性高的峰。

2.2.3 Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析纯化漆酶效果 经 DEAE-Sephacrose fast flow 柱层析后得到的样品上 Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析后,用 pH 7.8 的 PBS 缓冲液洗脱,相对分子质量较大的蛋白质先被洗脱下来,相对分子质量较小的蛋白质后被洗脱下来,结果见图 3。出现一个比较明显的蛋白质峰和单一的酶活性峰,且该酶活峰集中在该蛋白质峰中,收集合并漆酶活性高的峰。

2.2.4 纯化结果 分别测定以上各步骤的酶活力和蛋白质含量,求出各步骤纯化后的比活力、产率以及纯化倍数,各步纯化结果见表 2。可见毛云芝菌漆酶经过脱色、盐析、DEAE- Sepharose fast flow 和 Sephadex G-100 分子筛柱层析后,得到了较纯的漆酶,纯化倍数为 15.53 倍,产率为 51.21%。

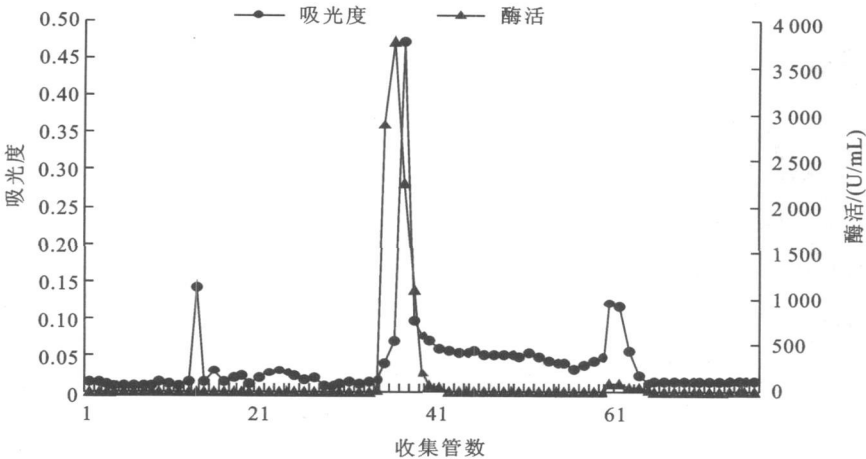


图 2 漆酶的 DEAE Sepharose fast flow 柱层析流出图谱

Fig. 2 Elution curve of laccase on a DEAE Sepharose fast flow column

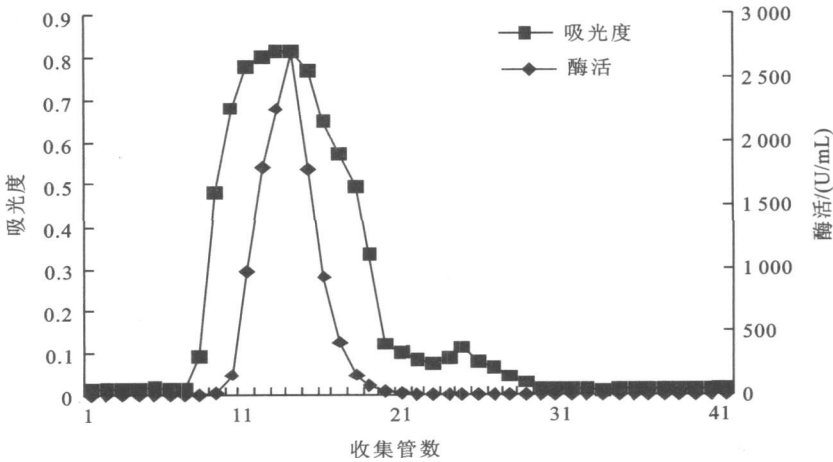


图 3 漆酶的 Sephadex G 100 柱层析流出图谱

Fig. 3 Elution curve of laccase on a Sephadex G75 column

表 2 毛云芝漆酶的纯化结果

Tab. 2 The purification results of laccase produced by *Coriolus hirsutus*

纯化 步骤	总酶 活力/ U	总蛋白质 质量/ mg	比酶活力/ (U/mg)	产率/ %	纯化 倍数
粗酶液	520 111	470. 65	1 105. 09	100	1
脱色液	502 421	250. 19	2 008. 16	96. 60	1. 82
40~ 90 g/ dL(NH ₄) ₂ SO ₄	413 700	164. 75	2 511. 08	82. 30	2. 27
DEAE Sepharose fast flow	376 336	49. 62	7 584. 36	72. 36	6. 86
Sephadex G- 100	266 352	15. 52	1 7161. 86	51. 21	15. 53

2 3 漆酶的酶学性质

2 3 1 纯度及表观相对分子质量的测定 SDA-PAGE(图 4)图谱表明,该样品为单一组分,得到相对分子质量与相对迁移率的关系,从中得到漆酶的相对分子质量大约为 62 600,这与 Bonomo^[8]等人报道的漆酶同工酶 D 相对分子质量和康从宝^[9]等人报道的漆酶相对分子质量相似。

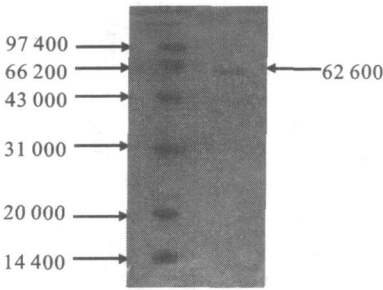


图 4 纯化漆酶的 SDS PAGE 图谱

Fig. 4 SDS PAGE of laccase at purification stages

2 3 2 pH 值对酶活的影响及酶的酸碱稳定性 选用不同组分的缓冲液往往对酶活性有不同的影响。采用不同 pH 值的不同缓冲液,按常规的方法测酶活力,结果见图 5。漆酶在柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中最适 pH 值为 4.0,在醋酸缓冲液中最适 pH 值为 3.0。

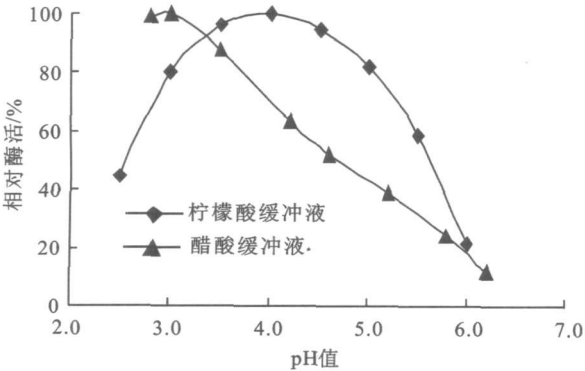


图 5 柠檬酸缓冲液和醋酸缓冲液对酶活力的影响

Fig. 5 Effect of citrate buffer and sodium acetate buffer on laccase activity

图 6 结果表明,该酶在 pH 7.0 左右比较稳定,保温 20 h 后残余酶活力仍保持 61.48%,pH 值低于 6.0 时酶活损失较大。

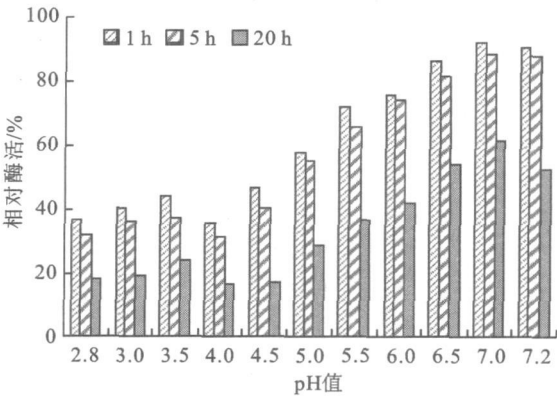


图 6 漆酶的 pH 值稳定性

Fig. 6 pH stability of laccase

2 3 3 温度对酶活力的影响及酶的热稳定性 在不同温度下测定漆酶活力,结果见图 7。该漆酶的最适温度为 50 ℃,在 35~ 60 ℃范围内均显示较高的酶活。大于 65 ℃时,酶活力下降较快。由图 8 可看出,处理温度低于 60 ℃时,漆酶比较稳定,当在 30 ℃保温 100 min 后,其残余酶活为 94.57%,而当温度提高到 60 ℃时,漆酶酶活明显失活,70 ℃保温 100 min 后,漆酶基本完全失活。由此可见,漆酶在 30 ℃条件下其酶活下降缓慢,随着温度的升高,其酶活下降速度加快,但当温度升至 60 ℃时,其在 60 min 后残留漆酶的活力仍有 61.01%,表明该酶对温度的变化并不是很敏感,属于热稳定性较好的漆酶。

2 3 4 动力学 K_m 值测定 分别采用 ABTS 和儿茶酚(邻苯二酚)作为漆酶反应底物,在 30 ℃、pH 值为 4.5 的条件下,取不同质量浓度的 ABTS 和邻苯二酚,测定其反应速度(v),得到 $1/v$ 与 $1/[S]$ 的关系曲线,见图 9、10,从而得到该漆酶对 ABTS 的 K_m 为 0.093 mmol/L,对邻苯二酚的 K_m 为 3.71

mmol/L。由此可见,该漆酶与 ABTS 的结合力比漆酶与儿茶酚的结合力强。

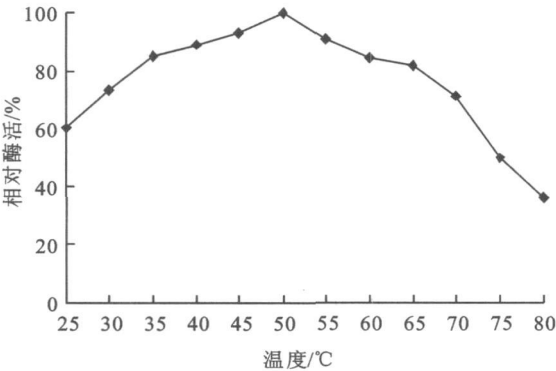


图 7 温度对漆酶活性的影响

Fig. 7 Effect of temperature on laccase activity

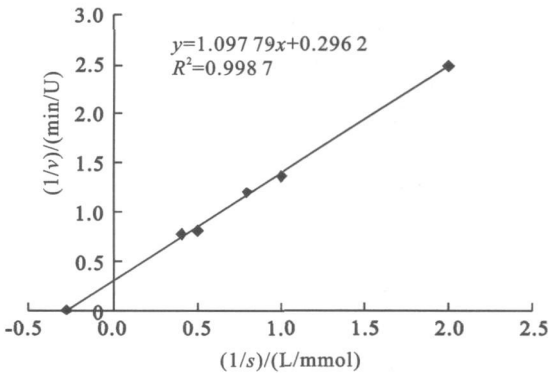


图 10 漆酶以儿茶酚为底物的动力学曲线

Fig. 10 Curve of Lineweaver Burk of laccase using catechol as substrate

3 结 语

由于漆酶有很宽的底物特异性,能催化许多芳香类化合物的氧化,在芳香族电子传递体存在的条件下,漆酶作用范围可以扩大^[10-12],所以 ABTS、HBT、3-羟基(邻)氨基苯甲酸等氧化还原介质存在时^[13-14],漆酶能够氧化非酚类芳香化合物,这使得漆酶广泛用于多种加工行业,具有很好的应用价值。许多文献都已经报道了对不同来源漆酶的分离纯化及性质研究。毛云芝菌利用桑叶和麸皮固体发酵所产生的漆酶最适反应 pH 值,最适温度及其动力学常数与已有的报道相比有所不同,这可能因为不同的菌株所产漆酶性质不同,培养基、培养条件对于不同的同工酶分泌可能有一定影响。该酶的最适反应 pH 值在不同的缓冲体系中有差别,这可能依赖于专一性底物的使用^[15]。在酶的最适反应温度和耐热性方面,大多数漆酶的最适反应温度在 50℃左右。耐热性方面,虽然不同文献采用的衡量方法不一样,但大多数漆酶保温时间 50~100 min 的 $t_{1/2}$ 在 60~80℃之间^[1],本研究漆酶的最适反应温度在 50℃,并且具有较好的热稳定性,这个特点表明该酶可在较高温度的环境中发挥作用。

本研究中由于所采用的培养基较为特别,毛云芝菌利用桑叶和麸皮固体发酵提取漆酶时,含有许多色素物质,这些色素物质成分复杂,在酶的分离提纯中会污染色谱分离填料,给漆酶的分离纯化带来困难,大孔树脂具有吸附容量大、吸附速度快、易解析、易再生、物理与化学性能高、流体阻力较小等优点^[16],越来越受到重视。作者采用筛选出的大孔树脂 HZ-816 脱色,达到了较佳的脱色效果,酶活损失较小,减轻了粗酶液对色谱柱的污染,且可以除去一些杂蛋白质。而采用传统的活性炭等吸附脱

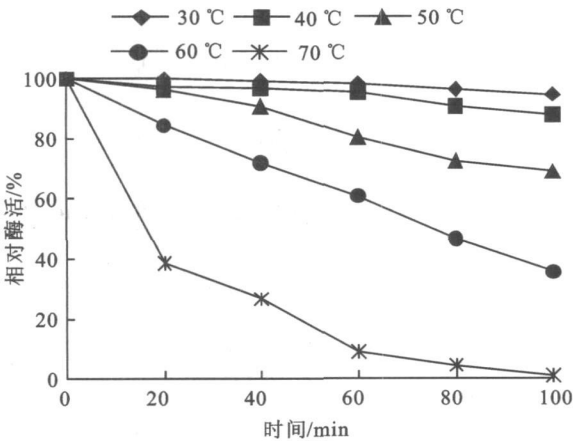


图 8 漆酶热稳定性的动态曲线

Fig. 8 Dynamic curve of temperature stability of laccase

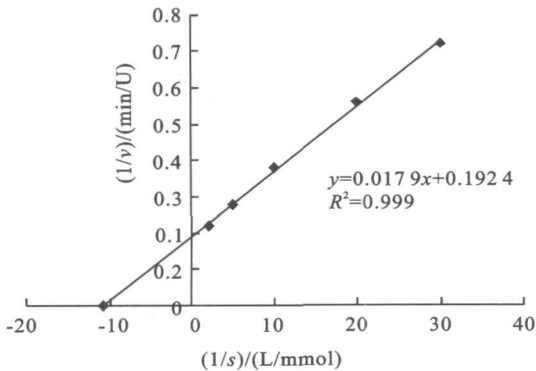


图 9 漆酶以 ABTS 为底物的动力学曲线

Fig. 9 Curve of Lineweaver Burk of laccase using ABTS as substrate

色方法,基本不能去除粗提液中的色素物质,酶活 损失较大。

参考文献(References):

- [1] 杨建明,张小敏,邢增涛,等. 毛木耳漆酶纯化及其部分漆酶特性的研究[J]. 菌物学报, 2005, 24(1): 61– 70.
YANG Jian ming, ZHANG Xiao min, XING Zeng tao et al. Purification and properties of laccase produced by *Auricularia polytricha*[J]. **Mycosystema**, 2005, 24(1): 61– 70. (in Chinese)
- [2] Thurston C F. The structure and function of fungal laccase[J]. **Microbiology**, 1994, 140: 19– 26.
- [3] Alexandre G, Zhulin I B. Laccase are widespread in bacteria[J]. **Trends Biochem Sc**, 2000, 18: 41– 84.
- [4] Couto S R, Torra Herrera J L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi[J]. **Biotechnol Adv**, 2007(7): 1– 12.
- [5] Reinhammar B. Copper Proteins and Copper Enzymes[M]. Boca Raton: CRC Press, 1984.
- [6] 李建武, 袁明秀. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 174– 176.
- [7] 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 Shu zhen, QIAN Shi jun. Purification and properties of laccase from *Basidiomycete*[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2003, 43(1): 73– 78. (in Chinese)
- [8] Bonomo R P, Boudet A M, Cozzolino, et al. A comparative study of two isoforms of laccase secreted by the white rot fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences[J]. **J Inorg Biochem**, 1998, 71: 205– 211.
- [9] 康从宝, 刘巧, 李清心, 等. 白腐菌产漆酶的纯化及部分酶学性质[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(5): 638– 642.
KANG Cong bao, LIU Qiao, LI Qing xin, et al. Purification and properties of laccase produced from a white rot fungus (W-1) [J]. **Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 2002, 18(5): 638– 642. (in Chinese)
- [10] Knutson K, Ragauskas A. Laccase mediator biobleaching applied to a direct yellow dyed paper[J]. **Biotechnol Prog**, 2004, 20: 1893– 1896.
- [11] Camarero S, Ibarra D, Martinez M J, et al. Lignin derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2005, 71: 1775– 1784.
- [12] Rodríguez Couto S, Sanromán M A. Application of solid state fermentation to ligninolytic enzyme production[J]. **Biochem Eng J**, 2005, 22: 211– 219.
- [13] Cantarella G, Galli C, Gentili P. Free radical versus electrontransfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase mediator systems, Catalytic and stoichiometric procedures[J]. **J Mol Catal B Enzym**, 2003, 22: 135– 144.
- [14] Kleen M, Öhrström T, Tamminen T. On the interaction of HBT with pulp lignin during mediated laccase delignification—a study using fractionated pyrolysis GC/MS[J]. **J Anal Appl Pyrolysis**, 2003, 70: 589– 600.
- [15] Fukushima Y, Kirk T K. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin degrading system[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1995, 61: 872– 876.
- [16] 王跃生, 王 洋. 大孔吸附树脂研究进展[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(12): 961– 965.
WANG Yue sheng, WANG Yang. Research advances of macroporous resin[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2006, 31(12): 961– 965. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)