

高活力锰过氧化物酶菌株的选育及其酶学性质初探

白 娜^{1,2}, 顿宝庆², 宋立立^{1,2}, 奚亚军¹, 李桂英², 路 明²

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业科学院 生物质能源研究中心, 北京 100081)

[摘 要] **【目的】**选育锰过氧化物酶(MnP)活力高的诱变菌株,研究其在秸秆木质素降解中的作用。**【方法】**利用合适的紫外诱变剂量处理哈茨木霉 WRF-2 的孢子悬液,通过初筛和复筛,选出 1 株产锰过氧化物酶能力强的突变菌株,并对突变菌株产生的 MnP 酶学性质及突变菌株粗酶液对玉米秸秆中木质素的降解效果进行分析。**【结果】**将哈茨木霉 WRF-2 孢子悬液在紫外光照射 90 s 后稀释 10^{-4} 倍,经初筛和复筛获得了 1 株遗传性状稳定的正突变菌株 0202。与出发菌株 WRF-2 相比,0202 菌株的 MnP 活力提高了 169.59%,木质素过氧化物酶(LiP)活力提高了 17.98%。酶学性质测定结果表明,0202 菌株的 MnP 底物作用的最适温度为 40 ℃,最适 pH 为 3.0,在 pH 2.5~3.5 以及温度 50 ℃ 以下 MnP 活力稳定。 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对 0202 菌株的 MnP 活力有促进作用, Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 则对其有抑制作用。用 0202 发酵后粗酶液处理玉米秸秆 48 h 后,木质素降解率达到了 23.64%。**【结论】**获得了 MnP 活力高的突变菌株 0202,其木质素降解酶系为 LiP-MnP 型,其对玉米秸秆中木质素的降解效果明显提高。

[关键词] 紫外诱变;木质素分解菌;突变菌株;锰过氧化物酶;木质素降解

[中图分类号] Q939.97

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)11-0139-06

Breeding of high-activity manganese peroxidase strain and preliminary investigation the enzymatic characteristics

BAI Na^{1,2}, DUN Bao-qing², SONG Li-li^{1,2}, XI Ya-jun¹, LI Gui-ying², LU Ming²

(1 College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Biomass Energy Research Center, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: **【Objective】**The study was to screen a high-yield manganese peroxidase strain and to study its effects on lignin degradation of straw. **【Method】**A high-yield ideal strain with the method of using suitable dose of UV to the spores suspension was obtained, meanwhile the manganese peroxidase characteristics of the mutant strain was investigated and the effect of lignin degradation of maize straw with the crude enzyme from mutant strain was determined. **【Result】**The spores suspension of initial strain (*Trichoderma harizianum*) were irradiated 90 s by UV treatment, and a positive mutation strain (0202) was obtained after screening. It was determined as a genetic stable high-yield strain. The MnP activity was greatly increased by 169.59% more than its initial strain and the LiP activity was raised by 17.98%. The properties of MnP were researched and the results showed that the optimum temperature and pH of the MnP activity were 40 ℃ and 3.0. Moreover, the enzyme activity was stable within pH range of 2.5—3.5 under 50 ℃. Among different metal ions, the MnP activity was enhanced by Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , whereas it was inhibited by the metal ions Fe^{2+} , Zn^{2+} . The lignin of corn straw was reduced by 23.64% after using its crude enzyme in 48 h. **【Conclusion】**High-yield manganese peroxidase strain 0202 was obtained and its ligninolyt-

* [收稿日期] 2010-03-11

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2007BAD41B02);农业部农村能源建设项目;中国农业科学院作物科学研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项

[作者简介] 白 娜(1982—),女,山西太原人,在读硕士,主要从事生物质能源燃料乙醇研究。E-mail: baina2108@163.com

[通信作者] 路 明(1939—),男,辽宁大洼人,研究员,主要从事农业生态和生物质能源研究。E-mail: luming3911@sina.com

ic enzyme was LiP-MnP. The raised MnP activity can increase lignin degradation rate of maize straw.

Key words: ultraviolet irradiation; lignin-decomposing fungi; mutant strain; manganese peroxidase; lignin degradation

随着全球化石能源危机和气候变化的日益加剧,以木质纤维为原料生产燃料乙醇部分替代化石能源成为解决能源问题最具潜力的方案之一。我国秸秆资源丰富,但是要实现工业化利用还有许多问题需要解决,难点之一是如何利用有效的预处理技术,打破木质素对纤维素的紧密结合,从而提高纤维素的酶解效率以降低生产成本^[1]。现阶段工业上通常采用物理化学方法除去木质素,但由于这种方法存在能耗高、污染大的问题,人们越来越热衷于木质素生物降解的研究^[2]。

自 20 世纪 70 年代白腐真菌被发现可以降解木质素以来^[3],人们对降解酶系(包括过氧化物酶、锰过氧化物酶、漆酶)的酶学特征和催化机理展开了大量研究^[4-7]。其中关于锰过氧化物酶(MnP)对木质素的降解已有很多研究,如 1992 年 Wariishi 等^[8]发现,MnP 能解聚合成的木质素,且其对木质素的降解依赖 Mn(II)的存在;1998 年 Hofrichter 等^[9]发现,MnP 通过脂类过氧化作用,可以降解难降解的芳香族化合物,且其降解作用需要 H_2O_2 的触发。

目前,MnP 的生产主要局限在担子菌中,但担子菌一般生长缓慢,扩大培养较为困难。哈茨木霉 WRF-2(专利号:CN101503659)是木霉属微生物,为中国农业科学院生物能源研究中心开发保存的木质素分解菌。WRF-2 菌株生长繁殖迅速,产酶快,可在短期内形成大量分生孢子,适宜工业化生产^[10]。通过培养条件的优化,目前该菌株能产生较高活力的木质素过氧化物酶(LiP),但其 MnP 活力仍较低。研究哈茨木霉 WRF-2 MnP 对秸秆的降解效果及 LiP 和 MnP 的协同降解机制,提高该菌的 MnP 活力,是将 WRF-2 菌株应用于生产的迫切要求。

紫外诱变是进行常规微生物选育最主要的方法之一。目前工业上已经用这种方法选育出了大量高产菌株,如青霉素产生菌、抗生素产生菌、杀虫真菌孢白僵菌菌株及卵孢白僵菌等^[11-12]。本研究利用紫外诱变的方法处理 WRF-2 菌株孢子,以获得 MnP 活力提高的突变菌株,并对突变菌株 MnP 的酶学性质及对玉米秸秆木质素的降解效果进行了初步分析,以期对哈茨木霉 WRF-2 菌株的工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 哈茨木霉 WRF-2(*Trichoderma harizianum*),中国农业科学院生物能源研究中心分离保存。

1.1.2 玉米秸秆 玉米秸秆取自中国农业科学院作物科学研究所昌平试验基地,风干粉碎过孔径为 0.425 mm 筛子后保存备用。

1.1.3 培养基 基础培养基:20 g 葡萄糖,10 g 酵母粉,10 g 琼脂粉,加自来水定容至 1 L。

PDA 培养基:200 g/L 去皮马铃薯,20 g/L 葡萄糖,10 g/L 蛋白胨,1.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,3 g/L KH_2PO_4 ,20 g/L 琼脂,0.01 g/L 维生素 B_1 。

复筛产酶培养基:0.6 g 淀粉,7.5 g 酵母粉,0.5 g 麦桔粉,4 g KH_2PO_4 ,0.244 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.066 g $CaCl_2$,2 mmol 藜芦醇,2 mg 维生素 B_1 ,40 mL 微量元素溶液,0.15% 吐温-80 定容至 1 L。

1.2 方法

1.2.1 菌种的纯化培养 将出发菌株哈茨木霉 WRF-2 活化后接种到新鲜的 PDA 培养基上,置于 30 °C 生化培养箱中暗培养,待平板上长出孢子后取出备用。

1.2.2 紫外线诱变时间的筛选 取 5 mL 无菌水洗下培养皿内的表面孢子,振荡过滤制成孢子悬液,并用血球板计数器控制孢子密度为 $10^6 \sim 10^7$ mL⁻¹,将孢子悬液置于 30 °C、150 r/min 条件下振荡培养 2 h。取 3 mL 孢子悬液于无菌培养皿中,置于 15 W 紫外灯垂直下方 30 cm 处,照射时间分别为 0,30,60,90,120,150,180,210 s。将经过紫外线照射及未照射的孢子悬液分别稀释 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 倍 4 个梯度,取稀释后的孢子悬液 0.2 mL 涂在固体 PDA 平板上,每个稀释度 3 个重复,30 °C 暗培养,待菌落长出后计数,计算每个平板的致死率 η ,确定适宜的紫外线诱变时间及稀释倍数。 $\eta = (A - B) / A \times 100\%$,其中 A 为 1 mL 对照菌液中的活菌数,B 为 1 mL 处理后菌液中的活菌数。

1.2.3 出发菌株的紫外线诱变 以确定的紫外线诱变时间对出发菌株哈茨木霉 WRF-2 进行诱变,稀释 10^{-4} 倍后取 10 μ L 用涂布器涂布在天青 B 脱

色培养基^[10]上,避光培养后待筛选。

1.2.4 突变菌株的筛选 将优良的突变菌株孢子悬液接种到复筛产酶培养基中,30 ℃、200 r/min 条件下振荡培养 72 h 后,将发酵液在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 20 min,取上清液(即为粗酶液)测定 LiP 和 MnP 活力。以出发菌株哈茨木霉 WRF-2 为参照,根据菌落直径大小,筛选生长快、产酶能力强的优良突变菌株。试验中,LiP 活力采用 Frederick 等^[13]的方法测定;MnP 活力依据 Masaki 等^[14]的方法测定。

1.2.5 突变菌株的遗传稳定性分析 参照 Kieser 等^[15]的方法,将筛选得到的突变菌株在 PDA 平板上连续传代培养 7 次,测定每一代菌株发酵液中 MnP 和 LiP 的活力,观察其遗传稳定性。

1.2.6 突变菌株 MnP 的酶学性质 1)温度对突变菌株 MnP 活力的影响及其热稳定性。取振荡培养 72 h 的发酵液,12 000 r/min 离心 20 min,取上清液作为粗酶液进行酶学性质分析。在不同温度条件下(20~90 ℃,10 ℃为 1 个梯度)测定 MnP 活力,将最高酶活力计为 100%,其他酶活力与最高酶活力的比值即为相对酶活力;在 pH 4.5 条件下,将粗酶液在不同温度下(20~90 ℃,10 ℃为 1 个梯度)保持 1 h,测定相对酶活力,以确定其热稳定性^[16]。

2)pH 对突变菌株 MnP 活力的影响及其 pH 稳定性。于 30 ℃反应条件下,在不同 pH(2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0,5.5,6.0)的琥珀酸缓冲液中加入粗酶液,测定 MnP 活力,将最高酶活力计为 100%,其他酶活力与最高酶活力的比值即为相对酶活力;将粗酶液分别置于不同 pH(2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0,5.5,6.0)琥珀酸缓冲液中,室温条件下保持 24 h 后测定相对酶活力,以确定其 pH 稳定性。

3)金属离子对突变菌株 MnP 活力的影响。以原酶液 MnP 活力为对照(CK),在 MnP 与底物(酚红钠)进行反应时,分别加入终浓度为 5 mmol/L 的 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} ,反应 5 min 后测定 MnP 的活力。

1.2.7 突变菌株 MnP 对玉米秸秆木质素的降解能力测定 将 1 g 未经处理的玉米秸秆粉(经纤维素分析仪测定原秸秆中纤维素含量为 26.15%,半纤维素含量为 33.95%,木质素含量为 7.35%),加入到 50 mL 突变菌株粗酶液中,其中含 0.1 mmol/L H_2O_2 、0.05 mol/L $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$ 、5 mmol/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,在确定 MnP 作用底物的最佳温度和 pH 条件下,分别反应 12,24,36,48,60 h 后取

出,过滤烘干,用范式纤维分析法测定突变菌株和出发菌株哈茨木霉 WRF-2 粗酶液对秸秆中木质素的降解率^[17]。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变孢子悬液稀释度及照射时间的确定

孢子悬液经 4 种不同倍数稀释后观察可知,稀释 10^{-4} 倍后能形成单菌落,其他稀释倍数下菌丝连成片不易计数统计。紫外诱变具有致死和诱变双重效应,通常需要根据微生物的致死率曲线确定最佳的诱变时间。一般认为,当诱变微生物的致死率为 70%~85%时,性状的正突变率较高^[11]。从图 1 可以看出,在 0~180 s,随着紫外线照射时间的延长,出发菌株 WRF-2 的致死率呈上升趋势;之后趋于稳定。当紫外线照射 90 s 时,WRF-2 的致死率达到 83.3%,据此确定出发菌株 WRF-2 较为适宜的紫外线照射时间为 90 s。

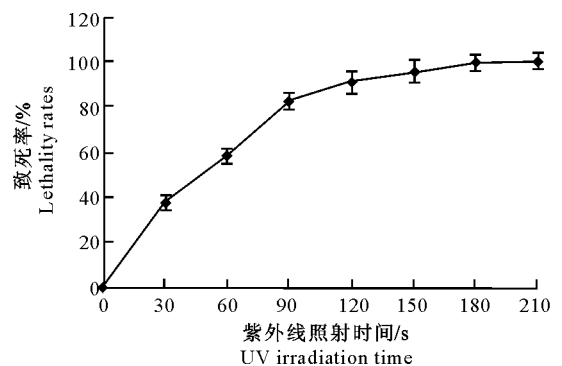


图 1 不同紫外线诱变时间下 WRF-2 的致死率

Fig. 1 Lethality rate of different ultraviolet radiation on WRF-2

2.2 突变菌株的获得

将出发菌株 WRF-2 的孢子悬液在紫外灯下照射 90 s 后稀释 10^{-4} 倍,取 10 μL 用涂布器涂布于天青 B 脱色培养基上,避光培养 60 h 后,根据菌落直径大小,初步得到了 7 株脱色能力较强的突变菌株(表 1)。

将初筛出的 7 株突变菌株孢子液(密度约为 $2.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$)接种到复筛产酶培养基中进行复筛。经方差分析可知,突变菌株 0202、1202、0303 的 LiP 和 MnP 活力均与出发菌株 WRF-2 差异达到极显著水平,其中以 0202 菌株的 LiP 和 MnP 活力最高,其 LiP 活力较出发菌株 WRF-2 提高了 17.98%,MnP 活力提高了 169.59%(表 2)。结合菌株生长势及酶活力,确定 0202 菌株为最优突变菌株。

表 1 突变菌株与出发菌株 WRF-2 菌落直径的比较

Table 1 Comparison of diameter of mutant strains and initial strain

菌株 Strain	菌落直径 Diameter of colony			菌株 Strains	菌落直径 Diameter of colony		
	36 h	48 h	60 h		36 h	48 h	60 h
WRF-2(CK)	2.6	4.0	3.0	0303	2.8	3.8	7.0
0902	2.6	4.0	3.2	0501	2.8	3.6	7.0
0202	3.6	5.4	8.0	0301	2.6	4.0	6.2
1202	3.4	5.2	7.4	0802	3.2	4.8	6.4

表 2 突变菌株与出发菌株 WRF-2 发酵液中 LiP、MnP 活力的比较

Table 2 Comparison of Lip and MnP activity of mutangt stains and initial strain

菌株 Strain	LiP		MnP	
	活力/(U·mL ⁻¹) Activity	较 CK 增加/% Increasing rate	活力/(U·mL ⁻¹) Activity	较 CK 增加/% Increasing rate
WRF-2(CK)	1.503±0.039	—	1.111 1±0.205	—
0902	1.663±0.033**	10.65	1.401 0±0.060*	26.09
0202	1.773±0.013**	17.98	2.955 1±0.193**	169.59
1202	1.650±0.017**	9.77	2.584 5±0.121**	132.61
0303	1.584±0.013**	5.4	2.101 4±0.097**	89.13
0501	1.555±0.007*	3.49	2.343 0±0.205**	110.87
0301	1.666±0.012**	10.82	1.642 2±0.133*	47.83
0802	1.529±0.011*	1.75	2.150 0±0.121**	93.48

注：**，差异极显著 ($P<0.01$)；*，差异显著 ($P<0.05$)。
Note: **，Very significant difference at $P<0.01$ ；*，Significant difference at $P<0.05$ 。

2.3 突变菌株的遗传稳定性

研究表明,诱变后的菌株在传代过程中会出现衰退现象,需要对其进行连续多代的培养,观测生长状况和产酶性能,分析其遗传稳定性^[11]。图 2 显示,0202 菌株在 7 代培养中 LiP 活力稳定,MnP 活力在第 4、5 代时虽出现起伏,但在以后几代又保持稳定,基本维持在 2.9 U/mL 左右。由此可知,突变菌株 0202 具有较好的遗传稳定性。

2.4 突变菌株 MnP 的酶学性质

2.4.1 温度对突变菌株 MnP 活力的影响及其热稳定性 图 3 表明,在 0~40℃,突变菌株 0202 的 MnP 活力随着温度的升高而增加;当温度超过 40℃后,MnP 活力随着温度的增加呈下降趋势;当温度达到 90℃时,MnP 完全失去活力,表明该酶的最适反应温度是 40℃。

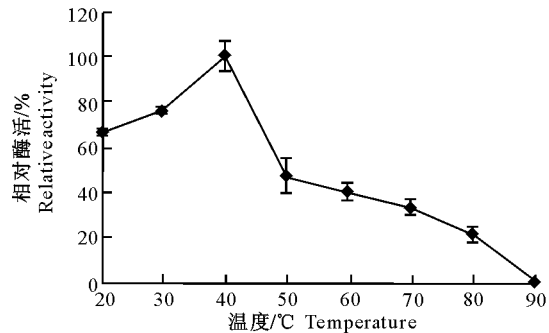


图 3 温度对突变菌株 0202 MnP 活力的影响
Fig. 3 Effects of temperature on MnP activity of mutant strain 0202

从图 4 可以看出,在 20~50℃,MnP 活力较稳定,在 50℃时 MnP 活力达到最高;之后随着温度的升高,MnP 活力下降。表明在 50℃以内,0202 菌株所产生的 MnP 具有较好的热稳定性。

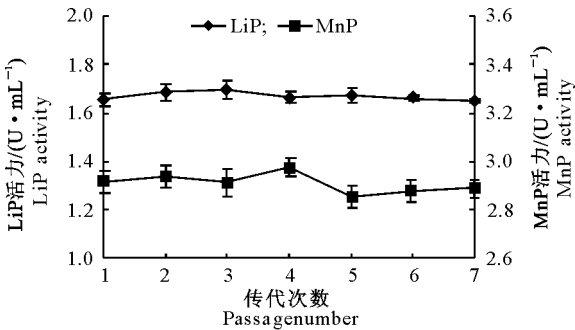


图 2 突变菌株 0202 传代培养的遗传稳定性
Fig. 2 Stability by generations of strain 0202

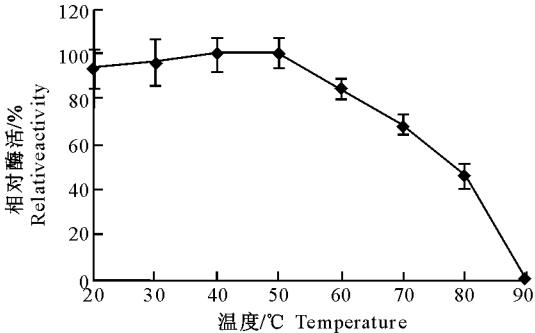


图 4 突变菌株 0202 MnP 的热稳定性
Fig. 4 MnP thermal stability of mutant strain 0202

2.4.2 pH 对突变菌株 MnP 活力的影响及其 pH 稳定性 从图 5 可以看出,当 pH 在 2.0~3.0 时,随着 pH 的升高,MnP 活力逐渐增加,在 pH 3.0 时,0202 菌株 MnP 活力最强;pH 值超过 3.0 后,MnP 活力呈下降趋势;在 pH 为 6.0 时,MnP 活力

趋近于 0,表明在近中性或中性条件下该酶不具有活力。

图 6 表明,MnP 酶活力在 pH 2.5~3.5 时较为稳定,其相对酶活力保持在 95%以上。

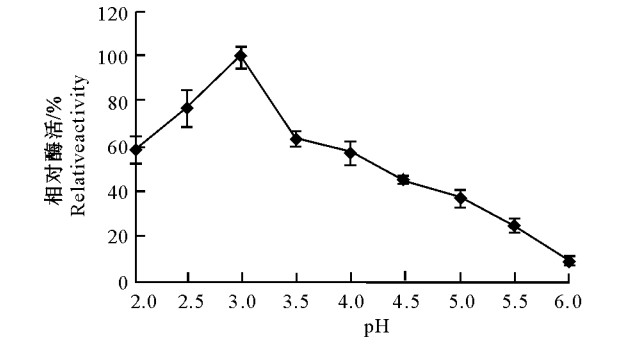


图 5 pH 对突变菌株 0202 MnP 活力的影响
Fig. 5 Effects of pH on MnP activity of mutant strain 0202

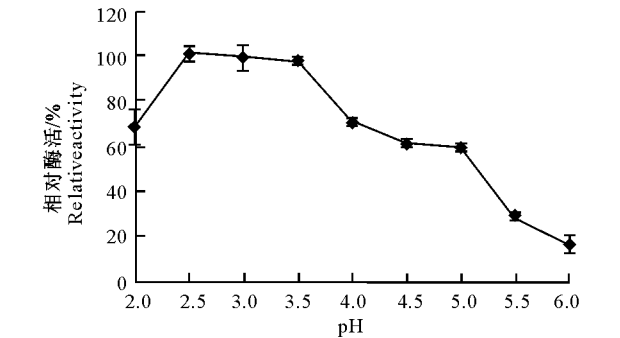


图 6 突变菌株 0202 MnP 的 pH 稳定性
Fig. 6 MnP pH stability of mutant 0202

2.4.3 金属离子对突变菌株 MnP 活力的影响 金属离子对酶的影响是多方面的,离子种类、离子电荷数、离子半径及离子浓度都会对酶活力产生不同程度的影响^[16]。从表 3 可以看出,在有 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 存在的条件下,0202 菌株的 MnP 活力均明显高于对照,表明 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对 MnP 活力具有促进作用;而加入 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 后,MnP 的相对酶活力均下降,说明 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 具有抑制 MnP 活力的作用。

表 3 金属离子种类对突变菌株 0202 MnP 活力的影响			
Table 3 Effect of metal ions on MnP activity of mutant strain 0202			
		%	
金属离子 Metal ion	相对酶活力 Relative MnP activity	金属离子 Metal ions	相对酶活力 Relative MnP activity
CK	100.00	Fe^{2+}	79.60
Cu^{2+}	154.29	Zn^{2+}	68.31
Mn^{2+}	159.68	Ca^{2+}	116.13
Mg^{2+}	125.81		

2.5 突变菌株粗酶液对玉米秸秆木质素的降解作用

突变植株 0202 与出发菌株 WRF-2 对木质素的降解效果见图 7。从图 7 可以看出,对于出发菌株 WRF-2 和突变菌株 0202 而言,酶解时间为 12~48 h,木质素降解率均随酶解时间的延长而增加;在 48 h 时,突变菌株 0202 粗酶液的木质素降解率可达 23.64%,较出发菌株(18.56%)提高了 27.37%;超过 48 h 后,二者粗酶液对木质素的降解率上升趋势不明显。酶解时间为 12~60 h,突变菌株 0202 产生的粗酶液对玉米秸秆中木质素的降解效果优于出发菌株 WRF-2。

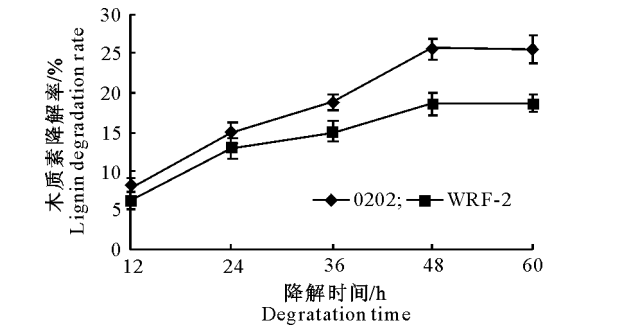


图 7 突变菌株 0202 与出发菌株 WRF-2 对木质素的降解效果
Fig. 7 Lignin degradation effect of mutant strain0202 and initial strainWRF-2

3 讨论

紫外诱变技术以简便、高效、可操作性强等优点,成为工业生产中获得优良突变菌株首选的一种手段。本研究以哈茨木霉 WRF-2 孢子悬液为诱变对象,紫外照射 90 s 后选育出了 1 株较出发菌株生长更迅速、繁殖周期更短、MnP 活力提高 167.57% 的突变菌株 0202。由多代连续培养结果可以看出,突变菌株 0202 的遗传性状稳定,MnP 活力保持在 2.9 U/mL。如果想要获得性能更加优良的突变菌株,需要进一步采用化学或离子注入等复合诱变方法,对 0202 进行处理,以获得更理想的菌株^[18-19]。

不同木质素分解菌有不同的降解酶系,目前对酶系间的协同作用机理尚未研究清楚。其中,研究最多的降解酶系主要为:LiP-MnP,如黄孢原毛平革菌(*P. Chrysosporium*);LiP-MnP-Laccase,如粗毛栓菌(*Trametes gibbosa*);MnP-Laccase,如香菇

(*Lentinus edodes*); LiP-Laccase, 如糙皮侧耳(平菇, *Pleurotus ostreatus*)^[20]。本试验选育出的木质素分解菌 0202 具有较高的 LiP、MnP 活力, 没有测出漆酶活力(结果未给出), 初步确定该菌株的木质素降解酶系为 LiP-MnP 型。为了研究突变菌株 0202 MnP 对木质素的降解效果, 本试验对其 MnP 酶学性质进行了初步分析, 结果表明, MnP 作用底物的最适温度为 40 ℃, 最适 pH 为 3.0, Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对其活力均具有促进作用。在 MnP 作用的最适温度和 pH 下, 添加 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 后, 粗酶液对玉米秸秆中木质素的降解率达 23.64%, 较出发菌株 WFR-2 提高了 27.37%。LiP-MnP 木质素降解体系中, MnP 活力的提高可以促进秸秆木质素的降解, 但由于底物的多样性及酶本身结构、基因编码、调控表达的复杂性, 目前国内外对生物酶法降解木质素的研究尚处于初级阶段。今后的研究方向是探索木质素酶系间的协同作用及构建高效表达载体, 加快木质素生物降解进程, 以实现生物能生产的绿色转化。

4 结 论

本试验通过紫外诱变的方法, 获得了 1 株 MnP 活力高的突变菌株 0202, 其生长快, 产 MnP 能力强, 是一株遗传性稳定的优良菌株。0202 突变菌株产生的粗酶液作用玉米秸秆 48 h 后, 木质素的降解率可达 23.64%。

[参考文献]

- [1] 陈洪章. 纤维素生物技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 1-7.
Chen H Z. Cellulose biological technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 1-7. (in Chinese)
- [2] Mohammad J, Taherzadeh, Keikhosro K. Pretreatment of ligno-cellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review [J]. Int J Mol Sci, 2008, 9: 162-165.
- [3] Kirk T K. Degradation of lignin microbial degradation of organic compounds [M]. America: Marcel Dekker Inc, 1984: 56-73.
- [4] 王仁佑, 曾光明, 郁红艳, 等. 木质素的微生物降解机制 [J]. 微生物学杂志, 2008, 28(3): 59-63.
Wang R Y, Zeng G M, Yu H Y, et al. Lignin degradation mechanism by microbes [J]. Journal of Microbiology, 2008, 28(3): 59-63. (in Chinese)
- [5] Hamid R, Kariminiaae H, Akihiko S. Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus [J]. Dyes and Pigments, 2007, 72(2): 157-162.
- [6] 迟玉杰, 伊洪伟. 木材白腐菌分解木质素的酶系统——锰过氧化物酶、漆酶和木质素过氧化物酶催化分解木质素的机制 [J]. 菌物学报, 2007, 26(1): 153-160.
Chi Y J, Yi H W. Lignin degradation mechanism of ligninolytic enzyme system, manganese peroxidase, laccase and lignin peroxidase produced by wood white rot fungi [J]. Mycosystema, 2007, 26(1): 153-160. (in Chinese)
- [7] 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: 25-71.
Li H R. White rot fungi biology and technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 25-71. (in Chinese)
- [8] Wariishi H, Valli K, Gold M H. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *P. Chrysosporium* [J]. Biol Chem, 1992, 267: 23688-23695.
- [9] Hofrichter M, Scheibner K, Schneega I, et al. Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii* [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 399-404.
- [10] 吴 薇, 顿宝庆, 姜训鹏, 等. 高效木质素降解菌的分离筛选 [J]. 食品科技, 2008, 33(3): 22-25.
Wu W, Dun B Q, Jiang X P. Separation and filtration of high effective lignin-degradation fungi [J]. Food Science and Technology, 2008, 33(3): 22-25. (in Chinese)
- [11] 金志华, 林建平, 梅乐和. 工业微生物遗传育种学原理和应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 79-96.
Jin Z H, Lin J P, Mei L H. Principle and application of industry microorganism genetic breeding [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 79-96. (in Chinese)
- [12] 刘颐屏. 抗生素菌种选育的理论和技巧 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1992: 29.
Liu Y P. Theory and technology of antibiotic bacteria breeding [M]. Beijing: Chinese Medicine Science and Technology Press, 1992: 29. (in Chinese)
- [13] Frederick S, Archibald. A new assay for lignin-type peroxidase employing in the dye Azure-B [M]. Appl and Environ Microbiol, 1992, 58(9): 3110-3116.
- [14] Masaaki K, Jeffrey K, Meredith A, et al. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. FEBS, 1984: 247-250.
- [15] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. Practical streptomyces genetic [M]. England: The John Innes Foundation, 2000: 99-106.
- [16] 张连慧, 杨秀清, 葛克山, 等. 变色栓菌锰过氧化物酶同工酶的纯化及其性质研究 [J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 711-715.
Zhang L H, Yang X Q, Ge K S, et al. Purification and properties of manganese peroxidase from *Trametes versicolor* [J]. Acta Microbiological Sinica, 2005, 45(5): 711-715. (in Chinese)
- [17] 杨 胜. 饲料分析及饲料质量检测技术 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1999: 58-63.
Yang S. Feed analysis and quality detection technology [M]. Beijing: Beijing Agriculture University Press, 1999: 58-63. (in Chinese)