

# 真菌漆酶及其生产、固定化与应用

唐禄鑫, 王雅娴, 彭明意, 王豪, 司静\*, 崔宝凯\*

北京林业大学生态与自然保护学院 微生物研究所, 北京 100083

**摘要:** 漆酶能够作用的底物非常广泛, 包括木质纤维素等大分子聚合物, 且在催化反应时可将该类物质还原成水和其他小分子物质, 不会造成二次污染, 因此, 漆酶素有“绿色催化剂”之称, 具有被广泛运用于工业生产中的广阔前景。对游离漆酶进行固定化处理能够使其进一步适应工业生产中的恶劣环境, 提高稳定性、可循环利用率, 扩大耐受pH和温度范围。真菌漆酶作为漆酶的重要来源, 本文对其性质、生产, 以及新型的固定化方法和各个领域的应用进行了概述。

**关键词:** 漆酶; 白腐真菌; 固定化; 工业应用

## [引用本文]

唐禄鑫, 王雅娴, 彭明意, 王豪, 司静, 崔宝凯, 2023. 真菌漆酶及其生产、固定化与应用. 菌物学报, 42(9): 1821-1837

Tang LX, Wang YX, Peng MY, Wang H, Si J, Cui BK, 2023. Fungal laccase and its production, immobilization, and application: a review. *Mycosystema*, 42(9): 1821-1837

## Fungal laccase and its production, immobilization, and application: a review

TANG Luxin, WANG Yaxian, PENG Mingyi, WANG Hao, SI Jing\*, CUI Baokai\*

Institute of Microbiology, School of Ecology and Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

**Abstract:** Laccases are so called as green catalysts since they can reduce a vast of substrates including lignocellulose and other macromolecular polymers into water and low-molecular weight by-products, without formation of secondary pollutants. Therefore, laccases have huge potentials in various industrial applications. For free laccases, immobilization treatment is capable of

资助项目: 北京林业大学“国家级大学生创新创业训练计划”(G202210022078); 国家自然科学基金(32070016, 32270016, 31700016, U2003211); 北京林业大学杰出青年人才培养计划项目(2019JQ03016)

This work was supported by the National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship of the Beijing Forestry University (G202210022078), the National Natural Science Foundation of China (32070016, 32270016, 31700016, U2003211), and the Beijing Forestry University Outstanding Young Talent Cultivation Project (2019JQ03016).

\*Corresponding authors. E-mail: SI Jing, jingsi1788@126.com; CUI Baokai, cui.baokai@bjfu.edu.cn

ORCID: TANG Luxin (0000-0002-5753-6354), SI Jing (0000-0001-9229-0727), CUI Baokai (0000-0003-3059-9344)

Received: 2022-12-06; Accepted: 2022-12-09

enhancing their capacities to adapt harsh conditions for industrial utilization, thermostability, reusability, and expanding the tolerant ranges of pH and temperature. As fungal laccases are important origins of laccases, their properties, production, current immobilization strategies, and potential applications in various fields were summarized in this review.

**Keywords:** laccase; white rot fungi; immobilization; industrial application

漆酶(EC 1.10.3.2)又称对二酚-二氧化还原酶(Rivera-Hoyos *et al.* 2013), 是一种含铜的多酚氧化酶, 属于蓝色多铜氧化酶家族(司静等 2011b; Si *et al.* 2013), 最早由日本学者 Yoshida (1883)在紫胶漆树 *Rhus vernicifera* 中发现。19 世纪末, Bertrand (1896)首次分离、纯化并命名漆酶。

除高等植物外, 漆酶或漆酶类似物也广泛存在于动物和微生物中, 动物漆酶则主要发现于昆虫或一些原核生物中, 有学者认为动物体内产生的只是具有类似性质的多酚氧化酶, 并非准确意义上的漆酶(邓寒梅等 2017); 微生物漆酶根据其来源可分为细菌漆酶和真菌漆酶, 其中, 真菌是主要的漆酶生产者, 广泛分布在担子菌门和子囊菌门(靳蓉和张飞龙 2012), 尤其以白腐真菌分泌的漆酶降解木质素效果最好(魏玉莲和戴玉成 2004), 因此真菌漆酶的研究主要集中于木材腐朽菌的白色腐朽菌类群, 如栓孔菌属 *Trametes*、多孔菌属 *Polyporus*、灵芝属 *Ganoderma* 和层孔菌属 *Fomes* 等(Dai 2012)。

## 1 漆酶的结构和特性

### 1.1 结构特征

漆酶是由细胞产生的一种酸性等电点单体蛋白(陈明雨等 2021), 分布于胞外或胞内, 由 500–550 个氨基酸组成, 并伴随不同程度的糖基化, 分子量变化范围为 50–70 kDa。漆酶分子主要由折叠结构、无规则卷曲和螺旋结构组成, 包含 3 杯状结构域, 并以二硫键相连(刘忠川和王刚刚 2013), 其催化活性核心是 4 铜原子和 3 类铜原子结合位点。4 铜原子是漆酶结构的重要组

成部分, 同时也作为辅因子在底物的催化过程中起电子传递的作用(张泽雄等 2017)。这些铜原子分布在 3 类结合位点中, 其中, T1 和 T2 各分布 1 铜原子, T3 分布有 2 铜原子。静息状态下, 铜原子以  $\text{Cu}^{2+}$  的形式存在, T1 位点的  $\text{Cu}^{2+}$  是顺磁性 I 型铜(“蓝色”铜), 吸光度为 610 nm; 在 T2 位点的  $\text{Cu}^{2+}$  是顺磁性 II 型铜(“非蓝色”铜), 在可见光区的吸收峰较弱; T3 位点的 2 个  $\text{Cu}^{2+}$  构成反磁性自旋耦合铜-铜离子对, 吸光度为 330 nm。

### 1.2 理化性质

#### 1.2.1 催化作用

漆酶的底物范围较为广泛, 可催化芳香族化合物、金属离子及有机金属化合物等的氧化反应。此外, 漆酶还可以依靠天然或合成的氧化还原介质, 形成漆酶-介质系统(laccase-mediator system, LMS), 氧化一些很难被氧化的非酚类物质, 如多环芳烃、多氯联苯、偶氮染料或有机磷农药等(Mate & Alcalde 2015)。并且, 漆酶的氧化还原电势越高, 其催化氧化活性越强、范围越广。多数真菌漆酶尤其是以白腐真菌分泌的漆酶氧化还原电势明显高于植物漆酶和细菌漆酶(Rodgers *et al.* 2010)。漆酶反应的机制主要是通过底物在 T1 处进行 4 次一价氧化, 脱去 4 个电子, 从还原底物中提取的电子转移至 T2/T3 三核中心, 将分子氧还原为水(Wong 2009)。

#### 1.2.2 最适反应条件

通常来说, 真菌漆酶在偏酸性环境下具有更强的催化活性, 一般 pH 4.0–6.0 时为较合适的酸碱度范围。但也有例外, 如蝶形斑褶菇 *Panaeolus papilionaceus* 漆酶以二甲基苯酚(2,6-dimethyl

phenol, DMP) 为底物时的最适 pH 为 8.0 (Heinzkill *et al.* 1998)。漆酶的最适反应条件具有极强的底物特异性, 例如漆酶对底物 2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS] 的最适 pH 一般较低, 对酚类化合物如 DMP、愈创木酚和丁香醛连氮的最适 pH 相对较高(Baldrian 2006)。大多数真菌漆酶的最适温度为 25–50 °C, 温度较低或过高常常会抑制酶活。杨建明等(2005)发现毛木耳 *Auricularia polytricha* 所产漆酶 B (分子量为 84 kDa) 在 30 °C 时活性最高, 在 25–60 °C 活性普遍较高, 而温度高于 60 °C 时, 酶活性显著下降。不同漆酶对温度的敏感程度不同, 因此选择温度适应范围广或者对高低温适应能力强的漆酶对其工业化应用具有重要意义。

### 1.2.3 其他影响因素

金属离子: 研究表明,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{K}^{+}$  等金属离子都能够对漆酶活性产生影响。同一金属离子对同一菌株的漆酶活性影响具有浓度依赖性, 不同浓度下对漆酶活性的影响效果显著不同, 且对不同菌株来源的漆酶同样表现出活性的差异性, 促进还是抑制酶活需要根据漆酶来源的真菌种类、菌株和离子浓度进行具体分析(胡艳等 2011; Piscitelli *et al.* 2011; 陈带娣等 2013)。

盐浓度: 盐浓度过高, 卤化物结合到铜原子结合位点会抑制电子转移; 盐浓度太低, 酶表面的正电荷阻碍酶与底物的相互作用; 在合适浓度下, 卤化物与酶表面的正电荷结合, 促进催化活性(Li *et al.* 2020)。

抑制剂: 漆酶活性可被叠氮化物、氰化物、硫氰化物、巯基乙酸及卤化物等阴离子化合物抑制, 这些化合物通过与 T2 和 T3 铜原子结合, 中断内部电子转移过程来抑制酶的活性(Jaiswal *et al.* 2016); 另外, 如金属离子、脂肪酸、羧基甘氨酸和曲酸等也可通过修饰氨基酸残基、改变

漆酶构象、螯合铜原子或引起蛋白质变性影响漆酶活性(Gianfreda *et al.* 1999)。

### 1.3 活性测定方法

目前测定漆酶活性时常使用的底物主要有 3 种: ABTS、DMP 和愈创木酚。李松等(2015)就以上 3 种底物对 5 种具有不同活性的酶液进行了测定和比较, 得出结论: 3 种底物中, ABTS 作为底物时的反应时间短且检测灵敏, 漆酶对 ABTS 的氧化速率最快, 约为其他 2 种底物的 3 倍, 是较优良的酶活测定底物。

在测定漆酶活性时, 常用分光光度法, 通过测定在给定波长的光下、处于最大吸光系数时, 底物在漆酶作用下形成离子自由基的吸光度变化, 继而根据吸光度与相应时间之间的关系计算酶活性。当以 ABTS 为底物时, 其离子自由基在 420 nm 处存在最大吸光系数, 定义酶活单位(U) 为每分钟氧化 1  $\mu\text{mol}$  ABTS 的酶量(Niladevi *et al.* 2009; 韩月颖等 2021)。

## 2 漆酶的生产

### 2.1 产漆酶真菌的筛选

真菌漆酶的筛选首先需要进行平板法初筛, 即添加有 ABTS、 $\alpha$ -萘酚、愈创木酚和雷玛唑蓝 R 等显色底物的平板显色法。其中, 愈创木酚法反应灵敏、显色稳定, 运用最为广泛, 通过观察红褐色显色反应的颜色深浅以及愈创木酚形成的显色圈大小等指标以判断真菌产漆酶的能力(Yuan *et al.* 2012; 姜海伟等 2023)。由于不同漆酶对不同底物的催化能力不同, 平板法只能初步、不能准确定量判断漆酶活性大小, 因此, 多用液体发酵法进行复筛。针对初筛中显色效果较好的真菌, 挑选并经斜面活化后, 转接至平板上培养合适时间, 将其定量接入摇瓶种子培养基振荡培养, 再将摇瓶种子装入液体产酶培养基中恒温振荡培养, 并定时取发酵液测定漆酶活性, 进一步筛选漆酶高产菌株(陈琼华等 2009)。

## 2.2 漆酶发酵效果的影响因素

发酵过程中, 温度、pH、转速、碳源、氮源、碳氮比和诱导剂等因素均会影响真菌的产酶能力, 具体而言, 每个因素对发酵效果的影响具有酶来源真菌种类、菌株等的差异性(郑飞等 2017)。因此, 在进行漆酶发酵时, 往往会针对目的菌株通过单因子试验、正交试验或响应面分析等方法对培养基成分、用量配比和条件等进行逐级优化。

### 2.2.1 碳源、氮源和碳氮比

碳源和氮源种类影响真菌代谢(安琪等 2015), 也对漆酶产量具有显著影响。孙荣等(2020)选取 5 种碳源和 5 种氮源对血红密孔菌 *Pycnoporus sanguineus* 发酵产漆酶条件进行了优化, 发现以甘油为碳源、豆粕为氮源时, 酶活性最高, 分别可达 30 U/mL 和 32 U/mL。除种类外, 碳源和氮源的浓度配比也会影响漆酶的发酵效果(陈带娣等 2013)。徐春燕等(2021)对端梗霉属 *Acrophialophora* 菌株 Z45 进行培养基优化时, 发现其在碳氮比为 10:1 时发酵效果最好, 随着碳氮比的升高, 产酶量反而减少。

### 2.2.2 诱导剂

在真菌漆酶的诱导培养中, 常用诱导剂主要有以木质纤维素为主要成分的木屑、棉籽壳、麦麸等生物诱导剂(安琪等 2018); 愈创木酚、金属离子、芳香族化合物和酚类化合物等化学诱导剂(Wang *et al.* 2022); 另外, 通过紫外线、超高压等物理诱导处理方法(吴怡等 2019), 也可以达到提高漆酶产量的效果。联合诱导的效果往往会比单一诱导剂的诱导效果更佳, 例如, Zhuo *et al.* (2017)发现组合使用金属离子( $\text{Fe}^{2+}$  或  $\text{Cu}^{2+}$ )和芳香族化合物(香草酸、肉桂酸或阿魏酸)能够协同提高糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* 漆酶活性, 进一步验证证实其主要通过刺激多条漆酶编码基因转录水平上调。

### 2.2.3 温度、pH 和转速

一般情况下, 真菌漆酶发酵的最适温度为

25–35 °C, 偏酸性发酵环境, 转速 140–200 r/min。司静等(2011a)综合考虑产酶量和工艺简单经济等因素发现, 微酸多年卧孔菌 *Perenniporia subacida* 的最适产漆酶初始 pH 为 5.6, 温度为 24 °C, 转速为 160 r/min, 当温度、pH 过高或过低时, 菌丝生长、酶活性都会受到影响, 而转速通过影响溶氧量从而影响发酵效果。

## 2.3 漆酶的分离提纯

漆酶的分离提纯是准确测定其活性和深入研究其理化性质的关键基础, 对其进一步地修饰改造并应用于工业化生产具有重要意义。对于胞外分布漆酶, 操作步骤主要包括对发酵液进行抽滤和离心, 提取上清液, 根据酶的溶解度、分子大小及电荷等的差异采取盐析、层析、等电点沉淀、电泳、超滤和透析等方法, 通常需要联合多种方法进行分离提纯才能达到较好的纯化效果; 对于胞内分布漆酶, 除需上述步骤外, 起始需利用超声波等技术破坏细胞壁, 使胞内漆酶释放(Zheng *et al.* 2017; 吴怡等 2019; Si *et al.* 2021a)。纯化方法的选择会影响到酶活性, 个别分离提纯方法如高速离心可能会造成酶的天然构象发生改变从而降低活性(Alver & Metin 2017)。

## 2.4 漆酶-介质系统

LMS 是由漆酶和介质组成的反应体系, 可以氧化木质素中的非酚结构, 扩大漆酶底物的作用范围。迄今为止发现的 LMS 氧化机理是氢原子的转移、电子转移和化学离子转移。其介质主要分为 3 类: 合成介质、酚酸天然介质和多金属氧酸盐介质等, 其中, 天然介质可以从植物材料、制浆工业副产品及废水中获得, 更经济、响应效果好、可回收利用, 是理想的介质选择(罗爽等 2015)。汤星阳等(2020)利用丁香醛和香草醛构建的双天然介质系统提高了漆酶对土霉素的降解效率, 优化后的降解率高达 95.14%, 优于漆酶-ABTS 系统, 将更加环保和实惠。

### 3 漆酶的固定化

#### 3.1 固定化酶

固定化是指通过物理或化学方法将游离酶固定在一定空间范围内或者其他物质所构成的载体中,使所形成的固定化酶仍具有游离酶状态下的催化性质,是一种主流的酶工程技术。在将游离酶进行适当的固定化后,相比之下固定化酶的适应性增强,对环境的 pH、温度耐受范围变宽,能够多次被循环利用,从而降低成本,此外可能还会赋予其特定的性能(Wang *et al.* 2008; Lin *et al.* 2017)。随着材料科学和工程技术的发展,探寻合适的固定化载体和高效的固定化技术有助于推动固定化漆酶的研究不断向着绿色环保、便捷高效、经济实惠的工业化生产方向发展。

#### 3.2 漆酶固定化载体

固定化载体要求孔隙率高,酶载量大;表面积大,使酶能与底物充分接触;具有惰性,载体与底物或是实际工业应用中的物质如废水等不发生反应;物理硬度高,不易发生形变;另外,还应具有可再生、无毒性、耐微生物攻击等特点(Aggarwal *et al.* 2021)。当前,已有凝胶、微球、膜及粒子等多种形式的载体被运用到固定化漆酶的研究中,载体材料也是多种多样,如天然或合成的有机或无机化合物、复合物和农工业废料等,随着科学技术的不断发展进步,载体材料的体系更加庞大,性能更加优良。

##### 3.2.1 传统高分子材料固定化载体

壳聚糖、海藻酸钠、淀粉、明胶、琼脂、硅藻土、陶瓷和  $\text{TiO}_2$  等传统高分子材料都可以作为固定化载体参与漆酶的固定化(曹文娟和袁海生 2016; Zheng *et al.* 2016; Nguyen & Kim 2017; 王豪等 2021)。此类材料虽然能达到固定化并参与催化反应的目的,却也在使用过程中存在诸多问题,如酶载量低、热稳定性差、酶的泄漏率高、相对活性低及可循环性差等。因此,寻找更多新型的固定化材料、探求载体功能化和改性技术等

在研究中迅速兴起。

##### 3.2.2 基于新型材料的固定化载体——磁性载体

磁性载体是能对磁场作出某种反应的材料,通常由 Fe、Mn、Co 及其氧化物所制备。因其本身具有磁性,能在外加磁场的作用下实现与底物和转化产物的分离,可大大简化固定化酶的回收工艺、降低成本、提高回收率。但磁性材料存在容易聚集、稳定性差和酶载量低等问题,通常与其他材料复合作为固定化载体材料,以此降低其聚集能力,提高悬浮稳定性,并且能够避免磁性金属物质的泄漏而对实际生产造成影响(韩林等 2021)。

磁性载体的制备方式多样,包括共沉淀(coprecipitation)法、高温分解法、溶剂热合成和溶胶-凝胶法等。化学沉淀法具有实验操作简单、反应温和、时间短、以水为溶剂等优点(Arévalo *et al.* 2017; Si *et al.* 2021b; 汤宇峰等 2022),且已被广泛运用,Zdarta *et al.* (2020)以一定比例的  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  作为前驱物,采取共沉淀法制备了磁性纳米粒子,对于提高游离漆酶的稳定性效果显著。

磁性材料的复合方式也较为丰富,可与多种无机或有机材料复合。 $\text{SiO}_2$  能够防止  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子在空气中被氧化,并且提高其在酸性条件下的稳定性,加上易于修饰等特点,有众多学者开展研究与应用。Zhu *et al.* (2022)用戊二醛(glutaraldehyde)将漆酶固定在氨基功能化的  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  磁性纳米颗粒上,热稳定性和 pH 稳定性,及对某些有机化合物、抑制剂和金属离子的耐受性均显著上升,并且具有良好的重复使用性,最大酶载量达  $10.5 \text{ mg/g}$ ,活性回收率达 109.7%。Zhang *et al.* (2017)和 Arévalo-Cid *et al.* (2022)以壳聚糖高密度涂层为壳、磁性材料为核、戊二醛为交联剂所制备的高分子微球用于固定漆酶,使其悬浮稳定性升高、聚集能力下降、还具有亲水性。据马宁和谢文磊(2007)介绍,除

最常用的核壳结构外,中间夹层具磁性的三层式结构和外层具磁性的壳核式结构也被运用到了磁性高分子微球制备中。另外,将磁性材料与交联酶聚体组合使用也可以减少交联不充分导致的酶泄漏,避免因离心等实验操作导致的对漆酶结构的影响(Talekar *et al.* 2012)。Primožič *et al.* (2020)和 Sadeghzadeh *et al.* (2020)将修饰的磁性粒子氨基端与传统酶聚体结合组成磁性交联酶聚体,大大提升了热稳定性和重复利用性,降低了工艺成本。

### 3.2.3 基于新型材料的固定化载体——纳米载体

纳米载体指至少有一种是纳米级尺寸构成的载体材料(刘茹等 2021)。由于其比表面积大、孔隙结构丰富、热稳定性优异且形态柔韧,是良好的固定化载体,具有酶载量高和可重复利用等优势(Ansari & Husain 2012)。同样,单一的纳米载体材料存在一些缺陷,如因其纳米级的尺寸,很难简单快速地从催化反应体系中分离出来,或者因为表面极性等问题无法实现固定化(Liu & Dong 2020; Lu *et al.* 2022),由此应运而生的复合纳米材料可以在最大程度上保留原始材料的特征,同时也赋予载体新的性能以满足实际运用的需要(dos Santos *et al.* 2015)。

纳米材料的制备方法也多种多样,常采用共沉淀法、溶胶-凝胶法、固相煅烧法、溶剂蒸发法,以及一些新颖的技术如静电纺丝(electrospinning)和电喷雾(electrospray)等,这些方法的选择需考虑气、液、固相方法本身的差异,因此所制得的纳米材料大小也各有不同(张万忠和李万雄 2003; Alvarado-Ramírez *et al.* 2021)。常见的纳米材料可根据组成基物分为金属纳米材料、碳基纳米材料及其他纳米材料,也可根据构型分为纳米粒子、纳米纤维、纳米薄膜和纳米管等。其中,金属纳米材料包含了前述磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子,同样也有一些非磁性金属粒子常被用作固定化纳米载体,如运用较多的 Au、Cu、Zn 及 Ti 等。

Mohtar *et al.* (2019)将漆酶固定在 Au 纳米粒子后,再通过电沉积方法在网印刷碳电极上制成生物传感器用于测定蜂胶中的多酚。静电纺丝纳米纤维膜(electrospinning nanofiber membrane)本身就具有良好的吸附性,能去除水中的部分金属离子,将其作为固定化载体固定化漆酶后,可扩大酶对污染物的去除范围,简化处理步骤(李佳欣等 2022)。Xu *et al.* (2017)的研究中将纳米 Cu 加入聚丙烯腈/聚偏氟乙烯(polyacrylonitrile/polyvinylidene fluoride, PAN/PVdF)静电纺丝纳米纤维膜,随后对漆酶固定化,实现了去除水中的 2,4,6-三氯苯酚等污染物。

石墨烯(graphene)是一种单层碳原子构成的二维蜂窝状结构材料,具有高比表面积和机械强度以及出色的电学、热学和光学特性,因此该类化合物及其衍生物的潜在应用价值已被广泛挖掘(Smith *et al.* 2019)。Zhou *et al.* (2022)研究发现将漆酶固定在石墨烯氧化物上能够增强净水功效,一方面,石墨烯为漆酶提供良好的固定化条件,进而使酶的稳定性和活性提高;另一方面,漆酶对水体污染物的降解可以迅速释放石墨烯表面的吸附位点,继而增加石墨烯吸附量并加快吸附速率。

### 3.2.4 基于新型材料的新型固定化载体——介孔材料

介孔材料指孔径介于 2–50 nm 的一类多孔材料,其孔隙结构良好、比表面积高、吸附和渗透能力较强,便于负载酶分子(Aggarwal *et al.* 2021)。

介孔材料种类多样,目前研究较多的主要包括以下几种类型。 $\text{SiO}_2$  骨架介孔材料,包括分子筛、 $\text{SiO}_2$  和陶瓷等介孔材料。李群艳等(2022)利用十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CATB)调整磁性介孔  $\text{SiO}_2$  复合材料的介孔大小,当介孔孔径为 4.3 nm 时,酶载量最高达 234 mg/g,且固定化漆酶的 pH 和热稳定性显著提高。粘土矿物是具有纳米级间隙

层状结构的材料,表面带正电荷或负电荷,具有良好的机械强度、生物相容性、亲水性、吸附能力和溶胀能力,在生物分子负载领域展现出良好的应用前景(Ma *et al.* 2018b; Mulinari *et al.* 2020)。Wen *et al.* (2019)利用膨润土(bentonite)蚀刻所制得的介孔材料固定化漆酶以降解四环素,制备过程便捷高效,且制得的固定化酶热稳定性显著增强,降解四环素的能力也有所提高。金属有机框架(metal-organic framework, MOF)也是一类介孔材料,由金属离子和有机连接剂构成,具有丰富的孔隙结构、可调节的孔径、极高的比表面积和热稳定性,并且其本身就具有一定的催化作用,如 Molina *et al.* (2022)制备的无酶 MOF 型载体[NH<sub>2</sub>-MIL-53(Al)]在 30 min 内能去除水溶液中 90%以上的双酚 A (bisphenol A, BPA),以此为载体固定化漆酶后,生物催化剂 Lac@NH<sub>2</sub>-MIL-53(Al)在 3 min 内能完全去除 BPA,且在连续反应 5 次后 BPA 的去除率也高于 85%。MOF 载体的可调节孔径还可提供筛选作用,抑制有害物质接近酶的活性位点,提高酶的催化选择性(Li *et al.* 2022)。

### 3.2.5 固定化载体改性方法

载体制备过程中,往往针对不同来源的酶及其性质和固定化酶的实际应用途径,需要对载体材料进行改性,从而构建出具有更加优良性能、适宜某种或某类酶的新型固定化载体,目前常用的改性方法主要有接枝和金属螯合等。

接枝:指在大分子链上通过形成化学键结合适当的支链或功能性侧基,又称功能化。表面引发原子转移自由基聚合法(surface initiated atomic transfer radical polymerization, SI-ATRP)是一种活性自由基聚合方法,允许在具有不同官能团的各种材料上进行接枝共聚反应,接枝的纤维聚合物具有较高的表面积(Arica *et al.* 2017),运用到固定化酶中,利于催化反应的发生。D'Annibale *et al.* (2000)用环氧乙烷作为载体固定化香菇

*Lentinula edodes* 漆酶,提高了漆酶的 pH、热稳定性和蛋白水解稳定性。另外,载体的功能化还能为酶提供更多的结合位点。

金属螯合:即通过螯合作用将金属离子结合到官能团上形成杂环结构。上述已提到,某些金属离子可提高漆酶活性,因此将该类金属离子通过螯合作用结合到固定化载体上,可使固定化载体对漆酶活性具有激发作用。如 Alver & Metin (2017)将 Cu<sup>2+</sup>螯合到纳米颗粒上以增强漆酶对底物的亲和力。

## 3.3 固定化技术

### 3.3.1 传统固定化技术

吸附法:通过氢键、静电作用和范德华力等弱相互作用将酶固定在载体上,不改变酶的固有结构,不对其活性位点造成干扰,并使酶保持其活性。该方法工艺简单、条件温和且适用范围广泛,但固定强度弱,酶易从载体上脱离和泄漏(Jesionowski *et al.* 2014)。

包埋法:不经过化学修饰仅通过物理方法将酶限制在载体的通道、孔隙或膜上不易脱离。该方法不改变酶的理化结构,对酶活影响也较小,但连续使用会导致酶的泄漏率升高,酶与底物的接触不充分,加上物质扩散受到影响可能会限制酶的动力学参数等(Sheldon & van Pelt 2013)。

共价法:酶与载体之间通过活性基团反应形成共价键达到连接的目的。这种方法结合能力相对较强,固定化酶具有较好的热稳定性和重复利用性,并且不易发生酶的脱落,但可能导致酶构象发生改变从而影响酶活(Garcia-Galan *et al.* 2011)。

交联法:利用交联剂对酶蛋白交联,进行自固定化过程,通常使用的交联剂有戊二醛、双偶氮苯及双醛淀粉等。此方法的特点是无需额外载体、酶活较高、生产成本低,但也存在机械性能差、交联剂污染环境等问题(Rodríguez-Restrepo

& Orrego 2020), 因此开发新的天然可降解、无污染的绿色交联剂如京尼平(genipin)等也成为该方法进一步实现广泛应用的重要策略(Ma *et al.* 2018a)。

### 3.3.2 新型固定化技术

**单酶纳米颗粒固定化酶技术:**单酶纳米颗粒指单个酶分子被纳米级材料包被所形成的纳米颗粒, 其具有良好的孔隙结构, 并赋予固定化酶优越的稳定性, 且能均匀分布在溶液中, 由于个体微小, 极易吸附于其他材料中, 如介孔材料等。Hong *et al.* (2017)将硅酸盐在酶分子表面进行水解和缩合形成薄硅酸盐网络, 保留了酶的高活性, 提高了稳定性, 使之不受底物扩散的影响均匀分布在底物溶液中。

**纳米花型杂交晶体固定化酶技术:**纳米花型杂交晶体又称杂交纳米花(hybrid nanoflower, HNF), 是指将酶与无机盐杂交形成的复合晶体, 其状如盛开的花(Ge *et al.* 2012), 结构具较高的比表面积, 可维持稳定的酶构象、灵敏性和选择性及与底物之间的传质效率(Altinkaynak *et al.* 2016)。Kiani *et al.* (2022)制成的 Lac@Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·HNFs 保存有游离酶 84.6%的活性, 在 4 °C 下保存 30 d 后仍保存有游离酶 60%的活性。Zhang *et al.* (2016)构建了酶/Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> HNFs, 相对于游离酶, 其活性增加了 147%, 贮藏稳定性也有显著提升。

**无载体固定化酶技术:**即不借助其他材料构成固定化载体却可进行酶固定化的技术。交联酶聚合物(cross-linked enzyme aggregates, CLEAs)就是借助交联剂将酶分子聚合在一起形成不溶于水的聚集物以达到固定化的目的, 其操作简单, 无需专门仪器和支撑结构, 避免了载体对酶活的影响, 成本低廉, 有很大的应用潜力(柯彩霞等 2018)。Bilal *et al.* (2021)将云芝栓孔菌 *Trametes versicolor* IBL-04 胞外漆酶通过戊二醛进行交联形成 CLEAs, 其 pH 范围扩大, 贮藏稳定性和热

稳定性得到提升。Yang *et al.* (2017)将氨基功能化磁性纳米粒子与漆酶按一定比例以戊二醛作为交联剂相交联, 形成磁性 CLEAs, 使之在降解四环素后更易回收。

**3D 打印固定化酶技术:**3D 打印技术因使用材料的多样性, 加上简单、快速的设计程序, 可高效、精准、低成本地生产各种形状复杂的生物催化反应器, 易调节理化性质和表面性状等, 使其在生物催化领域显示出了巨大的应用潜力, 而 3D 打印固定化酶技术则是通过酶与打印材料相结合, 满足生产所需形状的同时还简化了固定化步骤(Pose-Boirazian *et al.* 2022)。水凝胶是一种柔软、高度水合的网络结构聚合物, 是组织工程、药物传递和酶固定化中作为支架的理想材料之一(Wang *et al.* 2019)。Xu *et al.* (2022)通过 3D 打印技术将漆酶固定在聚乙二醇二丙烯酸酯水凝胶做成的设备上用于去除水体中的药物, 制作过程条件温和, 该系统在 18 次分离使用后仍具有较高活性, 并且能够成功降低双氯芬酸(diclofenac)和炔雌醇(ethinylestradiol)在水溶液中的浓度。为了解决吸附和包埋固定化酶力学性能弱和扩散阻碍的问题, Liu *et al.* (2020)通过结合有机无机材料, 优化了海藻酸钠、丙烯酰胺和羟磷灰石的比例, 然后通过 3D 打印技术将漆酶固定化, 提供了一种简单高效、成本低及力学性能强的固定化方法。

**定向或多点固定化酶技术:**定向固定化酶技术是指按既定方向将酶固定在载体上。通常酶与载体的连接是随机的, 但在这种情况下有些酶的活性中心难免被传质效率较差的载体隐藏或阻碍, 通过定向固定, 可以使酶活中心远离固定化位点, 保证与底物充分接触, 从而提高催化效率; 另外, 由于载体与酶的活性位点数量上存在差异, 固定化过程中形成的化学键或物理键数量也会直接影响固定化酶的空间摆动灵活性和催化活性(Hooks *et al.* 2014)。多点固定化酶技术是指



由2个或2个以上的键将载体和酶连接的固定化技术,所制得的固定化酶具有更好的刚性、热稳定性、pH稳定性和可重复使用性(Bernal *et al.* 2014)。但是由于多点固定化酶的摆动角度较小,活性中心与底物接触的机会较小,固定化酶的传质效率可能会受到影响(Weltz *et al.* 2020),因此,设计时必须考虑固定时的键位数量。

当前,各种新型固定化载体和技术还在不断涌现更新,每种材料和技术都有各自的优点和局限性,单一技术可能难以满足工业规模化应用的需求,将合适的载体与技术灵活组合应用才能取长补短(Cao *et al.* 2016; Zhong *et al.* 2017; Wang *et al.* 2020)。

### 3.4 固定化漆酶结构表征及性能评价

#### 3.4.1 固定化漆酶结构表征

目前研究中所用到的固定化载体相对复杂,多涉及纳米结构,观测其形貌特征时通常需使用透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)。另外,扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)也是观察固定化载体或固定化酶形貌特征的重要手段,但多用于微米或亚微米级的结构。除了表面形貌特征外,对固定化载体和固定化酶内部空间结构和原子分布情况的表征常借助X射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD)。傅里叶变换红外光谱(Fourier transform-infrared spectroscopy, FT-IR)则能对其分子表面官能团进行表征,也被用来证实酶固定化的完成(郭荣贵等 2018; Arévalo-Cid *et al.* 2022)。

#### 3.4.2 固定化漆酶性能及其评价

**酶载量:**在完成漆酶固定化后,通常会对固定化载体的酶载量进行测定,并探讨过程工艺最佳条件。考马斯蓝染色法(Bradford法)常用来测定酶载量。初始酶浓度对酶载量有一定影响,Alver & Metin (2017)研究发现初始酶浓度越大,固定化载体对酶的负载能力越强。

**固定化酶活性:**与游离漆酶的活性测定相

近,对固定化酶活性的测定通常使用紫外-可见分光光度法。除了对表观活性即其催化活性的测定之外,常常探讨其活性恢复能力,设定不同时间长度的间歇期,测定其间歇期后的催化活性,从而确定其活性恢复到一定程度所需要的时间。

**循环利用能力:**固定化酶的循环利用能力也是探讨的热点,通过对其循环使用次数及每次使用的催化活性进行测定,从而分析其循环利用能力。

**稳定性:**对于固定化漆酶的稳定性,通常具体讨论其热稳定性、贮藏稳定性和操作稳定性。热稳定性的评价通过热重分析(thermal gravimetric analysis, TGA)获得,分析随温度升高的失重情况探讨其稳定性。贮藏和操作稳定性则分析贮藏和催化过程中酶活性的变化。

**产物的鉴定:**在实际工业化应用中,通常涉及对固定化漆酶转化的产物进行鉴定,如利用飞行时间质谱(time of flight-mass spectrometry, TOF-MS)等可实现对其产物进行鉴定。

另外,固定化酶的动力学参数、最适pH和温度范围、磁性材料的磁性行为等也是性能评价的重要指标。

## 4 漆酶在现代工业中的应用研究进展

### 4.1 食品工业

漆酶在食品工业中运用广泛,如:在果汁、葡萄酒和啤酒等饮料的生产中可降解其中的酚类物质,使饮料澄清,以保证饮品品质的稳定(胡周月等 2019; 魏胜华等 2021);在食品烘焙时加入漆酶,可使食品风味好,更筋道(彭滢钞等 2013);加入到酱油中可增加风味、改善牛奶口感、作为食品添加剂等;在食用菌的培养过程中加入漆酶可提高食用菌产量。

## 4.2 工业染料脱色

漆酶在纺织品染色、纺织纤维改良、织物漂白和废弃染料的处理方面都有一定作用(袁海生等 2010; 李建康等 2021)。Zhang *et al.* (2022)运用漆酶对锰过氧化酶主导的牛仔布漂白进行辅助催化, 降解靛蓝; 陈中维等(2021)利用黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 产漆酶并对刚果红染料进行降解; 另外, 氨基黑、甲基绿和甲基紫等多种染料也均可由漆酶进行降解从而达到脱色作用。

## 4.3 造纸制浆工业

在造纸制浆工业中, 往往会需要漆酶对木质纤维素的降解作用来处理纸浆; 纸浆的无氯漂白也需要漆酶的参与; 制浆废水中染料的降解也离不开漆酶(Rodríguez Couto & Toca Herrera 2006)。

## 4.4 生物检测

漆酶运用到生物检测中主要是进行生物传感器的制作和用于免疫检测。将漆酶固定在电极上, 通过催化反应时需氧这一原理极易产生电信号, 从而能够用于检测化合物和代谢物, 如 Mohtar *et al.* (2019)将漆酶固定在 Au 纳米粒子后, 再由电沉积方法在网印刷碳电极上制成生物传感器, 用于蜂胶中多酚的测定。另外, 漆酶有望代替辣根过氧化物酶作为免疫检测中的标记酶(钞亚鹏和钱世钧 2001)。

## 4.5 高分子化合物有机合成

漆酶能够参与一些高分子化合物的有机合成, 如, 刘家扬等(2015)研究了漆酶催化儿茶素及儿茶酚合成黑色素, 并对该过程的影响因素进行了探讨。漆酶在真菌色素合成和菌丝的附着及固定中也扮演重要角色(钞亚鹏和钱世钧 2001)。

## 4.6 化妆品工业

运用漆酶的催化性能, 在具有美白、保湿功效的化妆品中得以应用。如, Shin *et al.* (2019)运用漆酶和其他过氧化物酶制成的复合酶能够

成功降解黑色素, 且复合酶的活性极高, 有望制成对人体无害的新型美白产品; 卜鑫(2018)借助漆酶/2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物(2,2,6,6-tetramethylpiperidoxyl, TEMPO)体系改性壳聚糖制得羧基化壳寡糖, 其保湿、抗氧化效果优于改性前的壳聚糖, 有良好的应用前景。

## 4.7 生物燃料电池

酶生物燃料电池是一种绿色燃料电池, 在可穿戴电子设备电源、植入器件电源和废水处理等领域发挥作用, 其中, 漆酶的生物燃料电池广泛运用于废水处理并取得了不错的成效, 但其稳定性还需改进(苗昆鹏等 2021)。

## 4.8 医药产业

漆酶基于其绿色合成技术, 在抗癌、抗氧化、抗菌和抗糖尿病等新型药物的合成中发挥着重要作用(刘庆竹等 2021)。漆酶的表达也是部分致病真菌毒力表达的主要方式, 抑制致病真菌漆酶的表达是治疗此类疾病的重要突破点, Azam *et al.* (2022)揭示了新型耐药隐球菌漆酶与鞣花酸相互作用的分子基础, 为抗隐球菌药物的设计研究提供了新的思路。

## 4.9 污染物降解

漆酶由于其高效、环保的催化特性, 在环境污染日益激增的今天受到的关注迅速提升。例如, 针对上述的各种染料, 以及酚类污染物苯酚、邻苯二酚(Mohammadi *et al.* 2018)、BPA(Fu *et al.* 2019)和对氯苯酚(Liu *et al.* 2020)等, 抗生素类污染物如四环素(Yang *et al.* 2017)、金霉素(Taheran *et al.* 2017)和双氯芬酸(Primožič *et al.* 2020)等, 固定化漆酶的污染物降解能力对维持生物体健康和生态系统平衡至关重要。

除上述外, 漆酶也常用于土壤、河流等各种污染环境的生物修复中, 还在油漆制造业、家具和建筑业等行业甚至在文物修复上都有一定的应用前景(Mate & Alcalde 2015)。总的来说, 漆酶的工业应用主要是基于其绿色催化性能和催

化底物的广泛性所展开,后续研究也应围绕着优化其工业应用性能所进行。

## 5 展望

漆酶已然成为工业生产中不可或缺的绿色生物催化剂,真菌漆酶作为漆酶的主要来源,受到大量关注。游离真菌漆酶运用到工业生产中往往会存在不可重复利用、对催化环境要求高等问题,于是,固定化漆酶成为研究热点。将漆酶进行固定化后,其回收利用更加便捷,对催化环境的要求降低,更适宜应用到工业生产中。如今,除了传统的固定化酶技术,依赖于新型材料和技术的新型固定化酶技术也得到了广泛关注。另外,LMS的建立也能扩大漆酶的应用范围,该领域研究工作也在逐步推进。

就漆酶的固定化而言,固定化技术和固定化载体的不断推陈出新使得固定化酶的应用也变得更加繁杂,因此固定化酶技术数据库的建立迫在眉睫;鉴于技术和设备条件限制,许多新型固定化载体较难制备,因此,对于传统高分子材料在热稳定性、重复利用率等影响其应用到工业生产中的性能的优化还需继续深入探究;另外,对漆酶分子本身进行基因、化学水平的修饰从而提升其工业应用价值也是一种理想途径。

## [REFERENCES]

- Aggarwal S, Chakravarty A, Ikram S, 2021. A comprehensive review on incredible renewable carriers as promising platforms for enzyme immobilization and thereof strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167: 962-986
- Altinkaynak C, Tavlasoglu S, Özdemir N, Ocsoy I, 2016. A new generation approach in enzyme immobilization: organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. *Enzyme and Microbial Technology*, 93-94: 105-112
- Alvarado-Ramírez L, Rostro-Alanis M, Rodríguez-Rodríguez J, Castillo-Zacarias C, Sosa-Hernández JE, Barceló D, Iqbal HMN, Parra-Saldívar R, 2021. Exploring current tendencies in techniques and materials for immobilization of laccases—a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181: 683-696
- Alver E, Metin AÜ, 2017. Chitosan based metal-chelated copolymer nanoparticles: laccase immobilization and phenol degradation studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125: 235-242
- An Q, Si J, Dai YC, 2018. Effects of different induction media as inducers on laccase activities of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Mycosystema*, 37(3): 361-370 (in Chinese)
- An Q, Wu XJ, Wu B, Dai YC, 2015. Effects of carbon and nitrogen sources on lignocellulose decomposition enzyme activities in *Flammulina velutipes*. *Mycosystema*, 34(4): 761-771 (in Chinese)
- Ansari SA, Husain Q, 2012. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotechnology Advances*, 30(3): 512-523
- Arévalo P, Isasi J, Caballero AC, Marco JF, Martín-Hernández F, 2017. Magnetic and structural studies of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles synthesized *via* coprecipitation and dispersed in different surfactants. *Ceramics International*, 43: 10333-10340
- Arévalo-Cid P, Isasi J, Caballero AC, Martín-Hernández F, González-Rubio R, 2022. Effects of shell-thickness on the powder morphology, magnetic behavior and stability of the chitosan-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 61: 300-312
- Arica MY, Salih B, Celikbicak O, Bayramoglu G, 2017. Immobilization of laccase on the fibrous polymer-grafted film and study of textile dye degradation by MALDI-ToF-MS. *Chemical Engineering Research and Design*, 128: 107-119
- Azam F, Khan MA, Khan A, Ahmad S, Zofair SFF, Younus H, 2022. *In silico* and *in vitro* studies on the inhibition of laccase activity by ellagic acid: implications in drug designing for the treatment of cryptococcal infections. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209: 642-654
- Baldrian P, 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 215-242
- Bernal C, Illanes A, Wilson L, 2014. Heterofunctional hydrophilic-hydrophobic porous silica as support for multipoint covalent immobilization of lipases: application to lactulose palmitate synthesis. *Langmuir*, 30: 3557-3566
- Bertrand G, 1896. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Comptes Rendus Academie Science Paris*, 123: 463-465
- Bilal M, Noreen S, Asgher M, Parveen S, 2021. Development and characterization of cross-linked laccase aggregates

- (Lac-CLEAs) from *Trametes versicolor* IBL-04 as ecofriendly biocatalyst for degradation of dye-based environmental pollutants. *Environmental Technology & Innovation*, 21: 101364
- Bu X, 2018. Mechanism of high moisture absorption-retention of chitooligosaccharide modified by laccase/TEMPO system and its application. Master Thesis, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin. 1-61 (in Chinese)
- Cao SL, Yue DM, Li XH, Smith TJ, Li N, Zong MH, Wu H, Ma YZ, Lou WY, 2016. Novel nano-/micro-biocatalyst: soybean epoxide hydrolase immobilized on UiO-66-NH<sub>2</sub> MOF for efficient biosynthesis of enantiopure (*R*)-1,2-octanediol in deep eutectic solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4: 3586-3595
- Cao WJ, Yuan HS, 2016. Immobilization and dye degradation of laccase from *Lenzites betulina*. *Mycosystema*, 35(3): 343-354 (in Chinese)
- Chao YP, Qian SJ, 2001. Fungal laccase and its applications. *Progress in Biotechnology*, 21(5): 23-28 (in Chinese)
- Chen DD, Niu JZ, Yu XY, Yan JP, Chagan I, 2013. The factors affecting the expression and activity of laccase in fungi. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 25(11): 1053-1058 (in Chinese)
- Chen MY, Ni X, Si YB, Sun K, 2021. Advances in the application of immobilized fungal laccase for the bioremediation of environmental organic contamination. *Biotechnology Bulletin*, 37(6): 244-258 (in Chinese)
- Chen QH, Zhou YP, Bi FX, Cheng HZ, Tian CE, 2009. Screening for high-yield laccase-secreting fungal strains. *Journal of Guangzhou University (Natural Science Edition)*, 8(5): 53-57 (in Chinese)
- Chen ZW, Yang R, Li NJ, Lan Q, Liu J, 2021. Optimization of culture conditions for laccase production of *Phanerochaete chrysosporium* and efficiency of the laccase in Congo Red degradation. *Mycosystema*, 40(6): 1538-1548 (in Chinese)
- Dai YC, 2012. Polypore diversity in China with an annotated checklist of Chinese polypores. *Mycoscience*, 53: 49-80
- D'Annibale A, Stazi SR, Vinciguerra V, Sermanni GG, 2000. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology*, 77(2-3): 265-273
- Deng HM, Shao K, Liang JH, Chen YT, Yan GX, 2017. Source of laccase and research progress on carriers for laccase immobilization. *Biotechnology Bulletin*, 33(6): 10-15 (in Chinese)
- dos Santos JCS, Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R, 2015. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. *ChemCatChem*, 7(16): 2413-2432
- Fu MH, Xing JF, Ge ZQ, 2019. Preparation of laccase-loaded magnetic nanoflowers and their recycling for efficient degradation of bisphenol A. *Science of the Total Environment*, 651: 2857-2865
- Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, 2011. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advance Synthesis & Catalysis*, 353: 2885-2904
- Ge J, Lei JD, Zare RN, 2012. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nature Nanotechnology*, 7: 428-432
- Gianfreda L, Xu F, Bollag JM, 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3: 1-26
- Guo RG, Yu LM, Liu SF, Du ZW, Fu ZZ, 2018. Overview of physicochemical analysis methods for nanomaterials. *Analytical Instrumentation*, 6: 9-15 (in Chinese)
- Han L, Hou ZB, Zhang M, Hu YY, Jiang T, Li J, 2021. Progress in enzyme immobilization by magnetic nanocomposites. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 19(3): 241-249 (in Chinese)
- Han YY, Zhang XQ, Wang Q, Wei J, Liu JJ, Gao YH, 2021. Optimize the determination method of laccase with ABTS as substrate based on response surface method and its application. *Chemical Reagents*, 43(8): 1095-1101 (in Chinese)
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T, 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5): 1601-1606
- Hong SG, Kim BC, Na HB, Lee J, Youn J, Chung SW, Lee CW, Lee B, Kim HS, Hsiao E, Kim SH, Kim BG, Park HG, Chang HN, Hyeon T, Dordick JS, Grate JW, Kim J, 2017. Single enzyme nanoparticles armored by a thin silicate network: single enzyme caged nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 322: 510-515
- Hooks DO, Venning-Slater M, Du JP, Rehm BHA, 2014. Polyhydroxyalkanoate synthase fusions as a strategy for oriented enzyme immobilisation. *Molecules*, 19(6): 8629-8643
- Hu Y, Cai YJ, Liao XR, Ma WY, Li ZL, Zhang DB, 2011. Optimization of *Shiraia bambusicola* liquid-state fermentation for laccase production. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 30(5): 773-778 (in Chinese)
- Hu ZY, Qian L, Zhang ZJ, Zhang YN, 2019. Application progress of laccase in food industry and other fields. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 26(3): 83-86 (in Chinese)

- Jaiswal N, Pandey VP, Dwivedi UN, 2016. Immobilization of papaya laccase in chitosan led to improved multipronged stability and dye discoloration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86: 288-295
- Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B, 2014. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, 20: 801-821
- Jin R, Zhang FL, 2012. Structure and catalytic reaction mechanism of laccase. *Journal of Chinese Lacquer*, 31(4): 6-16 (in Chinese)
- Ke CX, Fan YL, Su F, Xu L, Yan YJ, 2018. Recent advances in enzyme immobilization. *Chinese Journal of Biotechnology*, 34(2): 188-203 (in Chinese)
- Kiani M, Mojtavavi S, Jafari-Nodoushan H, Tabib SR, Hassannejad N, Faramarzi MA, 2022. Fast anisotropic growth of the biomaterialized zinc phosphate nanocrystals for a facile and instant construction of laccase@Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> hybrid nanoflowers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 204: 520-531
- Li JK, Wang WL, Gui ZT, Zhu JZ, 2021. Application of laccase in dyeing and finishing. *Light and Textile Industry and Technology*, 9: 115-116, 120 (in Chinese)
- Li JX, Gao M, Tan L, Dai QZ, Ao TQ, Chen WQ, 2022. Adsorption treatment of wastewater by electrospun nanofiber membranes: a review. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 39(4): 1378-1394 (in Chinese)
- Li QY, Sun LY, Chang QF, Zhou YL, 2022. Synthesis and laccase immobilization of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@-mesoporous SiO<sub>2</sub> hollow microspheres. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 41(10): 5494-5500 (in Chinese)
- Li RZ, Liu SJ, Zhou XL, Liu H, Zhou HC, Wang CF, Liu YF, Zhang X, 2022. Efficient immobilization of catalase on mesoporous MIL-101 (Cr) and its catalytic activity assay. *Enzyme and Microbial Technology*, 156: 110005
- Li S, Liu Y, Tang WJ, Chen AN, Tang B, Cui FJ, Zhao PX, 2015. Isolation of a high-level laccase-producing fungus strain, and purification and characterization of laccase. *Food and Fermentation Industries*, 41(9): 45-50 (in Chinese)
- Li Z, Jiang S, Xie YN, Fang ZM, Xiao YZ, Fang W, Zhang XC, 2020. Mechanism of the salt activation of laccase Lac15. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 521(4): 997-1002
- Lin JH, Lai QJ, Liu YJ, Chen S, Le XY, Zhou XH, 2017. Laccase-methacryloyl functionalized magnetic particles: highly immobilized, reusable, and efficacious for methyl red decolorization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 144-152
- Liu DM, Dong C, 2020. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. *Process Biochemistry*, 92: 464-475
- Liu JX, Shen XT, Zheng ZY, Li MJ, Zhu XS, Cao H, Cui CX, 2020. Immobilization of laccase by 3D bioprinting and its application in the biodegradation of phenolic compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164: 518-525
- Liu JY, Tang HP, Cai YJ, Liao XR, 2015. Synthesis of melanin with catechin and catechol by laccase. *Dyestuffs and Coloration*, 52(2): 4-9 (in Chinese)
- Liu QZ, Sun K, Si YB, 2021. Prospects and applications of fungal laccase-mediated the radical coupling and grafting processes in green chemosynthesis. *Environmental Chemistry*, 40(3): 914-927 (in Chinese)
- Liu R, Jiao CJ, Yang LJ, Zhao FY, 2021. Advances of enzyme immobilization. *Journal of Food Safety and Quality*, 12(5): 1861-1869 (in Chinese)
- Liu ZC, Wang GG, 2013. Fungal laccases: structure-based function and mechanism. *Acta Biophysica Sinica*, 29(9): 629-645 (in Chinese)
- Lou HW, Yang CM, Zhao Y, Niu YW, Tian SQ, Zhao RY, 2023. Screening of edible fungi capable of secreting laccase and advances in research on degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by laccase from edible fungi. *Food Science*, 44(1): 392-403 (in Chinese)
- Lu JW, Nie MF, Li YR, Zhu HL, Shi GY, 2022. Design of composite nanosupports and applications thereof in enzyme immobilization: a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 217: 112602
- Luo S, Xie T, Liu ZC, Wang GG, 2015. Laccase-mediator system: a review. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 21(6): 987-995 (in Chinese)
- Ma HF, Meng G, Cui BK, Si J, Dai YC, 2018a. Chitosan crosslinked with genipin as supporting matrix for biodegradation of synthetic dyes: laccase immobilization and characterization. *Chemical Engineering Research and Design*, 132: 664-676
- Ma JY, Bashir MA, Pan JT, Qiu L, Liu HB, Zhai LM, Rehim A, 2018b. Enhancing performance and stability of anaerobic digestion of chicken manure using thermally modified bentonite. *Journal of Cleaner Production*, 183: 11-19
- Ma N, Xie WL, 2007. Preparation and application of magnetic microsphere immobilized enzyme. *Modern Chemical Industry*, 27: 364-369 (in Chinese)
- Mate DM, Alcalde M, 2015. Laccase engineering: from rational design to directed evolution. *Biotechnology Advances*, 33(1): 25-40

- Miao KP, Yan L, Ma PC, Ma XY, 2021. Research progress of enzymatic biofuel cell. Chinese Journal of Power Sources, 45(3): 406-409, 423 (in Chinese)
- Mohammadi M, As'habi MA, Salehi P, Yousefi M, Nazari M, Brask J, 2018. Immobilization of laccase on epoxy-functionalized silica and its application in biodegradation of phenolic compounds. International Journal of Biological Macromolecules, 109: 443-447
- Mohtar LG, Aranda P, Messina GA, Nazareno MA, Pereira SV, Raba J, Bertolino FA, 2019. Amperometric biosensor based on laccase immobilized onto a nanostructured screen-printed electrode for determination of polyphenols in propolis. Microchemical Journal, 144: 13-18
- Molina MA, Díez-Jaén J, Sánchez-Sánchez M, Blanco RM, 2022. One-pot laccase@MOF biocatalysts efficiently remove bisphenol A from water. Catalysis Today, 390-391: 265-271
- Mulinari J, Oliveira JV, Hotza D, 2020. Lipase immobilization on ceramic supports: an overview on techniques and materials. Biotechnology Advances, 42: 107581
- Nguyen HH, Kim M, 2017. An overview of techniques in enzyme immobilization. Applied Science and Convergence Technology, 26(6): 157-163
- Niladevi KN, Sukumaran RK, Jacob N, Anisha GS, Prema P, 2009. Optimization of laccase production from a novel strain *Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. Microbiological Research, 164: 105-113
- Peng YC, Cao FX, Dong XJ, Peng JQ, 2013. Research progress on fermentation production and application of laccase. Northern Horticulture, 24: 206-210 (in Chinese)
- Piscitelli A, Giardina P, Lettera V, Pezzella C, Sannia G, Faraco V, 2011. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. Current Genomics, 12(2): 104-112
- Pose-Boirazian T, Martínez-Costas J, Eibes G, 2022. 3D Printing: an emerging technology for biocatalyst immobilization. Macromolecular Bioscience, 22(9): 2200110
- Primožič M, Kravanja G, Knez Ž, Crnjac A, Leitgeb M, 2020. Immobilized laccase in the form of (magnetic) cross-linked enzyme aggregates for sustainable diclofenac (bio) degradation. Journal of Cleaner Production, 275: 124121
- Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Delgado-Boada JM, 2013. Fungal laccases. Fungal Biology Reviews, 27(3-4): 67-82
- Rodgers CJ, Blanford CF, Giddens SR, Skamnioti P, Armstrong FA, Gurr SJ, 2010. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? Trends in Biotechnology, 28(2): 63-72
- Rodríguez Couto S, Toca Herrera JL, 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnology Advances, 24(5): 500-513
- Rodríguez-Restrepo YA, Orrego CE, 2020. Immobilization of enzymes and cells on lignocellulosic materials. Environmental Chemistry Letters, 18: 787-806
- Sadeghzadeh S, Nejad ZG, Ghasemi S, Khafaji M, Borghei SM, 2020. Removal of bisphenol A in aqueous solution using magnetic cross-linked laccase aggregates from *Trametes hirsuta*. Bioresource Technology, 306: 123169
- Sheldon RA, van Pelt S, 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chemical Society Reviews, 42: 6223-6235
- Shin SK, Hyeon JE, Joo YC, Jeong DW, You SK, Han SO, 2019. Effective melanin degradation by a synergistic laccase-peroxidase enzyme complex for skin whitening and other practical applications. International Journal of Biological Macromolecules, 129: 181-186
- Si J, Cui BK, He S, Dai YC, 2011a. Optimization of conditions for laccase production by *Perenniporia subacida* and its application in dye decolorization. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 17(5): 736-741 (in Chinese)
- Si J, Li W, Cui BK, Dai YC, 2011b. Advances of research on characteristic, molecular biology and applications of laccase from fungi. Biotechnology Bulletin, 2: 48-55 (in Chinese)
- Si J, Ma HF, Cao YJ, Cui BK, Dai YC, 2021a. Introducing a thermo-alkali-stable, metallic ion-tolerant laccase purified from white rot fungus *Trametes hirsuta*. Frontiers in Microbiology, 12: 670163
- Si J, Peng F, Cui BK, 2013. Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. Bioresource Technology, 128: 49-57
- Si J, Wu Y, Ma HF, Cao YJ, Sun YF, Cui BK, 2021b. Selection of a pH- and temperature-stable laccase from *Ganoderma australe* and its application for bioremediation of textile dyes. Journal of Environmental Management, 299: 113619
- Smith AT, LaChance AM, Zeng SS, Liu B, Sun LY, 2019. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. Nano Materials Science, 1: 31-47
- Sun R, Liu JM, Ren M, Zhang L, 2020. Isolation of laccase-producing strains and optimization of production condition. Biotechnology, 30(3): 280-284 (in Chinese)

- Taheran M, Naghdi M, Brar SK, Knystautas EJ, Verma M, Surampalli RY, 2017. Degradation of chlortetracycline using immobilized laccase on polyacrylonitrile-biochar composite nanofibrous membrane. *Science of the Total Environment*, 605-606: 315-321
- Talekar S, Ghodake V, Ghotage T, Rathod P, Deshmukh P, Nadar S, Mulla M, Ladole M, 2012. Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase. *Bioresource Technology*, 123: 542-547
- Tang XY, Xia Y, Yang BB, Xia LM, 2020. Efficient degradation of oxytetracycline using a laccase-natural mediator system. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 34(3): 737-741 (in Chinese)
- Tang YF, Li LM, Li JQ, 2022. Introduction to ferric oxide nanoparticles preparation methods and utilization status. *Anhui Chemical Industry*, 48(1): 14-16 (in Chinese)
- Wang H, Tang LX, Ma HF, Qian K, Si J, Cui BK, 2021. Immobilization of laccase from *Trametes orientalis* and its application for decolorization of multifarious dyes. *Biotechnology Bulletin*, 37(11): 142-157 (in Chinese)
- Wang MY, Luo L, Fu LH, Yang H, 2019. Ion responsiveness of polyacrylamide/sodium alginate (PAM/SA) shape memory hydrogel. *Soft Materials*, 17(4): 418-426
- Wang P, Fan XR, Cui L, Wang Q, Zhou AH, 2008. Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blent with PEG. *Journal of Environmental Science*, 20(2): 1519-1522
- Wang Y, Zhang X, Lu CS, Li XP, Zhou JQ, Wang JW, 2022. Lanthanum: a novel inducer for enhancement of fungal laccase production by *Shiraia bambusicola*. *Journal of Rare Earths*, 40: 508-516
- Wang ZB, Ren DJ, Yu HY, Jiang S, Zhang SQ, Zhang XQ, 2020. Study on improving the stability of adsorption-encapsulation immobilized laccase@ZIF-67. *Biotechnology Reports*, 28: e00553
- Wei SH, Tang ZX, Zhang W, Guo LH, 2021. Immobilized laccase by transglutaminase and its application in apple juice clarification. *Food and Fermentation Industries*, 47(21): 185-190 (in Chinese)
- Wei YL, Dai YC, 2004. Ecological function of wood-inhabiting fungi in forest ecosystem. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 15(10): 1935-1938 (in Chinese)
- Weltz JS, Kienle DF, Schwartz DK, Kaar JL, 2020. Reduced enzyme dynamics upon multipoint covalent immobilization leads to stability-activity trade-off. *Journal of the American Chemical Society*, 142(7): 3463-3471
- Wen XF, Zeng ZT, Du CY, Huang DL, Zeng GM, Xiao R, Lai C, Xu P, Zhang C, Wan J, Hu L, Yin LS, Zhou CY, Deng R, 2019. Immobilized laccase on bentonite-derived mesoporous materials for removal of tetracycline. *Chemosphere*, 222: 865-871
- Wong DWS, 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157: 174-209
- Wu Y, Ma HF, Cao YJ, Si J, Cui BK, 2019. Advances on properties, production, purification and immobilization of fungal laccase. *Biotechnology Bulletin*, 35(9): 1-10 (in Chinese)
- Xu CY, Jia CB, Guo Y, Yang F, Su JY, 2021. Isolation, identification and growth characteristics analysis of a laccase producing fungus from the arid soil. *Genomics and Applied Biology*, 40(3): 1163-1170 (in Chinese)
- Xu R, Cui JY, Tang RZ, Li FT, Zhang BR, 2017. Removal of 2,4,6-trichlorophenol by laccase immobilized on nano-copper incorporated electrospun fibrous membrane-high efficiency, stability and reusability. *Chemical Engineering Journal*, 326: 647-655
- Xu XY, Pose-Boirazian T, Eibes G, McCoubrey LE, Martínez-Costas J, Gaisford S, Goyanes A, Basit AW, 2022. A customizable 3D printed device for enzymatic removal of drugs in water. *Water Research*, 208: 117861
- Yang J, Lin YH, Yang XD, Ng TB, Ye XY, Lin J, 2017. Degradation of tetracycline by immobilized laccase and the proposed transformation pathway. *Journal of Hazardous Materials*, 322: 525-531
- Yang JM, Zhang XM, Xing ZT, Chen MJ, Cao H, Tan Q, Pan YJ, 2005. Purification and properties of laccase produced by *Auricularia polytricha*. *Mycosystema*, 24(1): 61-70 (in Chinese)
- Yoshida H, 1883. Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the chemical society of Tokio. *Journal of the Chemical Society*, 43: 472-486
- Yuan HS, Dai YC, Cao Y, Yang J, 2010. Screening of white-rot fungi for decolorizing synthetic dyes and investigation on factors affecting decolorizing capacity of *Cerrena unicolor*. *Mycosystema*, 29(3): 429-436 (in Chinese)
- Yuan HS, Dai YC, Steffen K, 2012. Screening and evaluation of white rot fungi to decolourise synthetic dyes, with particular reference to *Antrodia albocinnamomea*. *Mycology*, 3(2): 100-108
- Zdarta J, Jankowska K, Bachosz K, Kijeńska-Gawrońska E, Zgoła-Grześkowiak A, Kaczorek E, Jesionowski T, 2020. A promising laccase immobilization using electrospun materials for biocatalytic degradation of tetracycline: effect of process conditions and catalytic pathways. *Catalysis Today*, 348: 127-136
- Zhang BL, Li PT, Zhang HP, Wang H, Li XJ, Tian L, Ali N,

- Ali Z, Zhang QY, 2016. Preparation of lipase/ $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$  hybrid nanoflower and its catalytic performance as an immobilized enzyme. *Chemical Engineering Journal*, 291: 287-297
- Zhang H, Sun FJ, Meng CX, Geng AL, Gao ZQ, 2022. The synergism of manganese peroxidase and laccase from *Cerrena unicolor* BBP6 in denim dye decolorization and the construction of gene co-expression system in *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*, 177: 108230
- Zhang P, Fang XN, Yan GQ, Gao MX, Zhang XM, 2017. Highly efficient enrichment of low-abundance intact proteins by core-shell structured  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -chitosan@graphene composites. *Talanta*, 174: 845-852
- Zhang WZ, Li WX, 2003. Summary on the research of nanometer materials. *Journal of Hubei Agricultural College*, 23(5): 397-400 (in Chinese)
- Zhang ZX, Liu HY, Xing H, Ma Y, 2017. Research progress on substrate species degraded by laccase. *Biotechnology Bulletin*, 33(10): 97-102 (in Chinese)
- Zheng F, An Q, Meng G, Wu XJ, Dai YC, Si J, Cui BK, 2017. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: purification, characterization, and application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 758-770
- Zheng F, Cui BK, Wu XJ, Meng G, Liu HX, Si J, 2016. Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110: 69-78
- Zheng F, Meng G, An Q, Wu XJ, Si J, Liu HX, 2017. Physiological studies on laccase-producing process of white rot fungus *Trametes orientalis* incubated with two kinds of liquid media. *Mycosystema*, 36(5): 582-597 (in Chinese)
- Zhong ZW, Pang SL, Wu YW, Jiang S, Ouyang J, 2017. Synthesis and characterization of mesoporous Cu-MOF for laccase immobilization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(7): 1841-1847
- Zhou WT, Zhang WX, Cai YP, 2022. Enzyme-enhanced adsorption of laccase immobilized graphene oxide for micro-pollutant removal. *Separation and Purification Technology*, 294: 121178
- Zhu QP, Song JJ, Liu ZF, Wu KL, Li XZ, Chen ZM, Pang H, 2022. Photothermal catalytic degradation of textile dyes by laccase immobilized on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ $\text{SiO}_2$  nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 623: 992-1001
- Zhuo R, Yuan P, Yang Y, Zhang S, Ma FY, Zhang XY, 2017. Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. *Biochemical Engineering Journal*, 117: 62-72
- [附中文参考文献]
- 安琪, 司静, 戴玉成, 2018. 不同诱导培养基对糙皮侧耳液体发酵产漆酶活性的影响. *菌物学报*, 37(3): 361-370
- 安琪, 吴雪君, 吴冰, 戴玉成, 2015. 不同碳源和氮源对金针菇降解木质纤维素酶活性的影响. *菌物学报*, 34(4): 761-771
- 卜鑫, 2018. 漆酶/TEMPO 体系改性壳寡糖的高吸湿保湿机理研究及其应用. 天津科技大学硕士论文, 天津. 1-61
- 曹文娟, 袁海生, 2016. 桦褶孔菌漆酶固定化及其对染料的降解. *菌物学报*, 35(3): 343-354
- 钞亚鹏, 钱世钧, 2001. 真菌漆酶及其应用. *生物工程进展*, 21(5): 23-28
- 陈带娣, 牛杰振, 余晓媛, 严金平, 伊日布斯, 2013. 影响真菌漆酶表达及其活性的因素. *生命科学*, 25(11): 1053-1058
- 陈明雨, 倪烜, 司友斌, 孙凯, 2021. 固定化真菌漆酶在环境有机污染修复中的应用研究进展. *生物技术通报*, 37(6): 244-258
- 陈琼华, 周玉萍, 毕凡星, 程惠贞, 田长恩, 2009. 真菌漆酶高产菌株的筛选. *广州大学学报(自然科学版)*, 8(5): 53-57
- 陈中维, 杨锐, 李宁杰, 兰琪, 刘洁, 2021. 黄孢原毛平革菌产漆酶优化培养及其对刚果红的脱色降解. *菌物学报*, 40(6): 1538-1548
- 邓寒梅, 邵可, 梁家豪, 陈烨同, 阎光绪, 2017. 漆酶的来源及固定化漆酶载体研究进展. *生物技术通报*, 33(6): 10-15
- 郭荣贵, 于丽敏, 刘淑凤, 杜志伟, 傅钟臻, 2018. 纳米材料理化性能分析方法综述. *分析仪器*, 6: 9-15
- 韩林, 侯忠毕, 张敏, 胡月月, 姜涛, 李健, 2021. 磁性纳米复合材料固定化酶的研究进展. *生物加工过程*, 19(3): 241-249
- 韩月颖, 张喜庆, 王琦, 魏菁, 刘继军, 高云航, 2021. 基于响应面法优化以 ABTS 为底物的漆酶测定方法及其应用. *化学试剂*, 43(8): 1095-1101
- 胡艳, 蔡宇杰, 廖祥儒, 马文寅, 李枝玲, 张大兵, 2011. 竹黄菌液态发酵产漆酶培养条件的优化. *食品与生物技术学报*, 30(5): 773-778
- 胡周月, 钱磊, 张志军, 张业尼, 2019. 漆酶在食品工业及其他领域上的应用进展. *天津农学院学报*, 26(3): 83-86
- 靳蓉, 张飞龙, 2012. 漆酶的结构与催化反应机理. *中国生漆*, 31(4): 6-16
- 柯彩霞, 范艳利, 苏枫, 徐莉, 闫云君, 2018. 酶的固定



- 化技术最新研究进展. 生物工程学报, 34(2): 188-203
- 李佳欣, 高铭, 谭淋, 戴启洲, 敖天其, 陈文清, 2022. 静电纺丝纳米纤维膜材料吸附处理废水中污染物的研究进展. 复合材料学报, 39(4): 1378-1394
- 李建康, 王文利, 桂正涛, 朱俊志, 2021. 漆酶在染整加工中的应用. 轻纺工业与技术, 9: 115-116, 120
- 李群艳, 孙路瑶, 常其飞, 周运炉, 2022. 磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ @介孔  $\text{SiO}_2$  空心微球的制备及漆酶固定化. 化工进展, 41(10): 5494-5500
- 李松, 刘宇, 汤文晶, 陈阿娜, 汤斌, 崔凤杰, 赵鹏翔, 2015. 1株真菌漆酶高产菌株的筛选及其漆酶的纯化和性质研究. 食品与发酵工业, 41(9): 45-50
- 刘家扬, 唐红萍, 蔡宇杰, 廖祥儒, 2015. 漆酶催化儿茶素及儿茶酚合成黑色素的研究. 染料与染色, 52(2): 4-9
- 刘庆竹, 孙凯, 司友斌, 2021. 真菌漆酶介导自由基偶联和接枝反应在绿色化学中的应用. 环境化学, 40(3): 914-927
- 刘茹, 焦成瑾, 杨玲娟, 赵菲佚, 2021. 酶固定化研究进展. 食品安全质量检测学报, 12(5): 1861-1869
- 刘忠川, 王刚刚, 2013. 真菌漆酶结构与功能研究进展. 生物物理学报, 29(9): 629-645
- 娄海伟, 杨创明, 赵玉, 牛永武, 田双起, 赵仁勇, 2023. 产漆酶食用菌的筛选及食用菌漆酶降解黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  的研究进展. 食品科学, 44(1): 392-403
- 罗爽, 谢天, 刘忠川, 王刚刚, 2015. 漆酶/介体系统研究进展. 应用与环境生物学报, 21(6): 987-995
- 马宁, 谢文磊, 2007. 磁性高分子微球固定化酶的制备及应用. 现代化工, 27: 364-369
- 苗昆鹏, 闫龙, 马鹏程, 马晓燕, 2021. 酶生物燃料电池的研究进展. 电源技术, 45(3): 406-409, 423
- 彭滢钊, 曹福祥, 董旭杰, 彭继庆, 2013. 漆酶的发酵生产及其应用研究进展. 北方园艺, 24: 206-210
- 司静, 崔宝凯, 贺帅, 戴玉成, 2011a. 微酸多年卧孔菌产漆酶条件优化及其在染料脱色中的应用. 应用与环境生物学报, 17(5): 736-741
- 司静, 李伟, 崔宝凯, 戴玉成, 2011b. 真菌漆酶性质、分子生物学及其应用研究进展. 生物技术通报, 2: 48-55
- 孙荣, 刘建民, 任明, 张雷, 2020. 产漆酶菌株分离及发酵条件优化. 生物技术, 30(3): 280-284
- 汤星阳, 夏颖, 杨彬彬, 夏黎明, 2020. 利用漆酶-天然介体系统高效降解土霉素. 高校化学工程学报, 34(3): 737-741
- 汤宇峰, 李丽敏, 李嘉琪, 2022. 浅谈四氧化三铁纳米粒子的制备方法与利用现状. 安徽化工, 48(1): 14-16
- 王豪, 唐禄鑫, 马鸿飞, 钱坤, 司静, 崔宝凯, 2021. 东方栓孔菌漆酶的固定化及其对不同类型染料的脱色作用. 生物技术通报, 37(11): 142-157
- 魏胜华, 汤中勋, 张威, 郭良昊, 2021. 转谷氨酰胺酶为交联剂固定化漆酶及其在苹果汁澄清中的应用. 食品与发酵工业, 47(21): 185-190
- 魏玉莲, 戴玉成, 2004. 木材腐朽菌在森林生态系统中的功能. 应用生态学报, 15(10): 1935-1938
- 吴怡, 马鸿飞, 曹永佳, 司静, 崔宝凯, 2019. 真菌漆酶的性质、生产、纯化及固定化研究进展. 生物技术通报, 35(9): 1-10
- 徐春燕, 贾晨波, 郭洋, 杨飞, 苏建宇, 2021. 干旱土壤中产漆酶真菌的分离、鉴定与生长特性分析. 基因组学与应用生物学, 40(3): 1163-1170
- 杨建明, 张小敏, 邢增涛, 陈明杰, 曹晖, 谭琦, 潘迎捷, 2005. 毛木耳漆酶纯化及其部分漆酶特性的研究. 菌物学报, 24(1): 61-70
- 袁海生, 戴玉成, 曹云, 杨建, 2010. 白腐真菌染料脱色菌株的筛选及一色齿毛菌脱色条件的研究. 菌物学报, 29(3): 429-436
- 张万忠, 李万雄, 2003. 纳米材料研究综述. 湖北农学院学报, 23(5): 397-400
- 张泽雄, 刘红艳, 邢贺, 马钰, 2017. 漆酶可降解底物种类的研究进展. 生物技术通报, 33(10): 97-102
- 郑飞, 孟歌, 安琪, 吴雪君, 司静, 刘红霞, 2017. 白腐真菌东方栓孔菌在两种液体培养基中产漆酶过程的生理学研究. 菌物学报, 36(5): 582-597