

D101 树脂固定中性蛋白酶的条件优化 及酶学性质研究

安小鹏,李 广,侯金星,王建刚,宋宇轩,朱广琴,李 玲,曹斌云

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】提高中性蛋白酶的固定化效果,对 D101 树脂固定中性蛋白酶的条件进行优化并对固定化酶的酶学性质进行研究。【方法】以 D101 树脂吸附法固定中性蛋白酶,分别测定不同温度、时间和加酶量条件下固定化酶的固定化效果,并对固定化中性蛋白酶和游离中性蛋白酶的酶学性质进行比较研究。【结果】D101 树脂固定中性蛋白酶的最佳固定条件为:加酶量 150 U/g,温度 40 ℃,固定时间 120 min,此时固定化酶的酶活回收率最高(70%)。固定化中性蛋白酶和游离中性蛋白酶的最适温度分别为 46 和 40 ℃,最适 pH 值分别为 7.4 和 7.2,表观米氏常数 K_m 分别为 0.22 和 0.20 mg/mL,最大酶促反应速度 V_{max} 分别为 0.39 和 0.21 mL/min。【结论】以 D101 树脂固定中性蛋白酶后,固定化中性蛋白酶的活力、酶活回收率以及热稳定性和 pH 稳定性显著提高。

[关键词] 中性蛋白酶;固定化酶;D101 树脂;酪蛋白;游离酶

[中图分类号] Q556⁺.9;Q814.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)10-0161-06

Study on immobilized condition optimization and properties of neutral proteinase with resin D101

AN Xiao-peng, LI Guang, HOU Jin-xing, WANG Jian-gang, SONG Yu-xuan,
ZHU Guang-qin, LI Ling, CAO Bin-yun

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】To improve the immobilization effect of neutral proteinase, the immobilization condition and enzyme properties of neutral proteinase were studied with resin D101. 【Method】The absorption method was used to detect immobilization effect under different temperatures, pH and enzyme concentrations. The K_m , thermal stability and pH stability of immobilized and soluble enzyme were studied. 【Result】The optimized results were achieved with 150 U/g of the amount of neutral proteinase to resin in weight, coupling temperature at 40 ℃ and immobilizing time of 120 min. The maximum yield of immobilized enzyme was 70%. The optimal temperature and optimal pH of immobilized and soluble enzyme were at 46 and 40 ℃, 7.4 and 7.2, respectively. The K_m and V_{max} of immobilized and soluble enzyme were 0.22 mg/mL, 0.39 mL/min and 0.20 mg/mL, 0.21 mL/min, respectively. 【Conclusion】Compared with free enzyme, the enzyme activity, enzyme recovery and stability of the immobilized enzyme were significantly increased.

Key words: neutral proteinase; immobilized enzyme; resin D101; casein; soluble enzyme

* [收稿日期] 2009-02-23

[基金项目] 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2007AA10Z167);国家“十一五”奶业重大科技支撑项目(2006BAD04A11)

[作者简介] 安小鹏(1984—),男,陕西周至人,在读硕士,主要从事动物生殖生理与繁殖技术研究。

E-mail: anxiaopeng840303@163.com

[通信作者] 曹斌云(1955—),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事动物生殖生理与繁殖技术研究。

中性蛋白酶(Neutral proteinase)是一种来源于枯草芽孢杆菌的胞外蛋白酶,其能迅速水解蛋白质生成肽类和部分游离氨基酸,改善蛋白质的品质^[1]。但游离蛋白酶因精制困难、保存期短、不能回收等缺点,使其在工业上的应用受到一定限制。20 世纪 60 年代出现的酶固定化技术,很好地解决了这个问题。酶固定化既能保持酶的催化活性,又能克服游离酶的一些不足;酶固定化还能提高酶分子结构的稳定性,延长酶的使用期和保管期,并具有能与反应底物分开、生产过程能被有效控制等优点,从而提高了酶的利用效率^[2-6]。近年来,许多研究者致力于中性蛋白酶的固定化研究,但由于固定化条件不同,所得固定化酶的稳定性较差,不能在实际生产中广泛应用。本试验对影响 D101 树脂固定化中性蛋白酶的主要因素进行了研究,确定了中性蛋白酶固定化的最佳条件,并对固定化酶的稳定性进行了检测,以期中性蛋白酶的固定与应用提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂 中性蛋白酶(上海蓝季科技发展有限公司,酶活力 130 U/mg),D101 树脂(南开化工厂),10 mg/mL 酪蛋白溶液,0.1 mol/L、pH=7.0 的磷酸盐缓冲液,0.1 mol/L 的 NaOH 溶液,2 mg/mL 的中性蛋白酶液,0.5% 的酚酞溶液,中性甲醛溶液。

1.1.2 主要仪器 SWB-2000 恒温水浴摇床,KQ-250E 超声波清洗器,DHG-g143BSII 电热恒温鼓风干燥箱,LDZX-4 不锈钢立式电热蒸汽压力灭菌器,HS-84 超净工作台,FA2004A 电子天平。

1.2 方 法

1.2.1 D101 树脂的处理 先用蒸馏水将树脂浸泡 24 h,再用体积分数为 70% 的乙醇浸泡搅拌 30 min,蒸馏水洗至中性;用 40 g/L 的 NaOH 溶液浸泡搅拌 30 min,蒸馏水洗至中性;用 0.5 mol/L 的硫酸铵溶液浸泡搅拌 30 min,蒸馏水洗至中性;用体积分数为 4% 的盐酸溶液浸泡搅拌 30 min,蒸馏水洗至中性;用 40 g/L 的 NaOH 溶液浸泡搅拌 30 min,蒸馏水洗至中性,备用^[7]。

1.2.2 中性蛋白酶的固定化 称取 1 g 已处理好的 D101 树脂,加入到 20 mL 2 mg/mL pH 值 7.0 的中性蛋白酶液中,不断地搅拌,待混匀后于 40 ℃ 孵育,固定化 180 min 后抽滤,用缓冲液冲洗 3 次,

于室温自然风干即得颗粒状固定化酶。

1.2.3 中性蛋白酶固定化条件的优化 (1)固定化酶量对中性蛋白酶固定化效果的影响。称取 1 g 处理好的 D101 树脂,分别加入到 50,100,150,200,250 和 300 U pH 值为 7.0 的中性蛋白酶液中,固定化后测定加酶量对固定化酶活力和酶活回收率的影响。

(2)固定化处理时间对中性蛋白酶固定化效果的影响。在 pH 为 7.0、给酶量为 150 U/g 的条件下,分别固定 30,60,90,120,150 和 180 min 后,测定固定化时间对固定化酶活力和酶活回收率的影响。

(3)固定化处理温度对中性蛋白酶固定化效果的影响。在 pH 为 7.0、给酶量为 150 U/g 以及固定化时间为 120 min 的条件下,研究不同温度(20,30,40,50,60 ℃)对固定化酶活力和酶活回收率的影响。

1.2.4 固定化中性蛋白酶和游离中性蛋白酶酶学性质的检测 (1)固定化和游离中性蛋白酶的最适作用温度和热稳定性。分别称取相同酶量的固定化和游离中性蛋白酶,在不同的温度(32,34,36,38,40,42,44,46,48,50,52 ℃)下测定其活力,确定其最适作用温度。分别称取相同酶量的游离和固定化中性蛋白酶,在不同的温度(46,50,54,58,62,66,70 ℃)下测定其活力,确定其热稳定性。

(2)固定化和游离中性蛋白酶的最适 pH 值和 pH 稳定性。分别称取相同酶量的游离和固定化中性蛋白酶,在 40 ℃ 及不同 pH(6.4,6.6,6.8,7.0,7.2,7.4,7.6,7.8,8)下测定其活力,确定其最适作用 pH 值。分别称取相同酶量的游离和固定化中性蛋白酶,在 40 ℃ 及不同 pH(6.2,6.4,6.6,6.8,7.0,7.2,7.4,7.6,7.8,8.0,8.2)下测定其活力,确定其 pH 稳定性。

(3)固定化和游离中性蛋白酶的表现米氏常数和最大酶促反应速度。按 Eadie-Hofstee 法^[8-9]测定固定化和游离中性蛋白酶的表现米氏常数(K_m)和最大酶促反应速度(V_{max})。

1.2.5 中性蛋白酶活力及其酶活回收率的测定 游离中性蛋白酶和固定化中性蛋白酶的活力均用酪蛋白水解率计算,酪蛋白水解率参照文献^[9]的方法测定。游离中性蛋白酶的活力用 0.1 mol/L、pH=7.0 的磷酸盐缓冲液溶解后测定,单位为 U/mL;固定化中性蛋白酶的活力通过测定固定化前酶的活力和固定化后上清液酶的活力,然后计算固定化酶活力,单位为 U/g。分别测定固定化过程中加入游离酶的总活力以及固定化后上清液酶的总活力,然后用下式计算固定化酶的酶活回收率^[5]:

固定化酶酶活回收率/ $\%$ = 固定化酶活力/(加入游离酶的总活力 - 上清液中酶的总活力) $\times 100\%$ 。

1.3 数据处理

应用 SPSS 和 Excel 统计软件对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 固定化酶量对中性蛋白酶固定化效果的影响

由图 1 可见,随着加酶量的增加,固定化酶的酶活回收率一直呈下降趋势,但固定化酶活力则呈先增加后降低的变化趋势。当加酶量为 150 U/g 时,固定化酶活力达到最高,之后随着酶量的增加酶活力开始下降。这可能是由于加酶量在较低水平上增加时,载体结合位点较多,所以固定化酶活力随着加酶量的增加而迅速增大;当加酶量继续增加,由于载

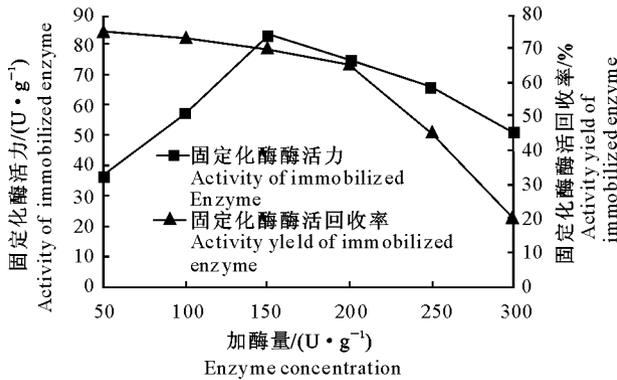


图 1 加酶量对中性蛋白酶固定化效果的影响

Fig. 1 Effect of the enzyme concentration on the immobilization

2.3 固定化处理温度对中性蛋白酶固定化效果的影响

固定化处理温度与固定化酶酶活力及酶活回收率的关系如图 3 所示。

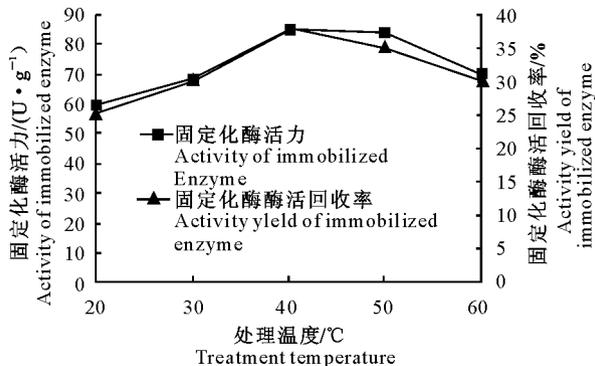


图 3 固定化处理温度对中性蛋白酶固定化效果的影响

Fig. 3 Effect of the treatment temperature on the immobilization

体结合位点趋于饱和,有大量酶蛋白无法与载体结合,同时部分酶分子进入载体孔深处,底物扩散相对较难,使酶分子发挥作用的能力减弱,所以酶活力开始呈降低趋势^[10]。因此,当加酶量为 150 U/g 时,中性蛋白酶固定化酶的酶活回收率和固定化酶活力为最佳组合。

2.2 固定化处理时间对中性蛋白酶固定化效果的影响

由图 2 可知,随着固定化处理时间的增加,固定化酶活力和酶活回收率均逐渐增加,当固定化处理时间为 120 min 时,固定化酶活力和酶活回收率均达到最高,之后随着固定化处理时间的继续增加,酶活力和酶活回收率开始下降。因而,固定化处理时间为 120 min 时,其固定化酶活力和酶活回收率为最佳组合。

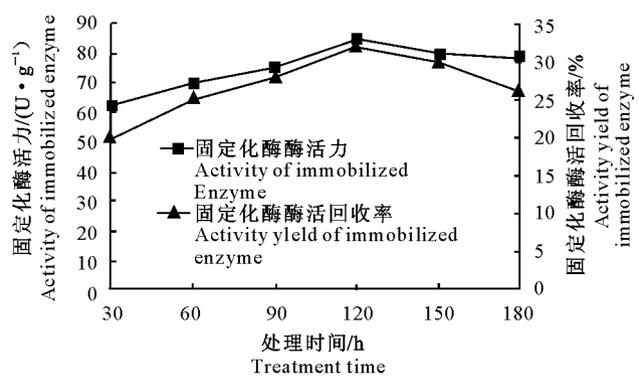


图 2 固定化处理时间对中性蛋白酶固定化效果的影响

Fig. 2 Effect of the treatment time on the immobilization

由图 3 可知,随着固定化处理温度的增加,固定化酶活力和酶活回收率均逐渐增加,当处理温度为 40 °C 时,固定化酶的酶活力和酶活回收率达到最高,之后随着温度的继续增加,固定化酶活力和酶活回收率开始下降。当温度为 40 °C 时,其固定化酶活力和酶活回收率为最佳组合。

2.4 固定化中性蛋白酶和游离中性蛋白酶酶学性质的比较

2.4.1 最适作用温度和热稳定性 由图 4-a 可知,游离中性蛋白酶的最适作用温度为 40 °C,固定化中性蛋白酶的最适作用温度为 46 °C。由图 4-b 可知,在低于 50 °C 条件下对固定化和游离中性蛋白酶进行保温处理,酶活力损失最少;但在高于 58 °C 条件下对固定化和游离中性蛋白酶进行保温处理,酶活力呈现明显下降趋势。固定化中性蛋白酶的热稳定性明显高于游离中性蛋白酶。

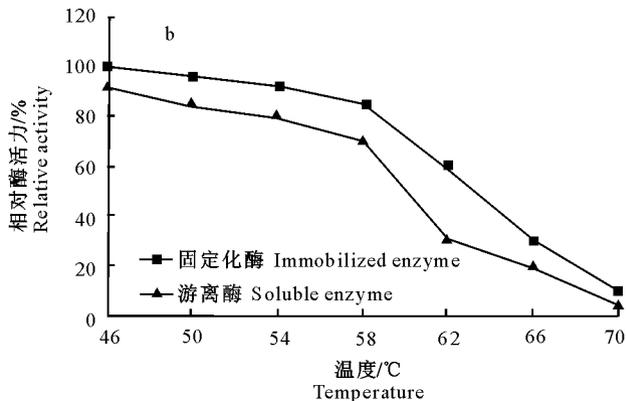
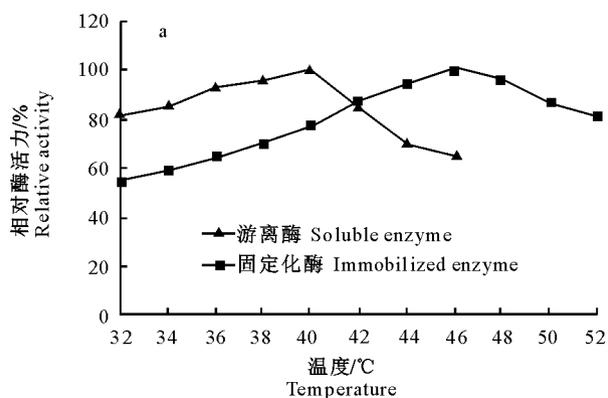


图 4 固定化和游离中性蛋白酶的最适作用温度(a)和热稳定性(b)分析

Fig. 4 Optimal temperature (a) and thermal stability (b) of the immobilized and soluble enzyme

2.4.2 最适 pH 值和 pH 稳定性 由图 5-a 可知, 固定化中性蛋白酶与游离中性蛋白酶的最适 pH 分别为 7.4 和 7.2。由图 5-b 可知, 固定化中性蛋白酶和游离中性蛋白酶在 40 °C 保温 60 min 后, 酸碱稳定性均有所降低, 且酸碱稳定性范围有较大差异, 在

pH 为 6.8~7.6 时, 固定化和游离中性蛋白酶活力下降趋势相近; 在 pH 为 7.8~8.2 时, 游离酶活力下降显著, 固定化中性蛋白酶的酶活力则相对较为稳定。

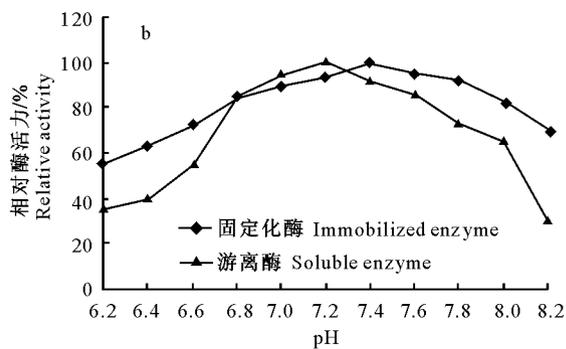
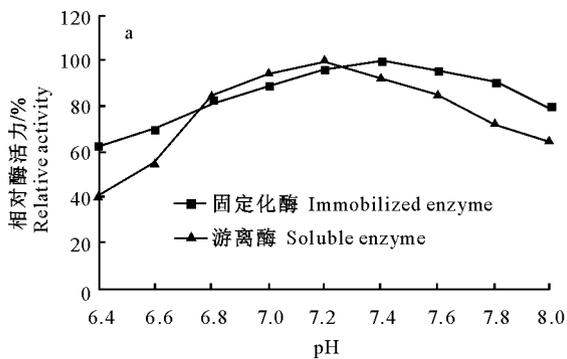


图 5 固定化和游离中性蛋白酶的最适作用 pH(a)和 pH 稳定性(b)分析

Fig. 5 Analysis of optimal pH (a) and pH stability (b) of the immobilized enzyme and soluble enzyme

2.4.3 表现米氏常数和最大酶促反应速度 由图 6 可计算出固定化中性蛋白酶和游离中性蛋白酶的表观常数 K_m 和最大酶促反应速度 V_{max} 分别为 0.22

mg/mL, 0.39 mL/min 和 0.20 mg/mL, 0.21 mL/min。可见固定化中性蛋白酶的表现米氏常数高于游离中性蛋白酶。

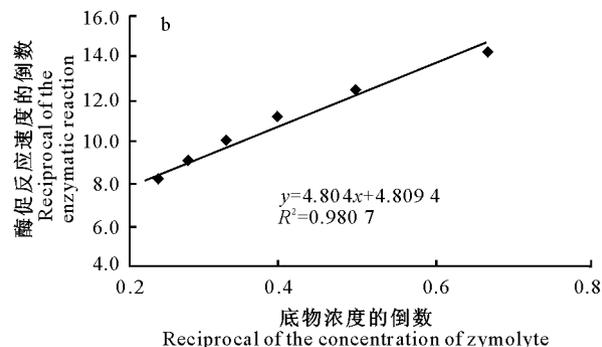
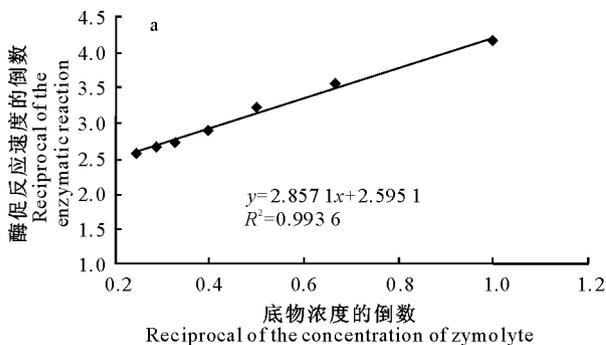


图 6 固定化中性蛋白酶(a)和游离中性蛋白酶(b)表观 K_m 的分析

Fig. 6 Analysis of K_m of immobilized enzyme (a) and soluble enzyme (b)

3 讨论

3.1 固定化条件对中性蛋白酶固定化效果的影响

目前,用于酶固定化的吸附树脂种类较多。吴茜茜等^[6]以 D101 树脂为载体,通过试验得出中性脂肪酶的最佳固定化条件为:给酶量 90 U/g,温度 35 ℃,pH 值 7.6,固定时间 12 h,此时固定化酶的活力约为 54 U/g。本研究以 D101 树脂为载体固定中性蛋白酶,最终确定的优化固定化条件为:加酶量 150 U/g,最佳固定时间和温度分别为 2 h 和 40 ℃,最终得到的固定化酶活力为 83 U/g,酶活回收率达到 70%。本研究结果在固定化酶活力和给酶量方面显著高于吴茜茜等^[6]的研究结果,这可能是由于中性蛋白酶与中性脂肪酶的酶学性质不同所致;而本研究的固定化时间则明显低于吴茜茜等^[6]的研究结果,这主要是因为随着固定化时间的延长,载体与底物的分子链交联程度提高,底物扩散阻力增加,同时已固定化的酶在载体中会由内向外扩散,造成酶泄露导致固定化率和固定化酶活力降低^[5]。张富新等^[5]利用藻酸钠固定化中性蛋白酶,确定最佳的固定时间为 2.5 h,这与本研究的最佳固定化时间较为接近。在优化固定条件时,加酶量、时间和温度直接决定着固定化酶质量的高低。加酶量过低影响固定化酶的活力,加酶量过高则会使大量酶蛋白无法与载体结合而造成浪费;同时给酶量较高时,部分酶分子进入载体孔深处,增加了底物扩散的难度,使酶分子发挥作用的能力减弱^[10]。另外,固定化时间太短会影响树脂的吸附效果,固定化时间过长又会使载体上的酶分子过于密集,从而影响酶分子的活力发挥。蛋白质的吸附是吸热过程,在温度较低时,酶不容易吸附到树脂上;而在温度较高时,则可能引起酶的失活^[10-11]。

3.2 固定化中性蛋白酶与游离中性蛋白酶酶学性质的比较

在本试验中,固定化中性蛋白酶的最适作用温度为 46 ℃,较游离中性蛋白酶高 6 ℃;游离中性蛋白酶活性随温度升高的下降速度大于固定化酶,当温度高于 58 ℃时,游离中性蛋白酶的活性迅速下降;当温度为 42~62 ℃时,固定化酶仍有较高的活力,说明中性蛋白酶经过固定化后热稳定性显著提高。这可能是由于酶分子与载体分子之间相互作用,使固定化酶的空间构象产生“刚性”,受热时固定化酶分子不易伸展打开,载体对酶分子起到保护作用,从而能维持其构象稳定,提高其热稳定性^[12-13]。

中性蛋白酶经固定化处理后,其最适 pH 为 7.4,较游离中性蛋白酶高 0.2;在 pH 为 6.8~7.6 时,固定化中性蛋白酶和游离中性蛋白酶的活力下降趋势相近;在 pH 为 7.8~8.2 时,游离中性蛋白酶活力下降更为显著;而固定化中性蛋白酶在 pH 为 6.8~8.2 时仍具有较高的酶活力,说明中性蛋白酶经过固定化后,pH 稳定性显著提高。其稳定性提高的原因可能是由于酶在固定化以后,酶活性中心氨基酸的带电情况发生了变化,使固定化中性蛋白酶在微环境下能保持一定的缓冲作用,从而影响了酶的活性^[13]。

固定化中性蛋白酶的表观米氏常数 K_m 和最大酶促反应速度 V_{max} 分别为 0.22 mg/mL 和 0.39 mL/min,较游离酶的 K_m 和 V_{max} 分别提高 0.02 mg/mL 和 0.18 mL/min。王海雄等^[14]用大孔吸附树脂固定猪胰脂肪酶,固定化酶的 K_m 和 V_{max} 分别为 14.73 mmol/L 和 1.34 mmol/(h·mg),较游离猪胰脂肪酶的 K_m 和 V_{max} 分别高 13.39 mmol/L 和 0.38 mmol/(h·mg),其原因可能是因为树脂具有多孔性结构,采用树脂固定化后,固定化酶的空间阻力增大,酶与底物的亲和力减弱,从而使其表观米氏常数增大。但同时由于树脂基质是聚苯乙烯,为非极性化合物,从而使非极性底物易富集于其周围而使酶所处微环境的底物浓度增加,因而导致固定化酶的最大反应速度有所上升^[14-15]。

[参考文献]

- [1] 江龙法,范 莽. AS1.398 中性蛋白酶在球形壳聚糖上的固定化研究 [J]. 淮海工学院学报,2000,9(2):48-49.
Jiang L F, Fan M. A study on the method of immobilizing AS1.398 neutral proteinase with globular chitosan [J]. Journal of Huaihai Institute of Technology,2000,9(2):48-49. (in Chinese)
- [2] Macario A, Moliner M, Corma A, et al. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous-organic-inorganic system [J]. Microporous and Mesoporous Materials,2009,118:330-334.
- [3] 罗发兴,杨景峰,罗志刚. 高性能淀粉基酶固定化载体的制备研究 [J]. 食品科学,2008,29(10):174.
Luo F X, Yang J F, Luo Z G. Preparation of high-powered cassava starch-based carrier for immobilization of enzyme [J]. Food Science,2008,29(10):174. (in Chinese)
- [4] 潘晓亚,马 力,周黎黎. 固定化乳糖酶的研究 [J]. 中国乳品工业,2006,34(3):13.
Pan X Y, Ma L, Zhou L L. Study of immobilized lactase [J]. China Dairy Industry,2006,34(3):13. (in Chinese)
- [5] 张富新,张媛媛,党亚丽. 海藻酸钠固定化中性蛋白酶的研究

- [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(11):90-91.
- Zhang F X,Zhang A A,Dang Y L. A study of the neutral proteinase s immobilization in sodium alginate [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2005,33(11):90-91. (in Chinese)
- [6] 吴茜茜,穆文侠,孙健,等. 大孔树脂 D101 固定中性脂肪酶及其生物催化应用 [J]. 食品与发酵工业,2008,34(8):65.
- Wu Q Q, Mu W X, Sun J, et al. Lipase immobilization on macroporous resin D101 and application in bio-synthesis [J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(8):65. (in Chinese)
- [7] 邢晓慧,吕晓玲,白小佳,等. 胰蛋白酶的固定化及其性质研究 [J]. 食品研究与开发,2002,23(1):17.
- Xing X H, Lü X L, Bai X J. Study on the immobilization and properties of trypsin [J]. Food Research and Development, 2002,23(1):17. (in Chinese)
- [8] 晋治涛,陈国华,刘晓云,等. 羧甲基壳聚糖微球固定化 AS1.398 中性蛋白酶的制备和性质研究 [J]. 生物医学工程杂志,2006,23(1):97-101.
- Jin Z T, Chen G H, Liu X Y. Studies on the preparation and characterization of immobilized neutral protease by carboxymethyl chitosan microsphere [J]. J Biomed Eng,2006,23(1):97-101. (in Chinese)
- [9] 俞建琪. 生物化学实验技术 [M]. 北京:化学工业出版社,2002:275.
- Yu J Y. Experimental biotechnology [M]. Beijing:Chemical Industry Press,2002:275. (in Chinese)
- [10] 崔建涛. 树脂固定化木聚糖酶及其酶解动力学研究 [D]. 河北保定:河北农业大学,2007.
- Cui J T. Research on the immobilization of xylanase by ion-exchange resin and its enzymolysis kinetics [D]. Baoding, Hebei: Agricultural University of Hebei,2007. (in Chinese)
- [11] Larissa T S,Nikoly A Z,Arkady A K. Improvement of hydrogenase enzyme activity by water-miscible organic solvents [J]. Enzyme and Microbial Technology,2008,12(4):2-10.
- [12] Santos A M P,Oliveira M G,Maugeri F. Modeling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design [J]. Bioresource Technology,2007,98:3142-3148.
- [13] Zhang Y W,Zhang Y,Wang H,et al. An enzyme immobilization platform for biosensor designs of direct electrochemistry using flower-like ZnO crystals and nano-sized gold particles [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry,2008,12(10):6-12.
- [14] 王海雄,吴侯,翁新楚. 大孔吸附树脂固定猪胰脂肪酶的初步研究 [J]. 生物技术,2003,14(3):28-29.
- Wang H X,Wu H,Weng X C. Study on immobilization of porcine pancreas lipase with macroporous adsorption resin [J]. Biotechnology,2003,14(3):28-29. (in Chinese)
- [15] Kamata Y,Sato A,Saito N,et al. Stability of enzyme activity immobilized on glycosylated egg white beads and some general carrier in a flow system [J]. Food Sci Res,2000,6(1):24-28.

(上接第 160 页)

- [16] Rogalski J,Dawidowicz A, Jozwik E, et al. Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on Controlled Porosity Glass [J]. J Mol Catal B:Enzym,1999,6(1/2):29-39.
- [17] Jiang D S,Long S Y,Huang J,et al. Immobilization of pycnopus sanguineus laccase on magnetic chitosan microspheres [J]. Biochem Eng J,2005,25(1):15-23.
- [18] Xiao H Y,Huang J,Liu C,et al. immobilization of laccase on amine-terminated magnetic nano-composite by glutaraldehyde crosslinking method [J]. Trans. Nonferrous Met Soc China, 2006,16:414-418.
- [19] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术 [M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- Li H R. White-rot fungi biology and biotechnology [M]. Beijing:Chemical Industry Press,2005. (in Chinese)
- [20] 李慧蓉. 白腐真菌在碳素循环中的地位和作用 [J]. 微生物学通报,1996,23(2):105-109.
- Li H R. White-rot fungi in the carbon cycle [J]. Microbiology,1996,23(2):105-109. (in Chinese)
- [21] Kirk T K,Shimada M. Lignin biodegradation: the microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi [C]//Takayoshi Higuchi. Biosynthesis and biodegradation of wood components. Orlando Fla: Academic Press,1985:579-605.
- [22] Reid I D. Biodegradation of lignin [J]. Canadian Journal of Botany/Revue Canadien de Botanique, 1995, 73(1):1011-1018.
- [23] 陈立祥,章怀云. 木质素生物降解及其应用研究进展 [J]. 中南林学院学报,2003,23(1):79-85.
- Chen L X,Zhang H Y. Recent research advances on the lignin biodegradation and application [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2003,23(1):79-85. (in Chinese)
- [24] 张莉. 白腐菌(*T. pubescens* MB89)漆酶酶学性质及其在酚类化合物降解中的特性研究 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2009.
- Zhang L. Characteristics of laccase from white rot fungus (*T. pubescens* MB89) and its use in phenolic compounds degradation [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2009. (in Chinese)