

# 樟芝固态发酵生产 *Antroquinonol* 及萃取 *Antroquinonol* 的研究

喻学淳,夏永军,张欢,许赣荣\*,张薄博

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏无锡 214122)

**摘要:** 安多奎诺尔(*Antroquinonol*)具有很好的抗癌效果。为了提高樟芝固态发酵中 *Antroquinonol* 的产量及其萃取效率,为其工业化生产提供理论参考,本文考察了谷物种类、装料量、初始含水量、外加碳源、氮源含量对樟芝固态发酵产 *Antroquinonol* 的影响,并进行了多级逆流浸提方法萃取樟芝固态发酵产品中 *Antroquinonol* 的实验。结果表明:优化后的条件为:在 1L 三角瓶中,大米装料量为 110g,初始含水量为 50%,外加碳源为 2.0g 葡萄糖,氮源添加量为 0.3g 大豆粉。固态发酵中 *Antroquinonol* 产量提高了 14.44%;用体积分数为 95% 的乙醇作萃取剂(乙醇与萃取物料比例为 10:1, v/w),以 50℃ 水浴振荡萃取 1h 为浸提条件进行三级逆流浸提,浸提萃取后残渣中的 *Antroquinonol* 残留率小于 1%。该法具有溶剂使用量少,萃取效率高的优点。

**关键词:** 多级逆流萃取,樟芝,固态发酵,优化,*Antroquinonol*

## Research of *A. camphorata* solid-state fermentation production *Antroquinonol* and extraction *Antroquinonol*

YU Xue-chun, XIA Yong-jun, ZHANG Huan, XU Gan-rong\*, ZHANG Bo-bo

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School  
of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** *Antroquinonol*, a metabolite produced from solid-state fermentation of *Antrodia camphorata* has been shown great anti-cancer effect. This study investigated the effects of a number of factors including fermented grain types, substrate capacity, initial moisture content (containing the water of seeds), supplementary carbon source (glucose), nitrogen content on *Antroquinonol* content by *Antrodia cinnamomea* and the multi-stage countercurrent extraction method for extracting *Antroquinonol* from the solid-state fermentation products of *Antrodia camphorata* in order to improve the production of *Antroquinonol* in solid-state fermentation, the extraction efficiency, decrease loss and provide theoretical basis for preparation of *Antroquinonol* at industry scale. The results were as follows: the best compositions of fermentation medium for *Antroquinonol* content were as follows: rice 110g, initial moisture content 50% (with inoculated seed liquid water), carbon source 2.0g (glucose), nitrogen content 0.3g (soybean powder). With these optimum conditions, *Antroquinonol* content increased by 14.44% than the initial value; After three-stage countercurrent extraction by 95% ethanol (volume ratio of ethanol and fermentation product was 10:1, v/w) in 50℃ water bath and shaking for 1h, the results showed that the residual rate of *Antroquinonol* in the fermentation products was less than 1%. This method showed the less solvent used and higher extraction efficiency.

**Key words:** multistage countercurrent extraction; *Antrodia camphorata*; solid-state fermentation; optimization; *Antroquinonol*

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)05-0164-05

樟芝 (*Antrodia Camphorata*), 又名牛樟芝、牛樟菇、红樟菇等, 有“灵芝之王”、“森林红宝石”之称。野生樟芝只生长在台湾本土的牛樟树 (*Cinnamomum kanehirae*) 上, 通常腐生于上百年的树干空洞内, 野生樟芝子实体具有浓郁的樟香气味<sup>[1]</sup>。樟芝子实体作为传统药物, 被台湾土著居民用作治疗疾病的良药。

近年来, 众多研究表明, 已确定樟芝产品具有保肝、抗肿瘤、抗氧化、调节免疫、解毒、抗炎等功效<sup>[2]</sup>。樟芝子实体具有的这些功效与其含有的众多活性成分有关, 其主要活性成分是多种三萜类化合物<sup>[3-6]</sup>、活性多糖、马来酸和琥珀酸衍生物、泛醌类化合物等<sup>[7-9]</sup>。*Antroquinonol* 属于泛醌类化合物, 具有显著的抗癌活性, 并且, 它对于肝癌细胞与正常细胞有选择性<sup>[10]</sup>, 目前已进入 FDA 二期临床实验, 是具有优良前景的抗癌化合物。由于牛樟树是台湾特有的珍稀树种, 野生樟芝子实体的产量极度匮乏, 因此市售

收稿日期: 2012-08-20 \* 通讯联系人

作者简介: 喻学淳 (1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事进行固态发酵及其生产工艺的研究。

表1 培养基优化实验设计  
Table 1 The experimental design of medium optimization

| 优化因素      | 实验优化设计  |
|-----------|---|
| 发酵基质      | 选择大米、薏米仁、高粱等5种谷物原料作为樟芝固态发酵的基质进行研究   |
| 装料量       | 在1L三角瓶中分别以80、90、100、110、120g大米作为发酵基质  |
| 初始含水量     | 在以前实验的基础上选取了四个初始含水量水平:46%、50%、54%、58%   |
| 外加碳源(葡萄糖) | 考察了添加0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5g葡萄糖/L三角瓶对樟芝固态发酵产 <i>Antroquinonol</i> 的影响          |
| 氮源含量      | 根据已有的实验经验,本次实验分别考察了添加0、0.1、0.2、0.3、0.4g大豆粉/L对樟芝固态发酵产 <i>Antroquinonol</i> 的影响 |

樟芝主要来源于人工培养,目前的人工培养方式主要有椴木培养法、固态培养法和液态培养法。椴木培养法仍然受到牛樟树稀有性的限制,液态培养法得到的樟芝产品中的产物活性成分与野生樟芝差别极大,几乎不含 *Antroquinonol*,固态培养可模拟樟芝野生环境且不受牛樟树稀有性的限制,其代谢产物种类更接近于樟芝子实体。但目前国内外对固态发酵培养樟芝的研究比较少,对 *Antroquinonol* 的研究都集中在其药理活性上面,除了 Lee 等<sup>[9]</sup>首次鉴定出 *Antroquinonol* 的研究中,提到用过固态发酵法培养樟芝并用正己烷的方法萃取 *Antroquinonol* 以外,专门针对 *Antroquinonol* 的固态发酵工艺及提取方法的研究几乎没有。本文通过培养基的优化达到提高樟芝固态发酵中 *Antroquinonol* 含量的目的,并通过理论计算、模拟实验,确定了合适的樟芝固态发酵产品中 *Antroquinonol* 合适的萃取工艺条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

樟芝菌 上海福茂食品有限公司提供;种子液培养基 种子液培养基成分如文献<sup>[11]</sup>所示;原固态培养基(1L三角瓶) 谷物原料 100g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.04g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.025g,  $\text{MgSO}_4$  0.025g, 初始含水量 50% (g水/g干基),接种量 30% (mL/g干基), 28℃培养;萃取原料 实验室发酵产品;乙醇 体积分数为95%, 国产;乙腈 色谱级,德国 Meker 公司等。

DKZ-2型电热恒温振荡水槽 上海福玛实验设备有限公司;PL602-S电子天平 梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;SPX-250B-Z型生化培养箱 上海迅博实业有限公司医疗设备厂;SHB-III A循环水式多用真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司;高效液相色谱仪 配有 SPD-10AVP 检测器,日本岛津公司;Sepax Amethyst  $\text{C}_{18}$ 柱(4.6mm × 250mm) 美国赛分公司等。

### 1.2 实验方法

1.2.1 种子液培养方法 种子液培养方法如文献<sup>[11]</sup>所示。

1.2.2 分析检测方法 樟芝产品中的 *Antroquinonol* 的 HPLC 分析方法如文献<sup>[12]</sup>所示。

1.2.3 培养基优化方法 樟芝固态发酵中各因素的优化实验设计如表1所示。其中,初始含水量包括接种种子液含水、大米含水以及添加水。按式1计算:

初始含水量(%) = [添加水(g) + 种子液(g) + 谷物基质含水(g)] / [添加水(g) + 种子液(g) + 谷

物基质质量(g)] × 100 式(1)

1.2.4 固态发酵产物中 *Antroquinonol* 的萃取方法 本实验室最初采用简单接触流程法,该方法各项参数为:体积分数为95%的乙醇与樟芝固态发酵产品的比例为60:1, 50℃水浴振荡萃取1.5h。然而该方法存在着三个方面的缺点:溶剂消耗量大;萃取时间长;产品中的 *Antroquinonol* 萃取不完全。因此,本次实验中考虑采用多级逆流萃取代替简单接触流程法。通过实验经验以及相关公式的计算<sup>[13-14]</sup>,设计逆流萃取的萃取条件为:乙醇与萃取物料比例为10:1(v/w),在水浴温度50℃,振荡萃取1h条件下进行三级逆流萃取。预期 *Antroquinonol* 的残留率小于1%。实验建立的三级逆流萃取过程如图1所示。根据浸提模型<sup>[14]</sup>可知,从萃取级数三中得到的第三级萃取液中 *Antroquinonol* 的含量和残渣中 *Antroquinonol* 含量的相同。所以,通过标准曲线将第三级萃取液中的 *Antroquinonol* 含量换算成相应质量固态发酵产品中 *Antroquinonol* 含量,此含量即为残渣中的 *Antroquinonol* 含量,可用来计算 *Antroquinonol* 残留率。 *Antroquinonol* 残留率的计算公式如式(2)

$$\text{Antroquinonol 残留率}(\%) = \frac{\text{残渣中 Antroquinonol 含量}}{430.196} \times 100$$
 式(2)

数据 430.196 (mg/kg) 表示样品中 *Antroquinonol* 总含量。数据来源如下:在料液比 1:60 (m/v), 50℃水浴振荡 1.5 h 的单级萃取条件下,将一份样品反复用新的萃取液萃取,直至萃取液中检测不出 *Antroquinonol*。通过计算求各萃取液中的 *Antroquinonol* 含量之和,并换算成相应质量固态发酵产品中 *Antroquinonol* 含量,既得样品中 *Antroquinonol* 总含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固态发酵培养基的优化实验

2.1.1 发酵基质对樟芝固态发酵产 *Antroquinonol* 的影响 固态发酵中,一方面发酵基质作为菌体生长的附着物,起着支撑发酵物的作用,影响发酵体系中的传质、传热;另一方面发酵基质作为主要营养物质,为发酵提供主要碳源及复杂的生长因子,影响着微生物的生长、代谢。因此,发酵基质的选择对樟芝固态发酵有着重要的影响。

如图2所示,以5种谷物原料为发酵基质进行樟芝固态发酵,发酵干基中 *Antroquinonol* 含量依次为:大米 > 糯米 > 小米 > 高粱 > 薏米仁。明显,高粱和薏米仁不适合作为樟芝固态发酵的基质。虽然小米

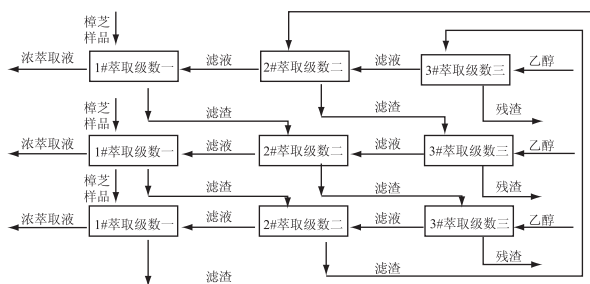


图1 樟芝固态发酵产品中 Antroquinonol 的三级逆流萃取过程

Fig.1 The three-stage countercurrent extraction process of Antroquinonol in the solid-state fermentation products of *A.camphorata*

适合用于樟芝固态发酵产三萜类化合物<sup>[11]</sup>,但并不适合作为产 Antroquinonol 的固态发酵基质。糯米作为发酵基质所得到的发酵干基中 Antroquinonol 含量不低,但由于其粘度较大,不利于接种操作。而当大米作为发酵基质时,其发酵干基中 Antroquinonol 的含量最高,达到 608.93mg/kg。并且大米来源广泛,价格低廉,所以大米是樟芝固态发酵产 Antroquinonol 的最佳发酵基质。以下实验均采用大米作为发酵基质。

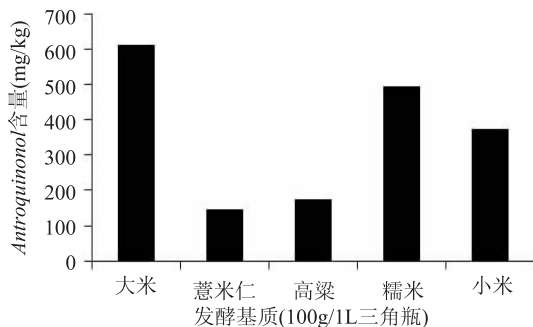


图2 发酵基质种类对樟芝固态发酵产 Antroquinonol 的影响  
Fig.2 The effect of fermented grain types on Antroquinonol content by *A.camphorata* in solid-state fermentation

2.1.2 装料量对樟芝固态发酵产 Antroquinonol 的影响 樟芝固态发酵采用 1L 三角瓶作为发酵容器,由于发酵空间有限,发酵基质的装料量对固态发酵过程中的传质、传热有着重要的影响。如果发酵基质装料量过多,发酵培养基太厚,会导致传热困难,培养基中心温度过高,且氧的传质也会受到阻碍,这些因素都不利于菌体的生长及代谢产物的合成。

如图 3 所示,装料量为 110g/L 时,干基中 Antroquinonol 的含量最高,为 635.31mg/kg。当装料量增大到 120g/L 时,干基中 Antroquinonol 含量下降了 40.66%。当装料量小于 110g/L 时,干基中 Antroquinonol 含量基本上随装料量的增加而升高。说明装料量过大或者过小都不利于 Antroquinonol 的合成。所以选择 110g/L 作为发酵基质的装料量,以下实验中装料量均采用此标准。

2.1.3 初始含水量对樟芝固态发酵产 Antroquinonol 的影响 固态发酵基质中的含水量对基质的物理特性有着重要的影响<sup>[15-16]</sup>。含水量过高,会使谷物基质

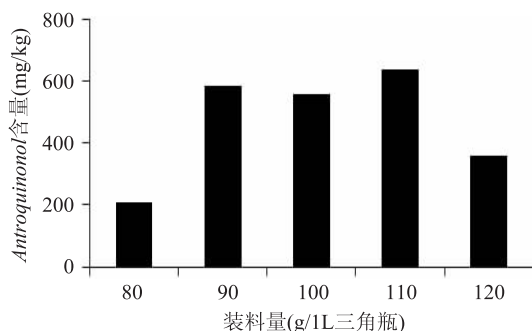


图3 发酵基质装料量对樟芝固态发酵产 Antroquinonol 的影响

Fig.3 The effect of substrate capacity on Antroquinonol content by *A.camphorata* in solid-state fermentation

颗粒间的孔隙率减小,从而影响基质的传热、传质;含水量过低,会导致谷物基质颗粒变硬、水活度降低,从而限制微生物的生长。

如图 4 所示,初始含水量为 50% 时,樟芝固态发酵产品中 Antroquinonol 含量最高,为 544.16mg/kg。含水量高于或低于 50% 时,樟芝固态发酵产品中 Antroquinonol 含量都会受到影响。特别是当含水量太高时,培养基粘度增大,种子液与基质搅拌不均匀,不利于微生物在基质中的生长。所以选择初始含水量为 50% 进行固态发酵较为合适,后面的实验均采用这一标准。在实验过程中,随着发酵的进行,樟芝菌丝体慢慢地包裹住谷物基质颗粒,利用谷物基质内部的淀粉,使得发酵基质的含水量逐渐升高。在发酵结束时,樟芝固态发酵产品的含水量可达到 70% 左右。

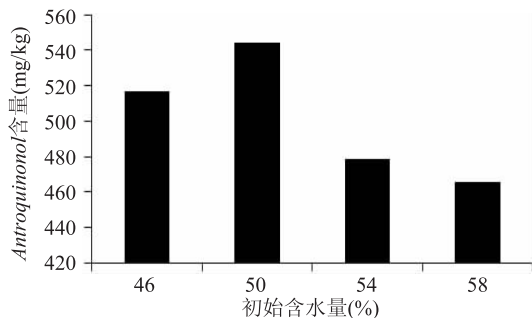


图4 初始含水量对樟芝固态发酵产 Antroquinonol 的影响  
Fig.4 The effect of initial moisture content on Antroquinonol content by *A.camphorata* in solid-state fermentation

2.1.4 外加碳源(葡萄糖)对樟芝固态发酵产 Antroquinonol 的影响 由于固态发酵周期较长,前期很大一部分时间用于菌体的生长,而 Antroquinonol 是次级代谢产物,如果能缩短菌体生长时间,使发酵周期中更多的时间用于次级代谢产物的积累,就可以缩短发酵周期,提高 Antroquinonol 的产量。本次实验考虑添加葡萄糖作为樟芝快速生长的碳源,促进樟芝菌的快速生长,缩短发酵周期。

如图 5 所示,外加葡萄糖的浓度对樟芝固态发酵产品中 Antroquinonol 的产量有明显的影

*Antroquinonol* 的含量最高,达到 650.46mg/kg,因此后续的实验以 2.0g 葡萄糖/L 为外加碳源添加标准。在发酵过程中观察到,樟芝菌覆盖包裹住谷物基质颗粒的时间随葡萄糖的添加而有所提前。

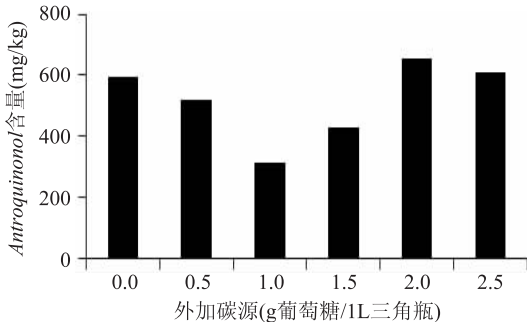


图5 外加碳源(葡萄糖)对樟芝固态发酵产 *Antroquinonol* 的影响

Fig.5 The effect of supplementary carbon source(glucose) on *Antroquinonol* content by *A.camphorata* in solid-state fermentation

**2.1.5 氮源含量对樟芝固态发酵产 *Antroquinonol* 的影响** 谷物基质中以淀粉等碳源物质为主,氮源含量很少,因此需要在谷物基质中添加一定量的氮源,以保障菌体的正常生长。樟芝固态发酵生产三萜类物质的实验中, $\text{NH}_4\text{Cl}$  是最好的氮源<sup>[11]</sup>,但在樟芝固态发酵生产 *Antroquinonol* 实验中,大豆粉是最好的氮源。因此,本次实验考察大豆粉添加量对樟芝固态发酵产 *Antroquinonol* 的影响。

如图6所示,氮源添加量从0g 大豆粉/L 增加到0.1g 大豆粉/L,樟芝产品中 *Antroquinonol* 含量随之增加。当添加量为0.3g 大豆粉/L 时,*Antroquinonol* 含量达到最高,为 696.83mg/kg。而继续提高氮源添加量,*Antroquinonol* 的含量反而有所下降。所以0.3g 大豆粉/L 是较为合适的氮源添加量。

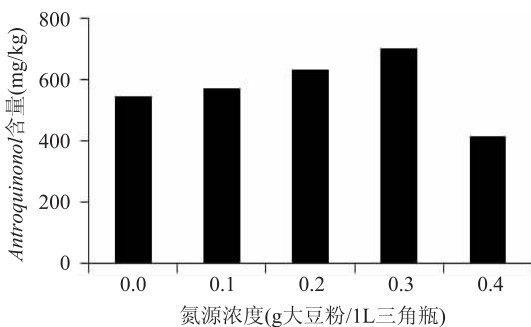


图6 氮源含量对樟芝固态发酵产 *Antroquinonol* 的影响

Fig.6 The effect of nitrogen content on *Antroquinonol* content by *A.camphorata* in solid-state fermentation

## 2.2 固态发酵产物中 *Antroquinonol* 的萃取实验

为了从樟芝固态发酵产品中得到更多的 *Antroquinonol*,并为其工业化生产提供理论参考,本实验考察了樟芝固态发酵产品中 *Antroquinonol* 的萃取工艺。

三级逆流萃取系统建立后,萃取系统即进入平衡过程,第一次排出滤渣时,对萃取级数一、萃取级数二、萃取级数三各取一个样,标记为取样序列1;其

后的每次萃取都同时对萃取级数一、萃取级数二、萃取级数三各取一个样,取样序列依次标记。取样后微滤,用 HPLC 检测 *Antroquinonol* 含量并进行分析,结果如表2所示。

表2 三级逆流萃取中各级 *Antroquinonol* 含量及残留率

Table 2 The content and residual rate of *Antroquinonol* in each stage of the three-stage countercurrent extraction process

| 取样序列 | <i>Antroquinonol</i> 含量 (mg/mL) |       |        | <i>Antroquinonol</i> 残留率 (%) |
|------|---------------------------------|-------|--------|------------------------------|
|      | 萃取级数一 (浓萃取液)                    | 萃取级数二 | 萃取级数三  |                              |
| 1    | 120.928                         | 6.660 | 0.391  | 0.91                         |
| 2    | 47.318                          | 6.494 | 5.271  | 1.23                         |
| 3    | 48.415                          | 2.964 | 10.042 | 2.33                         |
| 4    | 42.129                          | 1.442 | 3.401  | 0.79                         |
| 5    | 49.410                          | 1.337 | 2.780  | 0.65                         |
| 6    | 44.057                          | 3.217 | 3.356  | 0.78                         |
| 7    | 42.954                          | 2.854 | 2.513  | 0.58                         |
| 8    | 45.117                          | 0.766 | 2.159  | 0.50                         |

在逆流萃取系统建立后的第一次取样时,在取样序列1的一级萃取液中积累了三份样品中的 *Antroquinonol*,所以取样序列1的第一级萃取液中 *Antroquinonol* 含量最高,是取样序列2的第一级萃取液中 *Antroquinonol* 含量的2.56倍。从取样序列4开始,第一级萃取液中的 *Antroquinonol* 含量在42~50mg/mL之间波动,这种小范围的波动是三级萃取下基本达到平衡后的标志。且从取样序列4开始,*Antroquinonol* 的残留率小于1%,达到预期要求。并且,如表3所示,三级逆流萃取的溶剂萃取能力是单级萃取的溶剂萃取能力的6~7倍,溶剂损失变化不大,*Antroquinonol* 残留率大大减小。因此,采用三级逆流萃取能大大提高萃取溶剂的萃取能力,极大地节约萃取溶剂的用量,这对于大规模工业应用中经济成本的降低具有重大的意义。

表3 单级萃取与三级逆流萃取参数比较

Table 3 The comparison of parameters between single stage extraction and three-stage countercurrent extraction processes

| 项目     | 溶剂萃取能力 (g/L) | 溶剂损失 (L/g) | <i>Antroquinonol</i> 残留率 (%) |
|--------|--------------|------------|------------------------------|
| 单级萃取   | 6.91         | 1.69       | 3.58                         |
| 三级逆流萃取 | 42.13        | 2.14       | <1.0                         |

注:溶剂萃取能力——萃取工艺中,单位体积萃取溶剂对 *Antroquinonol* 的萃取量,g/L;溶剂损失——萃取工艺中,萃取单位质量 *Antroquinonol* 损失的溶剂体积,L/g;*Antroquinonol* 残留率——萃取完成后,滤渣中的 *Antroquinonol* 含量,%。三级逆流萃取中,每1L乙醇能萃取 *Antroquinonol* 含量为430.196mg/kg的樟芝固态发酵产品100g。

## 3 结论

经实验比较,确定优化后的樟芝固态发酵产 *Antroquinonol* 的固态培养基配方是:1L 三角瓶中大米装料量为110g,初始含水量为50%,外加碳源为2.0g 葡萄糖,氮源添加量为0.3g 大豆粉。*Antroquinonol* 含量从608.93mg/kg 提高到696.83mg/kg,

提高 14.44%。

经实验发现,用体积分数为 95% 的乙醇作萃取剂(乙醇与萃取物料比例为 10:1, v/w),以水浴温度 50℃,振荡萃取 1h 为萃取条件进行三级逆流浸提,残渣中的 *Antroquinonol* 残留率小于 1%。该法具有溶剂使用量少,萃取效率高的优点。其溶剂萃取能力是原单级萃取的溶剂萃取能力的 6~7 倍,能极大地降低大规模工业应用中的经济成本。

### 参考文献

- [1] 陈体强,方忠玉.珍稀药用菌樟芝研究现状[J].食用菌学报,2003,10(4):55-60.
- [2] Lu M K, Cheng J J, Lai W L, et al. Adenosine as an active component of *Antrodia cinnamomea* that prevents rat PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis through the activation of adenosine A2A receptors[J]. Life Sci, 2006, 79: 252-258.
- [3] Cheng I H, Chiang H C, Cheng M C, et al. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*[J]. J Nat Prod, 1995, 58: 365-371.
- [4] Cheng I H, Wu D P, Chiang H C. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*[J]. Phytochemistry, 1996, 41: 263-267.
- [5] Yang S W, Shen Y C, Chen C H. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea* - a fungus parasitic on *Cinnamomum micranthum*[J]. Phytochemistry, 1996, 41: 1389-1392.
- [6] Shen C C, Kuo Y C, Huang R L, et al. New ergostane and lanostane from *Antrodia camphorate* [J]. Chin Med, 2003, 14: 247-258.
- [7] Cheng P C, Huang N K, Chang T T, et al. Study for anti-

angiogenic activities of polysaccharides isolated from *Antrodia cinnamomea* in endothelial cells [J]. Life Sci, 2005, 76: 3029-3042.

[8] Nakamura N, Hirakawa A, Gao J J. Five new maleic and succinic acid derivatives from the mycelium of *Antrodia camphorata* and their cytotoxic effects on LLC tumor cell Line [J]. J Nat Prod, 2004, 67: 46-48.

[9] Lee T H, Lee C K, Tsou W L. A new cytotoxic agent from solid state fermented mycelium of *Antrodia camphorata* [J]. Planta Med, 2007, 73: 512-516.

[10] Chiang P C, Lin S C, Shioh L P, et al. Antroquinonol displays anticancer potential against human hepatocellular carcinoma cells: A crucial role of AMPK and mTOR pathways [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79: 162-171.

[11] 张宝荣,夏永军,许贛荣.樟芝固态发酵生产三萜类化合物[J].食品工业科技,2011,32(7):174-177.

[12] 夏永军,李炜疆,许贛荣.樟芝固态发酵产品活性代谢产物分析[J].食品与发酵工业,2011,37:86-90.

[13] 李高阳,丁宵霖.亚麻籽双液相多级逆流萃取工艺模拟实验[J].农业工程学报,2010,26(3):380-384.

[14] 高福成,许学勤,郑建仙,等.食品分离重组工程技术[M].北京:中国轻工出版社,1998:371-390.

[15] Liu B, Tzenng Y. Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptides in solid state fermentation by *Metarhizium anisopliae* [J]. Biotechnol Lett, 1999, 21: 657-661.

[16] Penna M L, Etcheverry M. Impact on growth and aflatoxin B1 accumulation by *kluyveromyces* isolates at different water activity conditions [J]. Mycopathologia, 2006, 162: 347-353.

(上接第 163 页)

sanguinea by PCR, and cloning, characterization and expression of the yeast cDNA in yeasts [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 92(4): 372-380.

[7] Otterbein L, Record E, Longhi S, et al. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris* [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(6): 1619-1625.

[8] 司静,李伟,崔宝凯,等.真菌漆酶性质、分子生物学及其应用研究进展[J].生物技术通报,2011(2):48-55.

[9] Couto S R, Toca-Herrera J L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungus [J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(6): 558-569.

[10] Manda K, Hammer E, Mikolasch A, et al. Laccase-induced cross-coupling of 4-aminobenzoic acid with para-dihydroxylated compounds 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide and 2,5-dihydroxybenzoic acid methyl ester [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005, 35(4): 86-92.

[11] Gnanamani A, Jayaprakashvel M, Arulmani M, et al. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(7): 1017-1021.

[12] Jaszek M, Grzywnowicz K, Malarczyk E, et al. Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of

white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus beinnis* to paraquat-caused oxidative stress conditions [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2006, 85(3): 147-154.

[13] 胡平平,付时雨,余惠生.固体培养调节下氮源对 *P.conchatus* 酶系及漆酶同工酶的影响[J].纤维素科学与技术, 2001(1): 1-7.

[14] Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(4): 529-536.

[15] 张田田,沈明浩. Plackett-Burman 设计和响应面法优化火红密孔菌发酵产漆酶培养基 [J]. 生物工程, 2011, 32(9): 223-226.

[16] 付时雨,余惠生.贝壳状革耳菌在固体及液体培养过程漆酶同工酶的产生研究[J].纤维素科学与技术, 1998, 3(6): 32-37.

[17] 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,2005:54.

[18] 苏东海,苏东民,辛秀兰,等.白腐菌 TP21 液体培养产漆酶的条件研究[J].西北农业学报,2009,18(3):249-253.

[19] 莫佳琳,付时雨,詹怀宇,等.白腐菌液体培养产生漆酶的研究[J].纤维素科学与技术,2008,1(16):13-19.

[20] 高恩丽.云芝漆酶的生产及其应用基础研究[D].杭州:浙江大学,2007.