

周永斌,钱磊,李凤美,等. 大球盖菇液体发酵产漆酶条件的优化[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):114-118.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.028

# 大球盖菇液体发酵产漆酶条件的优化

周永斌,钱磊,李凤美,张志军,刘建华

(天津市林业果树研究所,天津 300384)

**摘要:**拟探讨培养条件对大球盖菇液体发酵产漆酶的影响,为大球盖菇漆酶的应用提供理论依据和技术指导。以 ABTS[2,2-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)]为底物,用分光光度法测定漆酶活性。采用单因素试验研究培养条件对漆酶活性的影响,采用正交试验对各影响因素进行优化。结果表明,大球盖菇液体发酵产漆酶的培养基最佳配方为 25 g/L 可溶性淀粉、2.5 g/L 蛋白胨、1.5 g/L  $\text{MgSO}_4$ ,其中可溶性淀粉和蛋白胨用量为显著影响因素。最佳发酵条件为 pH 值 5.5、250 mL 三角瓶装液量 60 mL、接种量 5%、温度 28 ℃、转速 140 r/min。在最佳发酵条件下,发酵培养 7 d 后酶活性可达 18.103 U/mL。由结果可知,大球盖菇在发酵条件优化后具有较高的产漆酶能力。

**关键词:**大球盖菇;漆酶;培养基;培养条件;优化

**中图分类号:** S188+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0114-05

漆酶(laccase, EC 1.10.3.2)是一类含铜的多酚氧化酶,属于蓝色多铜氧化酶家族<sup>[1]</sup>。该酶具有特殊的催化性能和广泛的作用底物,能够降解酚类、芳胺类、羧酸、金属有机化合物等底物,生成醌类化合物、羰基化合物和水<sup>[2]</sup>,在生物制浆<sup>[3-4]</sup>、生物漂白<sup>[5-6]</sup>、降解毒素<sup>[7-8]</sup>、食用菌栽培<sup>[9-10]</sup>、食品加工<sup>[11-12]</sup>等方面具有广泛的研究价值和应用潜力,目前已成为食品科学、生物学、化学、环境科学等领域的研究热点。

漆酶已被证实广泛地分布于多种植物和真菌中,在少数细菌及昆虫体内也发现有漆酶<sup>[13-14]</sup>。分泌漆酶的真菌主要集中于担子菌、子囊菌及半知菌等高等真菌。近年来,来源于食用菌的漆酶倍受关注,已有几十种漆酶从不同食用菌中被分离纯化出来,如灰树花<sup>[15-16]</sup>、黑木耳<sup>[17-18]</sup>、白灵菇<sup>[19-20]</sup>、

云芝<sup>[21-22]</sup>、平菇<sup>[23-24]</sup>等。

大球盖菇(*Stropharia rugosoannulata*)别称皱环球盖菇、皱球盖菇、酒红色球盖菇,属于担子菌门层菌纲伞菌目球盖菇科球盖菇属<sup>[25]</sup>。大球盖菇含有对人体健康有益的蛋白质、糖类、矿物质、维生素等物质,氨基酸种类达 17 种,人体必需氨基酸齐全,作为一种无污染的安全食品,不仅是国际菇类交易市场的十大菇类之一,也是联合国粮食及农业组织向发展中国家推荐栽培的珍稀食用菌之一<sup>[25]</sup>。

大球盖菇由于菌种引进较晚,国内的研究也较少,已有研究主要集中在其生物学特性及人工栽培方面,对于其重要生理活性物质的液体培养条件的研究较少。王红等研究发现,大球盖菇在液体培养条件下漆酶生产的最适 pH 值为 3.8<sup>[26-27]</sup>;许峰等以胞外多糖含量为指标,对大球盖菇产胞外多糖液体培养基组成和发酵条件进行了优化<sup>[28]</sup>;庞振凌等研究了大球盖菇多糖发酵过程中碳源、氮源、pH 值对多糖积累的影响<sup>[29]</sup>。本研究对大球盖菇漆酶的液体发酵条件进行了初步探索,旨在为其进一步研究和开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 大球盖菇 Sr-01 菌株,由天津市林业果树研

收稿日期:2017-08-15

基金项目:天津市农业科学院院长基金(编号:16009);天津市林业果树研究所所长基金(编号:SZJJ2016005);天津市科技计划(编号:16ZXZYN00170)。

作者简介:周永斌(1979—),男,山西晋中人,硕士,副研究员,主要从事食用菌栽培与加工研究。Tel:(022)27945287;E-mail:tjzhoub@126.com。

通信作者:钱磊,博士,助理研究员,主要从事食用菌生物化学与分子生物学研究。Tel:(022)27945287;E-mail:qianl1982@sina.cn。

[10] Sun L, Yuan B, Zhang M, et al. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of SINCED1 increases both lycopene and  $\beta$ -carotene contents in tomato fruit[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(8):3097-3108.

[11] Sun L, Sun Y F, Zhang M, et al. Suppression of 9-cis-epoxycartenoid dioxygenase, which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis, alters fruit texture in transgenic tomato[J]. Plant Physiology, 2012, 158(1):283-298.

[12] Ahrazem o, Rubio-Moraga A, Trapero A, et al. Developmental and stress regulation of gene expression for a 9-cis-epoxycartenoid dioxygenase, *CstNCED*, isolated from *Crocus sativus* stigmas[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(2):681-694.

[13] Bang S W, Park S H, Jeong J S, et al. Characterization of the stress-inducible *OsNCED3* promoter in different transgenic rice organs and over three homozygous generations[J]. Planta, 2014, 240(3):665.

[14] Silva N C Q, de Souza G A, Pimenta T M, et al. Salt stress inhibits germination of *Stylosanthes humilis* seeds through abscisic acid accumulation and associated changes in ethylene production[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 130:339-407.

[15] Zaharah S S, Singh Z, Symons G M, et al. Mode of action of abscisic acid in triggering ethylene biosynthesis and softening during ripening in mango fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2013, 75:37-44.

究所食用菌研究室保藏。

1.1.2 培养基 固体培养基配方:200 g/L 马铃薯、20 g/L 葡萄糖、15 g/L 琼脂、pH 值自然。液体培养基配方:20 g/L 葡萄糖、3 g/L 蛋白胨、1 g/L  $\text{MgSO}_4$ 、2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 值为 5.0。

1.1.3 试剂 ABTS[2,2-连氮基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸),美国 Sigma 公司生产];其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 仪器与设备 电子天平(BS224S 型,北京赛多利斯仪器有限公司生产);酸度计(PHS-3C 型,上海精密科学仪器有限公司生产);卧式恒温摇床(HNY-211C 型,天津欧诺仪器股份有限公司生产);紫外-可见分光光度计(TU-1810 型,北京普析通用仪器有限责任公司生产);高速冷冻离心机(GL-20C 型,上海安亭科学仪器厂生产);电热恒温水浴锅(DK-320S 型,上海精宏实验设备有限公司生产);恒温培养箱(GHP-9270 型,上海一恒科技有限公司生产)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 培养方法 菌株活化:将供试菌株从试管保藏斜面上转接种于固体平板上,置于恒温培养箱中,于 28 ℃ 培养至菌丝长满平板。

种子培养:取活化好的菌株,用打孔器切取直径为 1 cm 的菌饼,取 3 片,接入装有 50 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,置于恒温摇床中,于 28 ℃、150 r/min 振荡培养 5 d<sup>[30-31]</sup>。

发酵培养:将种子液按 5% 接种量接入装有 50 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,置于恒温摇床中,于 28 ℃、150 r/min 条件下培养 10 d。发酵液经纱布过滤,于 4 ℃ 条件下 10 000 r/min 离心 20 min,取上清,即为粗酶液。

1.2.2 酶活性的测定 采用 ABTS 法测定酶活性<sup>[2,32]</sup>。2 mL 反应体系含 1.9 mL 0.5 mmol/L ABTS 溶液(pH 值为 5.0,用 0.1 mmol/L HAc-NaAc 缓冲液配制)、0.1 mL 粗酶液,以去离子水作为空白对照,于 30 ℃ 反应 5 min,在 420 nm 处测定吸光度。1 个酶活性单位(U)定义为 1 min 内氧化 1  $\mu\text{mol/L}$  底物 ABTS 所需的酶量。

1.2.3 培养基优化试验 碳源筛选试验:分别以 20 g/L 果糖、可溶性淀粉、麦芽糖、葡萄糖、乳糖、玉米淀粉、蔗糖为碳源,以 3 g/L 蛋白胨为氮源,按照“1.2.1”节中的方法培养 7 d,研究不同碳源对漆酶活性的影响。

氮源筛选试验:分别以 3 g/L 豆饼粉、蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、氯化铵、硝酸铵、硝酸钠为氮源,以 25 g/L 可溶性淀粉为碳源,按照“1.2.1”节中的方法培养 7 d,研究不同氮源对漆酶活性的影响。

无机盐筛选试验:以 25 g/L 可溶性淀粉为碳源,以 2.5 g/L 蛋白胨为氮源,分别以 1 g/L  $\text{NaCl}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{ZnCl}_2$  为无机盐,按照“1.2.1”节中的方法培养 7 d,研究不同无机盐对漆酶活性的影响。

1.2.4 正交试验 根据培养基优化试验结果,选择可溶性淀粉、蛋白胨、 $\text{MgSO}_4$  为影响因素,以漆酶活性为评价指标,采用无交互作用的  $L_9(4^3)$  正交试验设计,研究各因素对漆酶活性的影响,每组试验重复 3 次,结果取平均值。试验因素及水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平

水平	因素		
	A:可溶性淀粉浓度 (g/L)	B:蛋白胨浓度 (g/L)	C: $\text{MgSO}_4$ 浓度 (g/L)
1	20	2.0	1.0
2	25	2.5	1.5
3	30	3.0	2.0

1.2.5 培养条件优化试验 (1)pH 值的影响:将优化后的液体培养基 pH 值分别调至 2.0~8.0,按照“1.2.1”节的培养方法,在接种量为 5%、250 mL 三角瓶装液量为 50 mL 的条件下,于 28 ℃、150 r/min 培养 7 d,研究不同 pH 值对漆酶活性的影响。(2)装液量的影响:在 250 mL 三角瓶中分别装入 20~100 mL 优化后的液体培养基,按照“1.2.1”节的培养方法,在 pH 值为 5.5、接种量为 5% 的条件下,于 28 ℃、150 r/min 培养 7 d,研究不同装液量对漆酶活性的影响。(3)接种量的影响:按照“1.2.1”节的培养方法,在 pH 值为 5.5、250 mL 三角瓶装液量为 60 mL 的条件下,分别以 2%~10% 的接种量接种,于 28 ℃、150 r/min 培养 7 d,研究不同接种量对漆酶活性的影响。(4)温度的影响:按照“1.2.1”节的培养方法,在 pH 值为 5.5、250 mL 三角瓶装液量为 60 mL、接种量为 5% 的条件下,分别在 20~40 ℃、150 r/min 条件下培养 7 d,研究不同温度对漆酶活性的影响。(5)转速的影响:按照“1.2.1”节培养方法,在 pH 值为 5.5、250 mL 三角瓶装液量为 60 mL、接种量为 5% 的条件下,分别在 80~200 r/min 转速条件下,于 28 ℃ 培养 7 d,研究不同转速对漆酶活性的影响。

1.2.6 数据处理 所有试验均设 3 个重复,试验数据以“平均值 $\pm$ 标准偏差”表示,采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 大球盖菇产酶曲线

由图 1 可知,随着培养时间的延长,大球盖菇漆酶活性表现为先升高后降低的趋势。酶活性在 1~4 d 增长缓慢,4~7 d 呈线性增长趋势,7 d 时达到最大值,为 6.721 U/mL,之后逐渐降低。因此,确定大球盖菇产漆酶的最适发酵时间为 7 d。

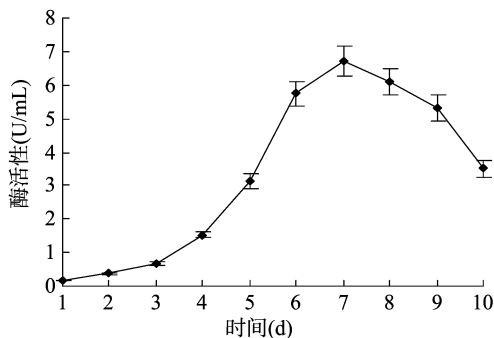


图 1 大球盖菇产漆酶曲线

### 2.2 培养基成分对产酶的影响

2.2.1 碳源的影响 以 3 g/L 蛋白胨为氮源,研究不同碳源对产酶的影响。由图 2 可知,菌丝体对于不同碳源(单糖、双糖、多糖等)均可利用,其中多糖类碳源(可溶性淀粉、玉米淀粉)对产酶有明显促进作用。以可溶性淀粉作为碳源时,菌

丝体产漆酶活性最高,当可溶性淀粉浓度为 25 g/L 时,酶活性可达 11.573 U/mL(图 3)。因此,选择可溶性淀粉作为最适碳源。

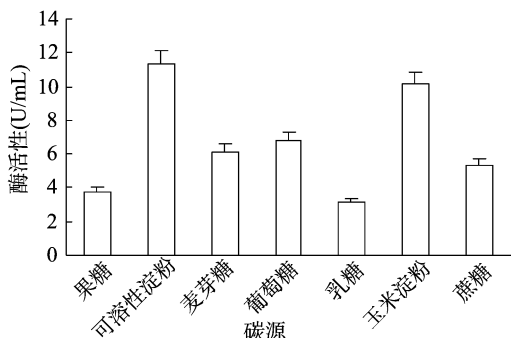


图2 碳源对产酶的影响

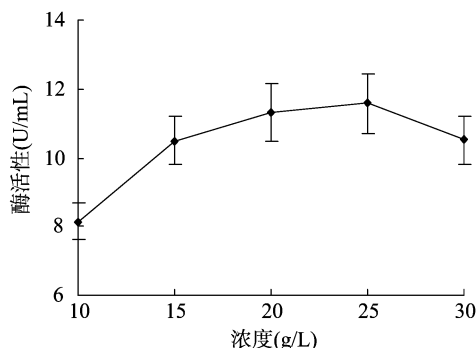


图3 可溶性淀粉浓度对产酶的影响

2.2.2 氮源的影响 以 25 g/L 可溶性淀粉作为碳源,研究不同氮源对产酶的影响。由图 4 可知,菌丝体对有机氮源(豆饼粉、蛋白胨、酵母膏、牛肉膏)的利用明显优于无机氮源。以蛋白胨作为氮源时,菌丝体产漆酶活性最高(图 4),当蛋白胨浓度为 2.5 g/L 时,酶活性可达 11.731 U/mL(图 5)。因此,选择蛋白胨作为最适氮源。

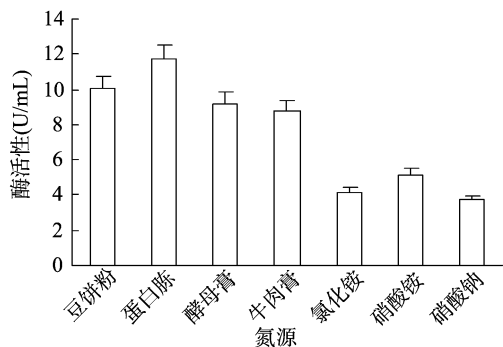


图4 氮源对产酶的影响

2.2.3 无机盐的影响 以 25 g/L 可溶性淀粉作为碳源、2.5 g/L 蛋白胨作为氮源,研究不同无机盐对产酶的影响。由图 6 可知,与对照相比, $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  对产酶有促进作用,而  $Na^{+}$ 、 $K^{+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  对产酶有抑制作用,其中  $Mg^{2+}$  对酶活性的影响最明显,表明  $Mg^{2+}$  对菌丝体生长过程中漆酶的分泌起关键作用,当其浓度为 1.5 g/L 时,酶活性达到最大值,为 14.529 U/mL(图 7)。

### 2.3 正交试验研究漆酶活性影响因素

利用无交互作用的  $L_9(4^3)$  正交试验设计,研究可溶性淀

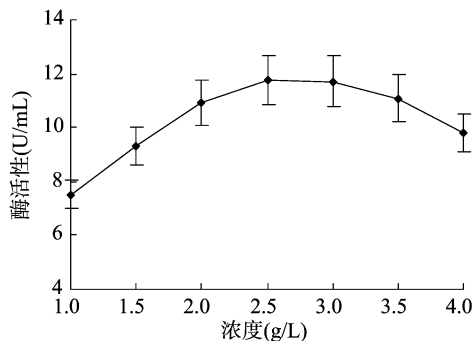


图5 蛋白胨浓度对产酶的影响

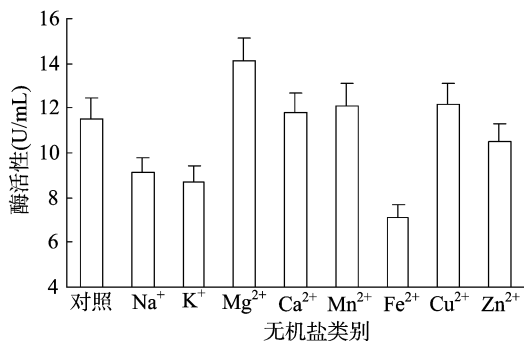


图6 无机盐对产酶的影响

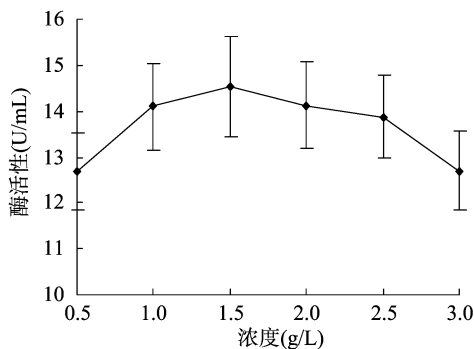


图7 硫酸镁浓度对产酶的影响

粉、蛋白胨、 $MgSO_4$  3 个因素对漆酶活性的影响。从直观分析结果可知,培养基最佳工艺组合为  $A_2B_2C_2$ ,即可溶性淀粉浓度为 25 g/L、蛋白胨浓度为 2.5 g/L、 $MgSO_4$  浓度为 1.5 g/L(表 2)。从方差分析结果可知,影响酶活性的各因素显著性排序为可溶性淀粉 > 蛋白胨 >  $MgSO_4$ ,其中可溶性淀粉和蛋白胨均有显著影响(表 3)。

通过正交试验,确定培养基的最优配方为  $A_2B_2C_2$ ,但在正交设计表中并没有该组合的试验,为此补充试验,在此条件下,酶活性可达 16.103 U/mL。综合以上试验结果,确定培养基的最佳配方为 25 g/L 可溶性淀粉、2.5 g/L 蛋白胨、1.5 g/L  $MgSO_4$ 。

### 2.4 培养条件对产酶的影响

2.4.1 pH 值的影响 由图 8 可知,pH 值对大球盖菇漆酶活性的影响较大,pH 值为 5.5 时酶活性最大,可达 16.329 U/mL,在 pH 值为 4.5 ~ 6.0 范围内漆酶表现出较高活性,相对酶活性保持在 85% 以上,过酸或过碱均会使酶活性降低。因此可见,大球盖菇产漆酶的最适 pH 值为 5.5。

2.4.2 装液量的影响 由图 9 可知,当装液量为 60 mL 时,

表 2 正交试验结果与分析

试验号	因素				酶活性 (U/mL)
	A	B	C	空白	
1	1	1	1	1	14.868
2	1	2	2	2	15.311
3	1	3	3	3	14.705
4	2	1	2	3	15.603
5	2	2	3	1	15.808
6	2	3	1	2	15.501
7	3	1	3	2	15.103
8	3	2	1	3	15.462
9	3	3	2	1	15.328
$k_1$	14.961	15.191	15.277	15.335	
$k_2$	15.637	15.527	15.414	15.305	
$k_3$	15.298	15.178	15.205	15.257	
$R$	0.676	0.349	0.209	0.078	

表 3 正交试验方差分析

因素	偏差平方和	自由度	$F$ 值	$F$ 临界值	显著性
A	0.685	2	76.111	19.000	*
B	0.235	2	26.111	19.000	*
C	0.067	2	7.444	19.000	
误差	0.001	2			

注: \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

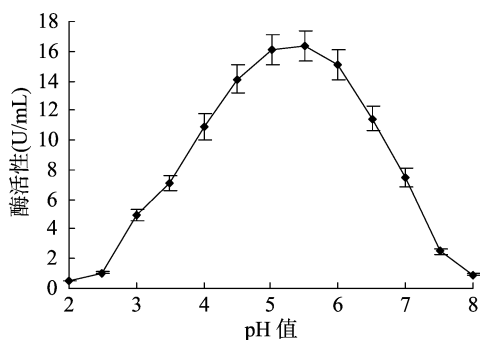


图8 pH 值对产酶的影响

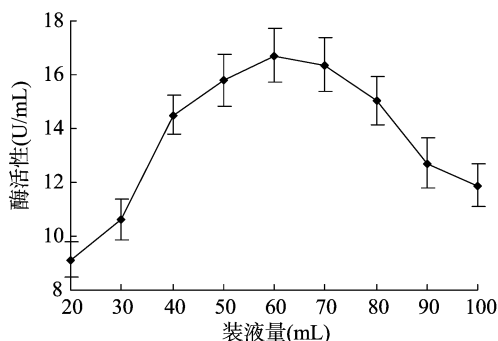


图9 装液量对产酶的影响

酶活性最高,可达到 16.709 U/mL。装液量过多或过少均会使酶活性降低,这可能是因为装液量过少,营养不充分,不利于菌丝体正常生长,使酶活性较低;而装液量过多时,氧气不能满足菌丝体生长需要,使菌丝体生长受到抑制,导致酶活性下降。因此,大球盖菇产漆酶的装液量以 60 mL 为宜。

2.4.3 接种量的影响 由图 10 可知,当接种量为 5% 时,酶活性最高,可达 17.175 U/mL。而接种量过多或过少均会使

酶活性降低,这可能是因为接种量过少时,菌丝体生长缓慢,产漆酶能力较差;接种量过多时,培养液黏度增加,容易造成溶氧量不足,菌丝体营养不足,导致酶活性下降。因此可见,大球盖菇产漆酶的接种量以 5% 为宜。

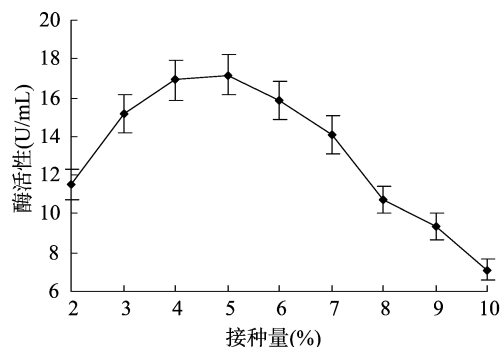


图10 接种量对产酶的影响

2.4.4 温度的影响 由图 11 可知,当温度为 28 ℃ 时,酶活性最高,可达 17.309 U/mL。温度过高或过低均会降低酶活性,温度较低时,菌丝体生长较慢,使酶活性较低;温度较高时,菌丝体过早老化而停止生长,使产酶能力下降。由此可见,大球盖菇产漆酶的最适温度为 28 ℃。

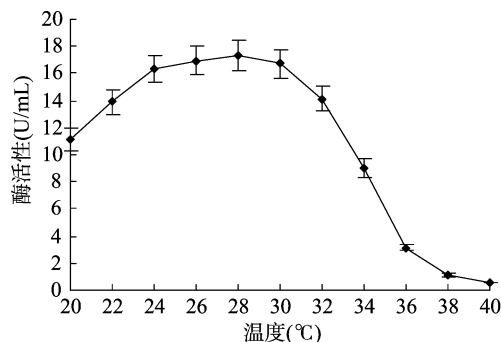


图11 温度对产酶的影响

2.4.5 转速的影响 由图 12 可知,当转速为 140 r/min 时,酶活性最高,可达 17.509 U/mL。转速太快或太慢均会降低酶活性,这可能是因为转速过低时,供氧量不足,菌丝体生长缓慢,使得酶活性较低;转速过高时,不利于耗氧,从而影响菌丝体生长,导致酶活性下降。

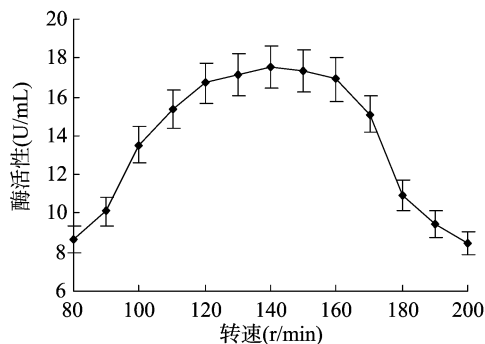


图12 转速对产酶的影响

## 2.5 优化培养后的酶活性

采用优化后的液体培养基,在最佳发酵条件下对大球盖菇进行摇瓶发酵培养,结果显示,粗酶液的最终酶活性可达 18.103 U/mL,高于单一因素最佳条件下的发酵培养。

### 3 结论

通过培养基优化试验确定了大球盖菇液体发酵产漆酶培养基的最适氮源、碳源、无机盐分别为可溶性淀粉、蛋白胨、 $\text{MgSO}_4$ 。在此基础上,经正交试验优化获得了摇瓶发酵培养基的最佳配方为 25 g/L 可溶性淀粉、2.5 g/L 蛋白胨、1.5 g/L  $\text{MgSO}_4$ 。发酵条件优化试验确定了大球盖菇产漆酶的最佳发酵条件为 pH 值 5.5,250 mL 三角瓶装液量 60 mL,接种量 5%,培养温度 28 ℃,转速 140 r/min,在此条件下,培养 7 d 后漆酶活性可达 18.103 U/mL。

### 参考文献:

- [1] 刘家扬,焦国宝,有小娟,等. 真菌漆酶的性质、生产及应用研究进展[J]. 生物技术通报,2016,32(4):24-33.
- [2] 翁彩红,冯宏昌,赖春芬,等. 松杉灵芝漆酶的分离纯化及酶学性质研究[J]. 药物生物技术,2017,24(1):21-26.
- [3] Eugenio M E, Santos S M, Carbajo J M, et al. Kraft pulp biobleaching using an extracellular enzymatic fluid produced by *Pycnoporus sanguineus* [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(6): 1866-1870.
- [4] Sharma A, Thakur V V, Shrivastava A, et al. Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: a pilot scale study [J]. Bioresource Technology, 2014, 169(169):96-102.
- [5] Zhu M J, Du F, Zhang G Q, et al. Purification a laccase exhibiting dye decolorizing ability from an edible mushroom *Russula virescens* [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 8(82):33-39.
- [6] Ravikumar G, Kalaiselvi M, Gomathi D, et al. Effect of laccase from *Hypsizygus ulmarius* in decolorization of different dyes[J]. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2013, 3(1):150-152.
- [7] Alberts J F, Gelderblom W C, Botha A, et al. Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135(1):47-52.
- [8] 张初署,孙杰,毕洁,等. 食用菌 SJ-1 漆酶酶学性质及降解黄曲霉毒素 B1 的研究[J]. 核农学报,2017,31(7):1317-1322.
- [9] Montoya S, Orrego C E, Levin L. Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake) [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(4):1533-1541.
- [10] Janusz G, Czurylo A, Magdalena F, et al. Laccase production and metabolic diversity among *Flammulina velutipes* strains [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2015, 31(1):121-133.
- [11] Brinch D S, Pedersen P B. Toxicological studies on *Polyporus pinsitus* laccase expressed by *Aspergillus oryzae* intended for use in food [J]. Food Additives and Contaminants, 2002, 19(4):323-334.
- [12] Lettera V, Pezzella C, Cicatiello P, et al. Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification [J]. Food Chemistry, 2016, 196(196):1272-1278.
- [13] Sidjanski S, Mathews G V, Vanderberg J P. Electrophoretic separation and identification of phenoloxidases in hemolymph and midgut of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes [J]. The Journal of Parasitology, 1997, 83(4):686-691.
- [14] Alexandre G, Zhulin I B. Laccases are widespread in bacteria [J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18(2):41-42.
- [15] 赵晓燕,邢增涛,邵毅,等. 灰树花漆酶酶学性质的初步研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(6):824-827.
- [16] 佟硕秋,王宝琴,刘凤玉,等. 灰树花漆酶的酶学性质及其脱色作用研究 [J]. 山东化工, 2015, 44(6):34-38.
- [17] 肖楚,刘佳,许修宏. 黑木耳漆酶酶学性质的研究 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(25):158-161.
- [18] 韩增华,刘佳宁,党阿丽,等. 黑木耳漆酶纯化及部分漆酶特性的研究 [J]. 菌物研究, 2012, 10(4):234-239.
- [19] Tian G T, Zhang G Q, Wang H X, et al. Purification and characterization of a novel laccase from the mushroom *Pleurotus nebrodensis* [J]. Acta Biochimica Polonica, 2012, 59(3):407-412.
- [20] 杨娟,邹亚杰,张瑞颖,等. 白灵侧耳漆酶分离纯化及其酶学性质研究 [J]. 菌物学报, 2015, 34(3):456-464.
- [21] Zhang H B, Zhang Y L, Huang F, et al. Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta* [J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(6):837-843.
- [22] Si J, Peng F, Cui B. Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens* [J]. Bioresource Technology, 2013, 128(51):49-57.
- [23] Stajić M, Vukojević J, Knežević A, et al. Influence of trace elements on ligninolytic enzyme activity of *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius* [J]. BioResources, 2013, 8(2):3027-3037.
- [24] Puthirasigamany M, Wirges M, Zeiner T. Membrane chromatography for the purification of laccase from the supernatant of *Pleurotus sapidus* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 70(5):180-187.
- [25] 王晓炜. 大球盖菇营养成分分析、多糖提取分离及抗氧化作用研究 [D]. 南京:南京师范大学, 2007.
- [26] 王红,张琪林. 大球盖菇液体培养胞外酶初步测定 [J]. 食用菌, 2003, 25(2):8-9.
- [27] 张琪林,王红. 大球盖菇菌丝几种酶的性质研究 [J]. 江苏农业科学, 2008, 36(5):151-152, 289.
- [28] 许峰,张瞳,许梅,等. 大球盖菇产胞外多糖液体优化培养条件初探 [J]. 微生物学杂志, 2006, 26(2):45-49.
- [29] 庞振凌,田龙. 大球盖菇多糖发酵工艺优化研究 [J]. 江苏农业科学, 2007(1):157-158.
- [30] 赵世光,钱森和,张焱,等. 响应面法优化 *Ganoderma lucidum* 产漆酶种子培养基 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(16):232-236.
- [31] 葛飞,张慧敏,龚倩,等. 杏鲍菇产漆酶培养条件优化及其对菲的降解特性研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(14):221-225.
- [32] Sathishkumar P, Palvannan T. Purification and characterization of *Pleurotus florida* Laccase (L1) involved in the remazol brilliant blue R (RBBR) decoloration [J]. Journal of Environmental Treatment Techniques, 2013, 1(1):24-34.