

文章编号:1673-1689(2008)03-0088-06

毛云芝菌产漆酶液体培养条件的优化

范文霞^{1,2}, 蔡友华^{1,2}, 刘学铭^{1*}, 肖更生¹, 张名位¹,
陈卫东¹, 徐玉娟¹, 吴娱明¹

(1. 广东省农业科学院 蚕业与农产品加工研究所, 广东省农产品加工公共实验室, 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: 探索了不同的培养条件下毛云芝菌产漆酶的情况, 发现该菌漆酶属于组成型漆酶, 其酶活力高, 产酶周期短, 酶的合成与菌体生长没有明显相关性; 以漆酶的酶活为指标, 采用正交试验设计方法对毛云芝菌液体培养的摇瓶生长条件进行了优化研究。结果表明: 优化培养基的组成(质量分数)为麸皮 3%, 蛋白胨 0.2%, 牛肉膏 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.3%; TE 6%(体积分数), VB_1 20 mg/L; 自来水, pH 自然。该营养条件下的酶活为 1 668 U/mL, 约是优化前培养基酶活的 16 倍, 为工业化生产提供了一定的理论依据。

关键词: 毛云芝菌; 液体培养; 优化; 酶活

中图分类号: Q 554; Q 93-936; Q814. 9

文献标识码: A

Optimization of Liquid Culture Conditions for Laccase Production by *Coriolus hirsutus*

FAN Wen-xia^{1,2}, CAI You-hua^{1,2}, LIU Xue-ming^{1*}, XIAO Geng-sheng¹,
ZHANG Ming-wei¹, CHEN Wei-dong¹, XU Yu-juan¹, WU Yu-ming¹

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

Abstract: In this manuscript, the liquid culture conditions for laccase production by *Coriolus hirsutus* were investigated. The fungi could constitutively produce laccase with high enzyme activity during short fermentation time. There was no correlation between the laccase production and mycelium growth. The submerged culture condition for laccase production by *Coriolus hirsutus* was optimized by orthogonal test. The result showed that the optimal medium composition was as follows: wheat bran 3%, peptone 0.2%, beef extract 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.3%, TE 6%, VB_1 20 mg/L, tap water, natural pH value. Enzyme activity under the optimal culture conditions was 1668 U/mL which was 16 fold of that of the original medium.

Key words: *Coriolus hirsutus*; submerged culture; optimization; enzyme activity

收稿日期: 2007-07-12.

基金项目: 留学回国人员科研启动基金(教外司留[2007]1108号)

作者简介: 范文霞(1980-), 女, 山东聊城人, 微生物学硕士研究生。

* **通讯作者:** 刘学铭(1967-), 男, 江西兴国人, 医学硕士, 工学博士, 研究员, 主要从事发酵工程研究。

Email: xuemingliu@21cn.com

漆酶是一种多酚氧化酶,在结构和功能上与属铜蓝氧化酶家族中一小族的植物抗坏血酸氧化酶、哺乳动物血浆铜蓝蛋白存在着许多相似之处^[1]。它最早是从漆树的分泌物中发现,随后人们发现一些高等真菌也能分泌这种酶^[1]。现在人们知道,漆酶广泛存在于担子菌、半知菌和子囊菌中,但其中最主要的生产者是担子菌中的白腐菌,也发现几种昆虫、细菌及最近发现黄蜂的毒液均能分泌漆酶^[1]。漆酶是最简单的多铜氧化酶,一般含有4个铜原子,分布于3个高度保守的不同结合位点,每个铜原子在催化机制中都有很重要的作用^[1]。该酶具有广泛的底物专一性,不同漆酶之间的作用范围也不尽相同,涉及的底物主要包括单酚,邻-苯二酚,对-苯二酚,甲氧基酚,抗坏血酸,二胺化合物(如苯二胺、多巴胺)等^[2]。由于漆酶具有氧化与木质素有关的酚类和非酚类化合物以及高度难降解环境污染物的能力^[3],因此它们在生漆的干燥成膜和毛发染色、纸浆生产中木质素的降解、废水处理、生物传感器、酶法免疫分析、有机合成、土壤的修复、食品工业等领域具有广泛的应用前景^[4]。

由于漆酶在工业和生物技术领域具有广泛的用途,因此有关漆酶的生产方面的研究正日益受到人们的关注。国外对漆酶的发酵条件优化、分离纯化、酶学性质,分子生物学以及应用等方面已经进行了广泛而深入的研究,而且国外已经有工业漂白的商品漆酶出售^[5]。但是长期以来,国内的研究工作均围绕提高漆酶的产量而展开,采用的方法是筛选及选育优良的菌种,探索最适宜的培养方式及最佳生理培养条件,以使产漆酶菌株在工业中能得到高效应用。在漆酶的分子生物学方面,尤其是漆酶基因的克隆和异源表达方面,国内尚未见报道^[5]。因此,在漆酶基因的克隆和异源表达方面,仍有许多工作要做^[5]。

据国外文献报道,毛云芝菌是一种具有工业化研究价值的产漆酶菌株,但是目前国内还未见有关于该菌产酶情况的报道。为了更好地对毛云芝菌产漆酶的情况进行了解,对该菌在不同培养条件下的产酶规律进行了研究,并对其产酶发酵培养基进行了优化,提高了其产酶能力。

1 材料与方 法

1.1 菌株及培养方法

毛云芝菌:澳大利亚某研究室赠送,由作者所在实验室保藏。

斜面菌种培养:将保存的菌种接种于斜面培养

基上,28℃恒温培养7~10d,置于4℃冰箱中保存备用。

液体种子培养:用灭菌竹签将每支PDA斜面上的菌丝刮到含有玻璃珠的30mL无菌水中,将其打散,然后用无菌吸管取5mL悬浮液,接入装有100mL种子培养基的250mL的三角瓶中,150r/min,28℃振荡培养96h。

液态发酵培养:将培养好的种子以10%接种量(体积分数)接入到装有50mL发酵培养基的250mL的三角瓶中,28℃,150r/min振荡培养120h(测定产酶曲线的实验除外)。每一培养条件至少进行3个平行试验。

液体静止培养:将培养好的种子以10%接种量接入到装有50mL发酵培养基的250mL的三角瓶中,于28℃恒温培养箱中培养16d。每一培养条件至少进行3个平行试验。

1.2 培养基

斜面种子培养基(质量分数):土豆20%,葡萄糖2%,酵母膏0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, KH_2PO_4 0.3%, VB_1 0.001%,琼脂2%。

液体种子培养基:斜面培养基配方中不加琼脂即得。

基础产酶培养基^[6](质量分数):葡萄糖2%,蛋白胨0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, KH_2PO_4 0.3%, $CaCl_2$ 0.001%, $NaCl$ 0.01%, VB_1 0.001%,pH自然,自来水。

微量元素混合液^[7](g/L):氨基乙酸0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3, $NaCl$ 1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CoSO_4$ 0.1, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01, $KAL(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 0.01, H_3BO_3 0.01, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.01, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.1,用蒸馏水配制。

灭菌方法:121℃高压蒸汽灭菌20min。

1.3 酶液制备

取摇瓶发酵液50mL经真空抽滤后,得到的清液即为粗酶液。

1.4 测定方法

还原糖的测定:DNS法^[8]。

pH测定:用雷磁ZD-2型自动电位滴定仪检测。

菌丝体生物量的测定:以菌丝体细胞干重(DCW)表示,发酵液经真空抽滤后,将菌丝体于60℃条件下干燥至恒重,称重。

漆酶活力测定方法^[9]:3mL反应总体积中,含0.1mL酶液,2.7mL0.1mol/L的醋酸-醋酸钠缓

冲液(pH 4.5),加入0.2 mL 0.5 mmol/L的ABTS(2,2'-连氮-二(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸))以启动反应,25 °C条件下,采用UV-1700型紫外可见分光光度计测定OD_{420nm}下反应前3 min内的吸光值变化。酶的活力单位(U)定义为:在上述条件下(25 °C, pH 4.5),1 mL酶液每分钟催化底物(ABTS)引起吸光值增加0.001为一个酶活力单位。

1.5 实验数据处理

采用软件DPS v3.01专业版进行计算分析。

2 结果与讨论

2.1 毛云芝菌在液体种子培养基中的生长曲线

以液体种子培养基对毛云芝菌进行培养,每日定时取3瓶样品,每瓶装有55 mL发酵液,分析漆酶活力、菌丝体生物量。结果如图1所示。

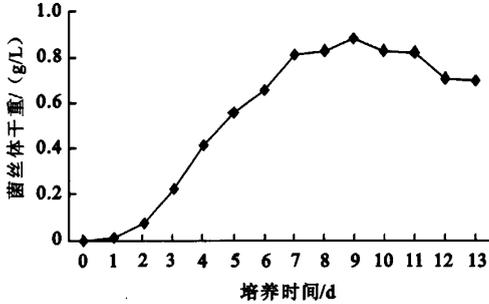


图1 毛云芝菌在液体种子培养基中的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Coriolus hirsutus* in liquid seed culture

可以看出,在该培养体系下,毛云芝菌生长状况很好,培养1 d后菌丝体开始大量繁殖,进入指数生长期,培养到第8天的时候进入稳定期,12 d后菌丝体开始进入衰亡期。因此确定液体菌种培养时间为4 d,此时菌体位于生长旺盛的指数生长期。

2.2 毛云芝菌在不同培养条件下的产酶比较实验

在基础产酶培养基中,考察毛云芝菌在振荡培养与静止培养条件下的产酶情况,实验结果如图2、图3所示。

可以看出,振荡培养条件下的产酶情况与静态培养条件下的产酶情况不同。在振荡培养情况下,毛云芝菌在培养到第4天时,酶活达到最高水平为582 U/mL,随着培养时间的延长其产酶水平迅速降低,培养8 d后酶活降低的趋势逐渐变缓;而在静止培养情况下,毛云芝菌在培养到第4天时达到的酶活最高水平为231 U/mL,且随着培养时间的延长,其酶活逐渐降低。在这两种培养情况下,培养后期酶活的降低可能和该菌在该阶段发酵产生了

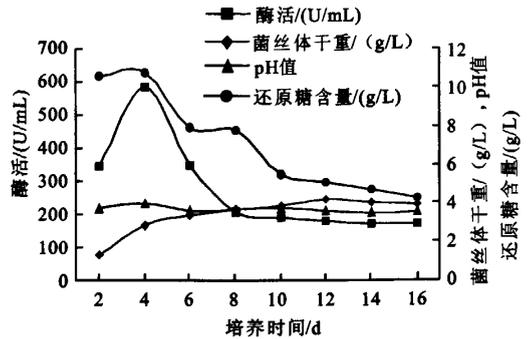


图2 毛云芝菌在振荡培养条件下的产酶历程

Fig.2 Laccase production course of *Coriolus hirsutus* in shaking culture condition

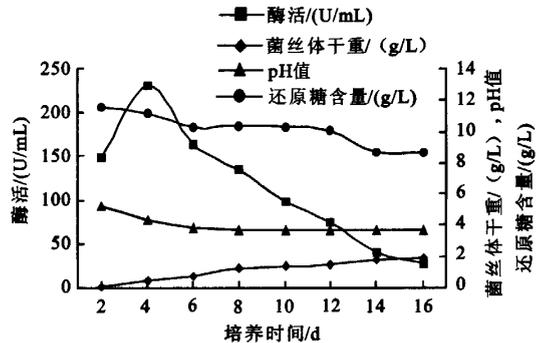


图3 毛云芝菌在静态培养条件下的产酶历程

Fig.3 Laccase production course of *Coriolus hirsutus* in static culture condition

一些可以降解漆酶的蛋白酶或者是产生了一些可以使漆酶失活的物质有关,随着蛋白酶或者酶活抑制物质的增加,发酵液中的酶活力水平也就逐渐降低。另外从菌丝体的生长情况看,静止培养时菌丝体生长缓慢,菌体生长达到稳定期的时间长;而在动态培养时菌体生长比较快,这可能与该菌生长需要消耗大量氧气有关。两种培养情况下的pH值变化趋势也不相同,振荡培养情况下pH值变化幅度很小;而静止培养时,pH值先下降,随后基本保持稳定。振荡培养时,随着培养时间的延长,还原糖含量不断降低;在静止培养时,还原糖的含量也有逐渐减少的趋势,但是其消耗的速度很慢,可能与静态培养时菌丝生长速度较慢有关。通过两种培养方式的比较发现,振荡培养时毛云芝菌产漆酶的酶活比较高,因此随后的优化试验均采用振荡培养的方式。

2.3 毛云芝菌在基础产酶发酵培养基的产酶曲线

将种子液接入基础产酶培养基中,每天定时取3瓶样品,每瓶装有55 mL发酵液,测定其菌丝体生物量、酶活以及还原糖的含量,试验结果如图4所示。

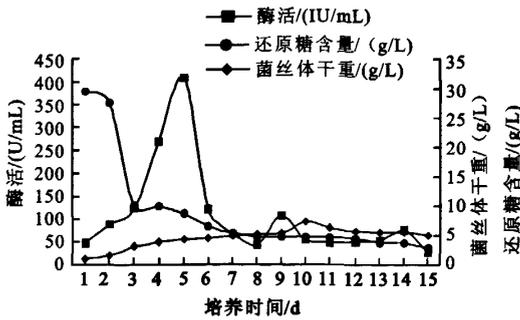


图 4 毛云芝菌在基础产酶培养基中的产酶历程

Fig. 4 Laccase production course of *Coriolus hirsutus* in basic culture medium

由图 4 可见,该菌在培养到第 5 天时,酶活力水平最高,因此在以后的优化实验中均把第 5 天作为发酵终点。从图 4 还可以看出,在整个培养过程中,还原糖的含量、菌丝体干重以及酶活的变化趋势与上述振荡培养实验中的变化趋势基本相似。以后的优化实验均在基础产酶培养基的基础上进行。

2.4 培养基的优化试验结果及其分析

将培养好的液体种子接入基础产酶培养基中,接种量 10%,每个 250 mL 的摇瓶装液量为 50 mL,依次优化碳源、氮源、碳氮质量比、矿质元素,每次优化后的结果进行随后的条件优化实验。每一实验重复 3 次。

2.4.1 碳源对毛云芝菌产漆酶的影响 以蛋白胨 (0.2%)、MgSO₄·7H₂O (0.15%)、KH₂PO₄ (0.3%)、CaCl₂(0.001%)、NaCl(0.01%)为基础培养基,分别加入 2%的葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉、麸皮、桑叶粉、桑枝粉,其中麸皮、桑叶粉、桑枝粉分别在沸水中煮沸 40 min,过滤,取其水解液,比较不同碳源对毛云芝菌产漆酶的影响。结果见图 5。

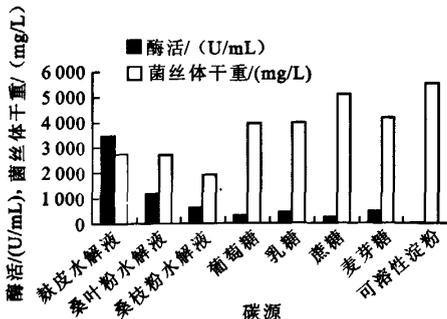


图 5 不同碳源对毛云芝菌产漆酶及其生物量的影响
Fig. 5 Effects of different carbon sources on laccase production and biomass of *Coriolus hirsutus*

由图 5 可知,液体培养毛云芝菌对 8 种碳源的

利用能力依次为麸皮、桑叶粉、桑枝粉、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、蔗糖和可溶性淀粉,说明该菌利用天然碳源的能力较强。且以麸皮做碳源时酶活最高,这可能是因为麸皮不仅可以作为毛云芝菌的碳源物质,而且还能为其生长提供其它生长因子。以可溶性淀粉、蔗糖、葡萄糖等做碳源时,酶活很低,但其菌丝体生物量却很高,说明该菌产酶与其菌丝体的生长没有明显的正相关性。

2.4.2 氮源对毛云芝菌产漆酶的影响 以麸皮 (2%)、MgSO₄·7H₂O (0.15%)、KH₂PO₄ (0.3%)、CaCl₂ (0.001%)、NaCl(0.01%)为基础培养基,分别加入 0.2%的酵母膏、蛋白胨、牛肉膏、花生粉、黄豆粉、尿素、硫酸铵、硝酸铵、硝酸钾,比较不同氮源对毛云芝菌产漆酶的影响。结果见图 6。

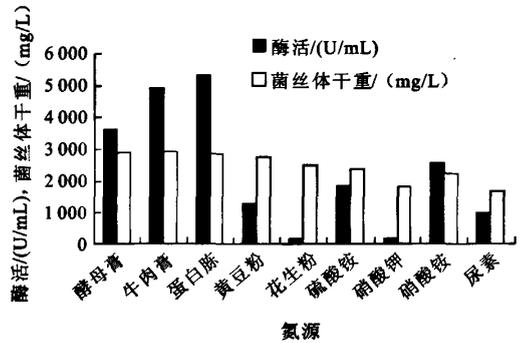


图 6 不同氮源对毛云芝菌产漆酶及其生物量的影响
Fig. 6 Effects of different nitrogen sources on laccase production and biomass of *Coriolus hirsutus*

由图 6 可知,毛云芝菌对 9 种氮源的利用能力依次为蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、硝酸铵、硫酸铵、黄豆粉、尿素、花生粉和硝酸钾。因此在随后的优化试验中选择复合氮源蛋白胨、牛肉膏作为最佳氮源,以便于以后的分离纯化试验。但在发酵生产中应选择价格低廉、来源方便的硝酸铵作为最优氮源。由图 6 也可以看出,该菌利用不同氮源产漆酶的能力与其菌丝体的生长情况没有明显的相关性。

2.4.3 碳氮质量比对毛云芝菌产漆酶的影响 将麸皮、麦芽糖、蛋白胨、牛肉膏的质量分数作为 A、B、C、D 四因素,通过 4 因素 3 水平的正交试验,比较 8 种不同的碳氮质量比对毛云芝菌产漆酶的影响。由表 1 的极差分析结果可以看出,培养基的最佳配方为 A₃B₁C₂D₃,即麸皮 3%,蛋白胨 0.2%,牛肉膏 0.3%。因此认为较适合毛云芝菌产漆酶的液体培养基碳氮质量比为 6,可以看出该菌在限氮条件下培养时有利于产酶。

2.4.4 矿质元素对毛云芝菌产漆酶的影响 以麸皮(3%)、蛋白胨(0.2%)、牛肉膏(0.3%)为基础培

培养基,以 KH_2PO_4 质量分数、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量分数、微量元素溶液体积分数、 VB_1 质量浓度,作为 A、B、C、D 四个因素,按 4 因素 4 水平试验设计比较不同矿质元素对毛云芝菌产漆酶的影响。由表 2 的

极差分析结果可以看出,矿质元素对毛云芝菌产漆酶的影响由大到小的顺序是微量元素溶液、 VB_1 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,它们分别以体积分数 6%、20 mg/L,质量分数 0.3%、0.05% 为最优。

表 1 碳氮质量比对毛云芝菌产漆酶的影响正交试验结果

Tab. 1 Orthogonal tests of the effect of C/N ratios on the laccase production by *Coriolus hirsutus*

因素	A 麸皮 质量分数	B 麦芽糖 质量分数	C 蛋白胨 质量分数	D 牛肉膏 质量分数	酶活/ (U/mL)
试验 1	1(1%)	1(0%)	1(0.05%)	1(0%)	1 305
试验 2	1	2(1%)	2(0.2%)	2(0.15%)	1 316
试验 3	1	3(2%)	3(0.35%)	3(0.3%)	1 640
试验 4	2(2%)	1	2	3	3 100
试验 5	2	2	3	1	1 840
试验 6	2	3	1	2	2 572
试验 7	3(3%)	1	3	2	2 933
试验 8	3	2	1	3	2 336
试验 9	3	3	2	1	2 496
均值 1	1 420.33	2 446.00	2 071.00	1 880.33	
均值 2	2 504.00	1 830.66	2 304.00	2 273.67	
均值 3	2 588.33	2 236.00	2 137.67	2 358.67	
极差	1 168.00	615.34	233.00	478.34	

表 2 矿质元素对毛云芝菌产漆酶的影响正交试验结果分析

Tab. 2 Orthogonal tests of the effect of minerals on the laccase production by *Coriolus hirsutus*

因素	A KH_2PO_4 质量分数	B $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量分数	C 微量元素溶液 体积分数	D VB_1 质量浓度	酶活/ (U/mL)
试验 1	1(0.4%)	1(0.2%)	1(12%)	1(20 mg/L)	823
试验 2	1	2(0.15%)	2(10%)	2 (15 mg/L)	1 123
试验 3	1	3(0.10%)	3(8%)	3 (10 mg/L)	845
试验 4	1	4(0.05%)	4(6%)	4 (5 mg/L)	1 609
试验 5	2(0.3%)	1	2	3	703
试验 6	2	2	1	4	664
试验 7	2	3	4	1	3 360
试验 8	2	4	3	2	3 040
试验 9	3(0.2%)	1	3	4	1 073
试验 10	3	2	4	3	1 189
试验 11	3	3	1	2	1 014
试验 12	3	4	2	1	1 449
试验 13	4(0.1%)	1	4	2	2 984
试验 14	4	2	3	1	2 651
试验 15	4	3	2	4	546
试验 16	4	4	1	3	336
均值 1	1 100.00	1 395.75	709.25	2 070.75	
均值 2	1 941.25	1 406.75	955.25	2 040.25	
均值 3	1 181.25	1 441.25	1 902.25	768.25	
均值 4	1 629.25	1 608.50	2 285.50	973.00	
极差	841.75	212.75	1 576.25	1 302.50	

2.5 优化培养基与原培养基的比较

将实验所得到的培养基的各组分最佳条件结合在一起配制成优化培养基(质量分数):麸皮3%,蛋白胨0.2%,牛肉膏0.3%, KH_2PO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, CaCl_2 0.001%, NaCl 0.01%;微量元素溶液(体积分数)6%, VB_1 20 mg/L,自来水,pH自然。与原培养基在同条件下培养,比较优化培养基与原培养基酶活的高低。由表3可知,培养基优化后的酶活约是优化前的16倍,酶活达到1686 U/mL。

表3 优化培养基与原培养基的酶活比较

Tab.1 Comparison of enzyme activity of laccase produced by *Coriolus hirsutus* cultured in original and optimized medium

量与单位	培养基 优化前	培养基 优化后	提高 倍数
酶活/(U/mL)	105	1686	16

3 结 语

1) 毛云芝菌在液体种子培养基中的培养时间为4 d,此时菌体处于生长旺盛的对数生长期。通过试验还发现漆酶的合成与菌丝体的生长没有明显的相关性,但是菌丝体一定的生长量是其合成漆酶的前提。不同培养条件下的产酶比较试验结果表明,动态培养有利于该菌产酶,在基础产酶培养基中培养到第5天时,酶活力水平最高。

2) 动态培养条件下的优化试验结果表明,优化培养基的组成(质量分数)为:麸皮3%,蛋白胨0.2%,牛肉膏0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KH_2PO_4 0.3%, NaCl 0.01%;TE6%(体积分数), VB_1 20 mg/L,自来水,pH自然。优化后培养基的酶活比原培养基的酶活提高了约16倍,优化效果较显著。

参考文献(References):

- [1] 赵敏,杨谦,宋小双,等.真菌漆酶分子生物学研究进展[J].林产化学与工业,2005,25(1):115-120.
ZHAO Min, YANG Qian, SONG Xiao-shuang, et al. Advances of research on molecular biology of laccase from fungi[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2005,25(1):115-120. (in Chinese)
- [2] 钲亚鹏,钱世钧.真菌漆酶及其应用[J].生物工程进展,2001,21(5):23-28.
CHAO Ya-peng, QIAN Shi-jun. Fungal laccase and its applications [J]. *Development of Bioengineering*, 2001,21(5):23-28. (in Chinese)
- [3] Susana R C, Jose L T H. Industrial and biotechnological applications of laccase; A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2006,24: 500-513.
- [4] 堵国成,赵政,陈坚.真菌漆酶的酶活测定及其在织物染料生物脱色中的应用[J].江南大学学报:自然科学版,2003,2(1):83-90.
DU Guo-cheng, ZHAO Zheng, CHEN Jian. Assaying fungal laccase activity and its application in bio-decolorization of the textile dyes [J]. *Journal of Southern Yangtze University: Natural Science Edition*, 2003,2(1):83-90. (in Chinese)
- [5] 郭梅,蒲军.白腐菌漆酶特性及其应用前景[J].天津农学院学报,2004,11(3):44-47.
GUO Mei, PU Jun. Characteristics of laccases from white rot fungus and prospect of application [J]. *Journal of Tianjin Agricultural College*, 2004,11(3):44-47. (in Chinese)
- [6] 王剑锋,苏国成.烟管菌漆酶合成的营养条件研究[J].食品与发酵工业,2006,32(2):20-24.
WANG Jian-feng, SU Guo-cheng. Effects of nutritional factors on laccase production from white rot fungi *bjerkandera adusta*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006,32(2):20-24. (in Chinese)
- [7] 胡道伟,朱雄伟,梅运军,等.白腐菌产漆酶培养条件的研究[J].华中科技大学学报:自然科学版,2003,31(4):111-113.
HU Dao-wei, ZHU Xiong-wei, MEI Yun-jun, et al. The condition of producing Laccase by white rot fungi [J]. *J Hua-zhong Univ of Sci & Tech: Nature Science Edition*, 2003,31(4):111-113. (in Chinese)
- [8] 翁玮慧,张华.乳酸菌SK1.002产L-阿拉伯糖异构酶培养基优化及发酵条件[J].食品与生物技术学报,2007,26(3):100-105.
WENG Wei-hui, ZHANG Hua. Medium optimization and properties of L-arabinose isomerase produced by lactobacillus SK1.002 [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(3): 100-105. (in Chinese)
- [9] 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)

(责任编辑:秦和平,李春丽)