

榆黄蘑菌渣中漆酶的提取、酶学性质及应用

张 勇¹ 李 青¹ 郑志豪² 刘诗美² 杨 凯³

(1. 山西农业大学, 山西 太原 030031; 2. 中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙 410205;

3. 山西富之源菌业有限公司, 山西 吕梁 033200)

摘要: [目的] 探索一种低成本的可以用于果汁澄清的漆酶制备方法。[方法] 对榆黄蘑菌渣漆酶提取方法、最适反应条件以及酶粉制备条件进行优化, 并将制备的榆黄蘑菌渣漆酶粉应用于蓝莓果汁澄清。[结果] 榆黄蘑菌渣漆酶最适提取条件为: 采用 pH 4.8 柠檬酸缓冲液, 料液比 1:5 (g/mL), 提取温度 50 °C, 提取时间 4 h。漆酶反应最适条件为: 反应温度 30 °C, pH 4.8, Cu^{2+} 浓度 10 mmol/L, Mn^{2+} 浓度 5 mmol/L。酶粉制备最适条件为: 麦芽糊精和脱脂奶粉按质量比 1:1 混合作为助干剂, 进风口温度 140 °C, 进料流量 160 mL/h。对制备的酶粉进行蓝莓果汁澄清应用试验, 在漆酶使用量 6 U/10 mL、酶解温度 55 °C、酶解时间 120 min 的条件下, 蓝莓总酚降解率高达 63.5%。[结论] 采用最适工艺从榆黄蘑菌渣中提取的漆酶可以应用于蓝莓果汁的澄清。

关键词: 榆黄蘑; 菌渣; 漆酶; 蓝莓; 果汁澄清

Extraction, enzymatic properties and application of laccase from *Pleurotus citrinopileatus* residue

ZHANG Yong¹ LI Qing¹ ZHENG Zhihao² LIU Shimei² YANG Kai³

(1. Shanxi Agricultural University, Taiyuan, Shanxi 030031, China; 2. Institute of Bast Fiber Crops,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410205, China;

3. Shanxi Fuzhiyuan Fungus Industry Co., Ltd., Luliang, Shanxi 033200, China)

Abstract: [Objective] Explore a low-cost laccase preparation method that can be used for juice clarification. [Methods] The extraction method, optimal reaction conditions and preparation conditions of enzyme powder were optimized, and the prepared laccase powder was applied to blueberry juice clarification. [Results] The optimal extraction conditions for laccase were as follows: citric acid buffer with pH 4.8, solid-liquid ratio of 1:5 (g/mL), extraction temperature of 50 °C, and extraction time of 4 h. The optimal conditions for laccase reaction were as follows: reaction temperature 30 °C, pH 4.8, Cu^{2+} concentration 10 mmol/L, Mn^{2+} concentration 5 mmol/L. The optimal conditions for the preparation of enzyme powder were as follows: maltodextrin and skimmed milk powder were mixed as drying aids according to the mass ratio of 1:1, the air inlet temperature was 140 °C, and the feed flow rate was 160 mL/h. The degradation rate of total phenols of blueberry was as high as 63.5% under the conditions of laccase dosage of 6 U/10 mL, enzymatic hydrolysis temperature of 55 °C and enzymatic hydrolysis time of 120 min. [Conclusion] Laccase extracted from the residue of *Ulmus lum* mushroom using an optimal process can be used for the clarification of blueberry juice.

Keywords: *Pleurotus citrinopileatus*; mushroom residue; laccase; blueberry; juice clarification

中国食用菌总产量已超 4 000 万 t, 占世界总产量 70% 以上^[1]。随着食用菌产业快速发展, 工厂化栽培食用菌采收鲜菇后产生了大量的食用菌菌渣。根据中国食用菌协会统计, 2021 年仅山东省菌类加工业产生的榆黄蘑菌渣

就超过了 12 万 t^[2]。菌渣中含有丰富的木质纤维素降解酶, 包括漆酶、木质素过氧化酶、纤维素酶和木聚糖酶等^[3]。目前, 研究人员^[4-5]从杏鲍菇、白灵菇等食用菌菌渣中发现了丰富的漆酶, 并对其进行了提取和应用。漆酶

基金项目: 山西省科技重大专项计划“揭榜挂帅”项目(编号: 202301140601015); 山西省现代农业产业技术体系建设项目“岗位专家”(编号: 2024CYJSTX09-02)

通信作者: 张勇(1967—), 男, 山西农业大学副研究员, 硕士。E-mail: 583531533@qq.com

收稿日期: 2024-07-30 **改回日期:** 2024-10-07

是一种多酚氧化酶,属于铜蓝氧化酶,以单体糖蛋白的形式存在,在食品行业中具有巨大的应用价值^[6]。在葡萄酒生产初期添加漆酶可有针对性地分解氧化酚类物质,使葡萄酒长时间保持清澈透明^[7]。魏胜华等^[8]采用转谷氨酰胺酶作为交联剂,将漆酶固定化处理苹果汁,成功保持了果汁的透明度,避免了多酚类物质在贮藏过程中导致的混浊问题,从而保证了产品品质。目前,用商品化的漆酶来澄清果汁成本较高,如果能从食用菌菌渣中提取漆酶,降低漆酶生产成本,不仅能促进食用菌菌渣综合利用,还能促进果汁产业的持续发展。

喷雾干燥是一种集成工业系统化技术用于物料干燥的工艺。其主要优势在于干燥速度快,水分蒸发时间短,得到的粉末粒度细致且均匀,产品展现出优良的分散性和溶解性^[9]。将菌渣中的漆酶制成酶粉可提高漆酶的稳定性,而且便于贮藏和运输^[10]。目前已有利用喷雾干燥法制备植酸酶^[11]、卡拉胶酶^[12]、琼脂硫酸酯酶^[13]等固体酶制剂的研究报道。

研究拟对榆黄蘑菌渣漆酶提取方法、最适反应条件以及酶粉制备条件进行优化,并将其应用于蓝莓果汁澄清,以期对菌渣的资源化利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

榆黄蘑菌渣:山西农业大学食用菌栽培基地;

柠檬酸、无水醋酸钠、丙二酸、酒石酸、2,2-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

冷冻离心机:3-15型,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;

移液枪:P50/P100/P200型,吉尔森实验仪器(上海)有限公司;

电子天平:AL104型,梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;

恒温培养箱:SPX-250B型,上海知楚仪器有限公司;

高压蒸汽灭菌锅:XFH-200CA型,浙江新丰医疗器械有限公司;

超纯水仪:RO-200型,艾柯医疗器械(北京)股份有限公司;

冷冻干燥机:FD80AD型,上海比朗仪器制造有限公司。

1.2 菌渣提取液制备

1.2.1 单因素试验

(1) 提取缓冲液:固定料液比为1:5(g/mL),提取温度为50℃,提取时间为4h,考察提取缓冲液(水、pH 4.8醋酸缓冲液、pH 4.8丙二酸缓冲液、pH 4.8酒石酸缓冲

液以及pH 4.8柠檬酸缓冲液)对提取榆黄蘑菌渣中漆酶粗酶液酶活的影响。

(2) 料液比:固定提取缓冲液为pH 4.8柠檬酸缓冲液,提取温度为50℃,提取时间为4h,考察料液比[1:2, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20(g/mL)]对提取榆黄蘑菌渣中漆酶粗酶液酶活的影响。

(3) 提取温度:固定提取缓冲液为pH 4.8柠檬酸缓冲液,料液比为1:5(g/mL),提取时间为4h,考察提取温度(20,30,40,50,60℃)对提取榆黄蘑菌渣中漆酶粗酶液酶活的影响。

(4) 提取时间:固定提取缓冲液为pH 4.8柠檬酸缓冲液,料液比为1:5(g/mL),提取温度为50℃,考察提取时间(0,1,2,3,4,5h)对提取榆黄蘑菌渣中漆酶粗酶液酶活的影响。

1.2.2 正交试验 在单因素试验结果的基础上,以料液比、提取温度和提取时间3个主要因素作为自变量,以漆酶活性为因变量,设计三水平三因素的正交试验,以筛选菌渣提取液制备的最佳工艺条件。

1.3 菌渣漆酶活力测定

取1 mL酶液用pH 4.5的醋酸缓冲液稀释10倍,加入1 mL 0.5 mmol/L的ABTS溶液,在30℃下反应5 min,反应结束后,吸取200 μL待测液于96孔酶标板中,测定其在420 nm下吸光值随时间的变化^[14-16]。以每分钟消耗1 μmol ABTS所需要的酶量为一个酶活力单位(U)。按式(1)计算漆酶酶活力。

$$B = \frac{10^6 \times V_{\text{总}} \times \Delta A}{V_{\text{酶}} \times \epsilon \times \Delta t}, \quad (1)$$

式中:

B ——漆酶酶活力,U/mL;

ΔA ——吸光度的增加量;

Δt ——反应时间的变化量,s;

$V_{\text{总}}$ ——总反应体积,mL;

$V_{\text{酶}}$ ——酶液体积,mL;

ϵ ——消光系数,36 000 L/(mol·cm)。

1.4 菌渣漆酶最适反应条件优化

(1) 反应温度对漆酶活性的影响:将榆黄蘑菌渣粗酶液于30,40,50,60,70℃的水浴锅中保温5 min,进行酶活力的测定,将测得的最高酶活力设定为100%,计算其他温度下的相对酶活力。

(2) pH对漆酶活性的影响:将榆黄蘑菌渣用pH为2.5,4.0,4.8,6.0的柠檬酸缓冲液分别进行提取,料液比为1:5(g/mL),随后进行酶活力的测定。

(3) 金属离子对漆酶活性的影响:将榆黄蘑菌渣粗酶液分别加入1,5,10,20,100 mmol/L的 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 后测定漆酶活力。

1.5 菌渣漆酶动力学常数测定

根据文献[17]。配制 0.6 mmol/L 的 ABTS 母液,加入一定量的 0.2 mol/L 的丙二酸缓冲液,使二者总体积为 2 mL,混匀,配制浓度分别为 0.033, 0.040, 0.050, 0.067, 0.100 mmol/L 的 ABTS 底物。每孔准确加入 10 μ L 的待测榆黄蘑菌渣提取液和不同浓度的 ABTS 底物,30 $^{\circ}$ C 下反应 5 min 后,每间隔 5 min,吸取 200 μ L 待测液于 96 孔酶标板中,测定其在 420 nm 处的吸光值,测定 3 次平行计算吸光值的平均值;折算成每分钟的吸光度变化值,采用米氏方程双倒数作图法^[18],横坐标为不同浓度的 ABTS 的倒数 1/S,纵坐标为酶活力的倒数 1/V,以此绘制漆酶的动力学曲线,求出 K_m 值。

1.6 漆酶酶粉制备条件优化

前期预试验结果表明,酶粉制备过程中对酶活性影响最大的因素是助干剂和进风口温度。因此,重点对助干剂和进风口温度进行优化。对麦芽糊精、可溶性淀粉、 β -环糊精和脱脂奶粉作为助干剂进行了试验,筛选出最适助干剂。筛选出最适助干剂后,将麦芽糊精和脱脂奶粉按质量比 1:1, 1:2 和 2:1 的比例混合,筛选出最佳比例。进风口温度优化方面,取 0.5 L 榆黄蘑菌渣提取液加入 50 g 脱脂奶粉和 50 g 麦芽糊精,将进风口温度分别设定为 150, 140, 130, 120 $^{\circ}$ C,蠕动泵转速 20 r/min 条件下制备漆酶酶粉。对以上样品中漆酶活力进行测定,筛选出最佳助干剂和进风口温度。在此基础上对进料流量进行优化,分别设定为 100, 120, 140, 160, 180, 200 mL/h,考察其对喷制酶粉活性的影响。

1.7 漆酶在蓝莓汁澄清中的应用

取 10 mL 蓝莓果汁分别添加 1.67, 3.34, 5.00, 6.67, 8.34, 10.00, 11.67 mg 喷雾干燥所制酶粉,使 10 mL 蓝莓果汁中漆酶酶活力单位分别为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 U,在振荡水浴锅中以 150 r/min、55 $^{\circ}$ C 孵育 120 min。完成孵育后,8 000 r/min 离心 10 min 取上清,对处理前后蓝莓果汁样本中总酚含量进行测定,以此研究漆酶用量对蓝莓果汁澄清效果的影响。

总酚测定:取 15 mL Ep 管加入 100 μ L 样品和 900 μ L 水再加 1.5 mL 福林酚于室温下反应 5 min,加 1 mL 20% 碳酸钠和 6.5 mL 水在室温下反应 1 h。用移液枪吸取 200 μ L 进行点样。在 760 nm 下检测 OD 值。用 0~1 mg/mL 没食子酸作为标准多酚化合物,绘制没食子酸的标准曲线。

1.8 数据处理

所有试验数据结果均为 3 个独立的重复试验的平均值。采用 Graphpad Prism 9.4 软件包对数据进行统计学分析。采用多重范围试验或独立样本 T 检验对数据进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 菌渣提取液中漆酶提取条件优化

2.1.1 单因素试验 图 1(a)结果表明,采用不同提取缓冲液提取对漆酶酶活的影响较小,采用 pH 4.8 柠檬酸缓冲液提取时酶活最高,为 17.42 U/mL。图 1(b)结果表明,当料液比为 1:5 (g/mL)时酶活最高为 17.05 U/mL,随着液料比的增大或减小,酶活都降低。图 1(c)结果表明,榆黄蘑菌渣漆酶催化最适反应温度为 50 $^{\circ}$ C,酶活达到 16.09 U/mL。图 1(d)结果表明,提取时间为 1~4 h 时漆酶酶活升高,在 4 h 时达到峰值(为 17.32 U/mL),超过 4 h 以后,酶活逐渐下降。因此,榆黄蘑菌渣提取最佳条件为:采用 pH 4.8 柠檬酸缓冲液,料液比 1:5 (g/mL),提取温度 50 $^{\circ}$ C,提取时间 4 h。

2.1.2 正交试验 菌渣提取液制备工艺最佳正交试验的具体因素和水平设计见表 1,试验结果与分析见表 2。由表 2 可以看出,各因素对菌渣提取液制备的影响程度为 $A > B > C$,最佳提取条件为 $A_2B_2C_3$,即料液比 1:5 (g/mL),提取温度 50 $^{\circ}$ C,提取时间 5 h。

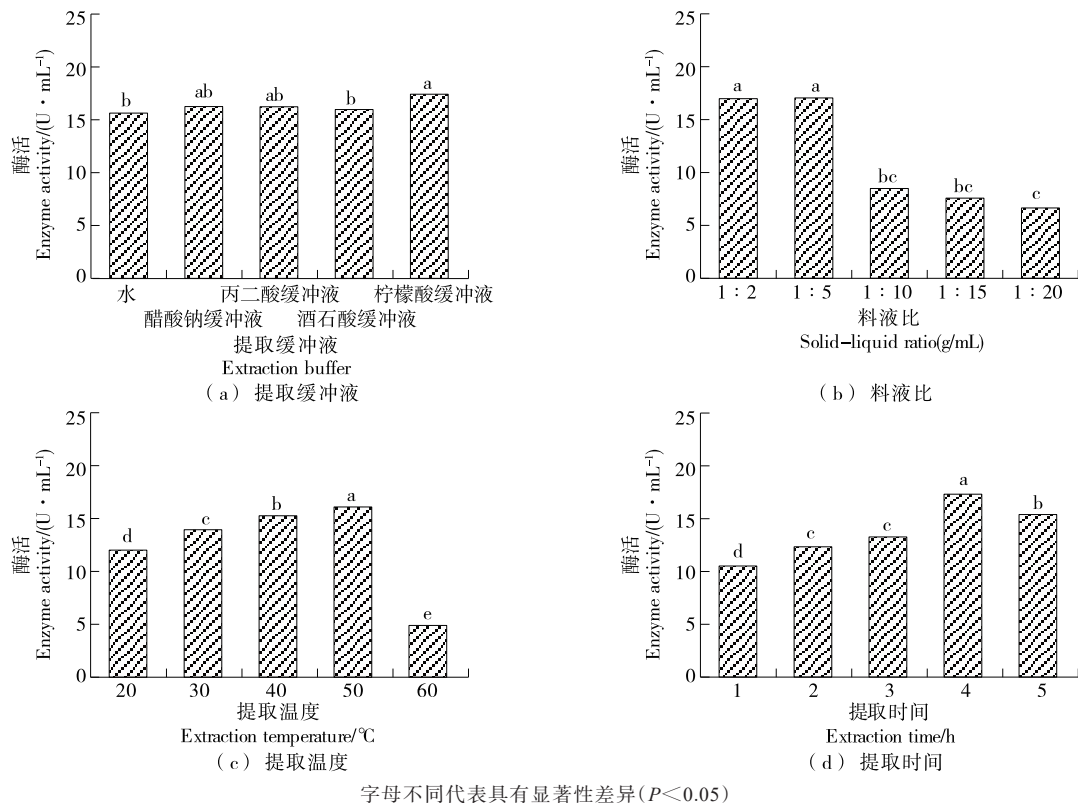
2.1.3 验证实验 以料液比 1:5 (g/mL),提取温度 50 $^{\circ}$ C,提取时间 5 h 进行 3 次平行验证实验,所得菌渣提取液中漆酶活分别为 17.38, 17.51, 17.49 U/mL。说明该工艺条件稳定、重复性好。

2.2 菌渣漆酶最适反应条件优化

如图 2(a)所示,催化温度在 30~70 $^{\circ}$ C 范围内,酶活随温度增高逐渐减弱,温度为 70 $^{\circ}$ C 时,漆酶接近失活。如图 2(b)所示,在 pH 2.5~4.8 范围内,酶活随 pH 值增加而增强,在 pH 4.8~6.0 范围内,酶活随 pH 值增加而减弱,说明榆黄蘑菌渣漆酶的最适反应 pH 值为 4.8。这与曹玉莹等^[19]对漆酶酶学性质的研究结果一致。漆酶是一类含铜的多酚氧化酶。 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 是漆酶良好的诱导剂^[14],两种离子对榆黄蘑菌渣漆酶活性的影响如图 2(c)和图 2(d)所示, Cu^{2+} 浓度为 10 mmol/L、 Mn^{2+} 浓度为 5 mmol/L 时榆黄蘑菌渣漆酶活性最高。综上,榆黄蘑菌渣粗酶液中漆酶最适反应温度为 30 $^{\circ}$ C, pH 值为 4.8, Cu^{2+} 浓度为 10 mmol/L, Mn^{2+} 浓度为 5 mmol/L。相比于细菌漆酶,大多数来源于真菌的漆酶活性易受外部环境的影响,适应偏酸性环境,最适温度为 25~50 $^{\circ}$ C,温度较低或过高常常会抑制酶活^[20]。榆黄蘑作为一种担子真菌,其菌渣漆酶亦符合真菌漆酶特性。此外,不同的真菌漆酶对温度的敏感程度有差异,筛选温度适应范围广及对高温适应能力强漆酶具有更为广泛的应用前景^[21]。

2.3 榆黄蘑菌渣漆酶动力学常数测定

为了测定榆黄蘑菌渣漆酶动力学常数,在 30 $^{\circ}$ C, pH 4.8 条件下,测定不同浓度 ABTS(S)下漆酶的反应速



字母不同代表具有显著性差异 ($P < 0.05$)

图1 提取液、料液比、提取温度和提取时间对榆黄蘑菌渣中漆酶活性的影响

Figure 1 Effects of extraction solution, solid-liquid ratio, extraction temperature, and extraction time on the laccase activity of *P. citrinopileatus* residue.

表1 正交试验因素与水平设计

水平	A 料液比(g/mL)	B 提取温度/°C	C 提取时间/h
1	1:2	40	3
2	1:5	50	4
3	1:10	60	5

率。图3为不同浓度的ABTS的倒数 $1/S$ 与酶活力的倒数 $1/V$ 的关系曲线,可以看出,该曲线线性关系较好,由米氏方程可以得出榆黄蘑菌渣漆酶催化ABTS的米氏常数(K_m)为0.624 1 mmol/L。米氏常数反映了酶促反应达最大速度(V_m)的50%时的底物浓度,是衡量酶对底物亲和力的重要参数,试验表明榆黄蘑菌渣漆酶和ABTS具有较高的亲和力。

2.4 漆酶酶粉制备条件优化

2.4.1 助干剂的选择 图4结果表明,麦芽糊精和脱脂奶粉作为助干剂时酶活和粉末状态良好,以质量比1:1混合的麦芽糊精和脱脂奶粉作为助干剂时效果最好。这可能是因为麦芽糊精和脱脂奶粉以质量比1:1混合时,可能产生协同作用,使得助干剂在溶液中的溶解性和分散性达到最佳状态,有助于在干燥过程中均匀地包裹酶分子,保

表2 正交试验结果与分析

试验号	A	B	C	酶活/(U · mL ⁻¹)
1	1	1	1	16.27 ± 0.21
2	1	2	2	16.98 ± 0.16
3	1	3	3	16.25 ± 0.24
4	2	1	2	17.24 ± 0.47
5	2	2	3	17.46 ± 0.39
6	2	3	1	16.72 ± 0.25
7	3	1	3	8.98 ± 0.19
8	3	2	1	9.02 ± 0.22
9	3	3	2	8.24 ± 0.16
K_1	16.500	14.163	14.003	
K_2	17.140	14.487	14.153	
K_3	8.747	13.737	14.230	
R	8.393	0.750	0.227	

护酶的活性结构,从而提高酶活。

2.4.2 进风口温度优化 由表3可知,在进风口温度为140 °C时所得酶粉的酶活回收率和酶制剂活力均最高,且其干燥状况很好、粉末均匀。

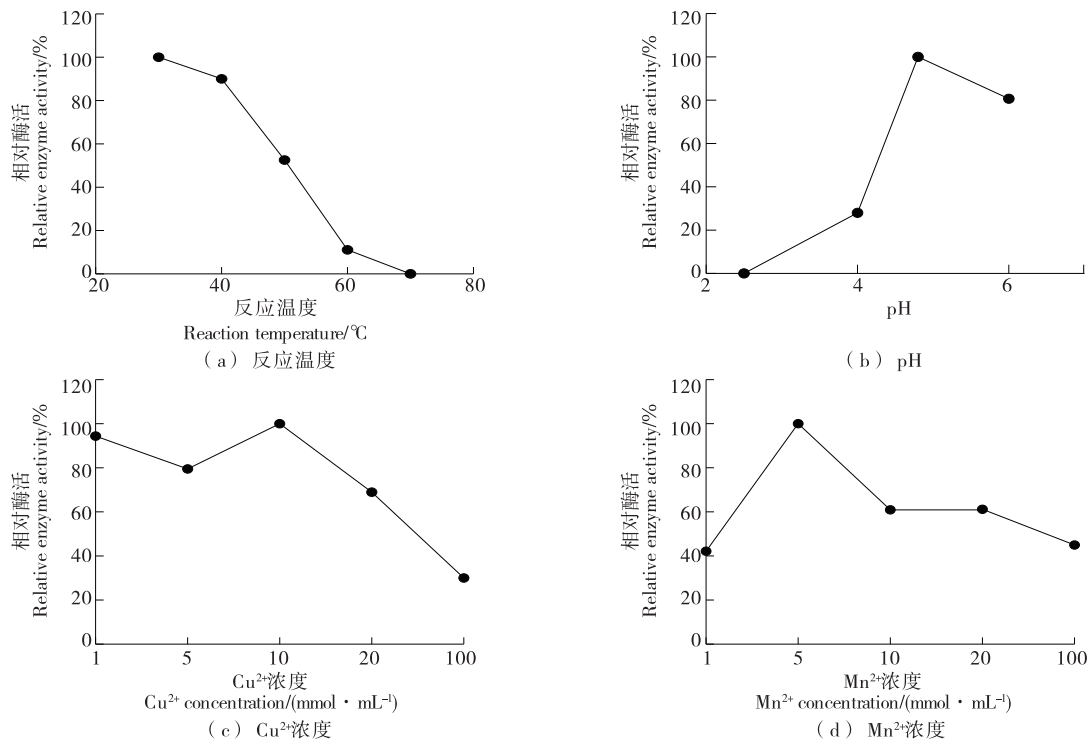


Figure 2 Effect of reaction temperature, pH and metal ion concentration (Cu^{2+} and Mn^{2+}) on laccase activity of *P. citrinopileatus* residue

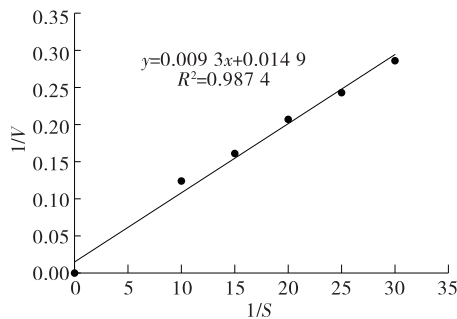


Figure 3 The Lineweaver-Bu curve of Laccase from *P. citrinopileatus* residue

2.4.3 进料流量优化 由表 4 可知,进料流量对漆酶的酶活回收率有显著影响。当进料流量从 100 mL/h 增加至 160 mL/h 时,漆酶的酶活回收率逐渐升高;而后随着进料流量进一步增加,漆酶的回收率开始下降,酶活性降低。

因此,选取 160 mL/h 为最佳进料流量。

2.5 漆酶在蓝莓果汁澄清过程中的应用

果汁中残留的多酚类物质会导致果汁混浊,从而影响产品品质。漆酶对果汁多酚有独特分解能力,能够通过氧化各种底物使多酚降解,达到果汁澄清效果^[9]。取 10 mL 蓝莓果汁分别添加 1.67, 3.34, 5.00, 6.67, 8.34, 10.00, 11.67 mg 喷雾干燥所制酶粉,使 10 mL 蓝莓果汁中漆酶酶活分别为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 U, 在振荡水浴锅中以 150 r/min, 55 °C 条件下对蓝莓果汁酶解处理 120 min, 对处理前后蓝莓果汁样本中总酚含量进行测定,计算其多酚降解率。如图 5 所示,随着酶添加量的增加,蓝莓果汁中多酚降解率呈增加趋势。当酶添加量为 6 U 时,多酚降解率达到最大值 63.5%,继续增加酶量后,多酚降解率未发生明显变化,确定漆酶的最佳添加量为 6 U。试验证明,制备的酶粉能够很好地使蓝莓果汁保持澄清,具有实际应用价值。

表 3 进风口温度对喷制酶粉活性的影响

Table 3 Effect of different air inlet temperature on the activity of spraying enzyme powder

进风口温度/°C	酶活回收率/%	酶制剂活力/(U·g ⁻¹)	粉末状态	酶制剂水溶性
120	63	469	干燥不彻底、酶粉结块	可溶性好、均一溶液
130	68	575	干燥状况良好、粉末均匀	可溶性好、均一溶液
140	74	754	干燥状况很好、粉末均匀	可溶性不好、乳浊液
150	66	652	干燥不彻底、酶粉结块	可溶性好、均一溶液

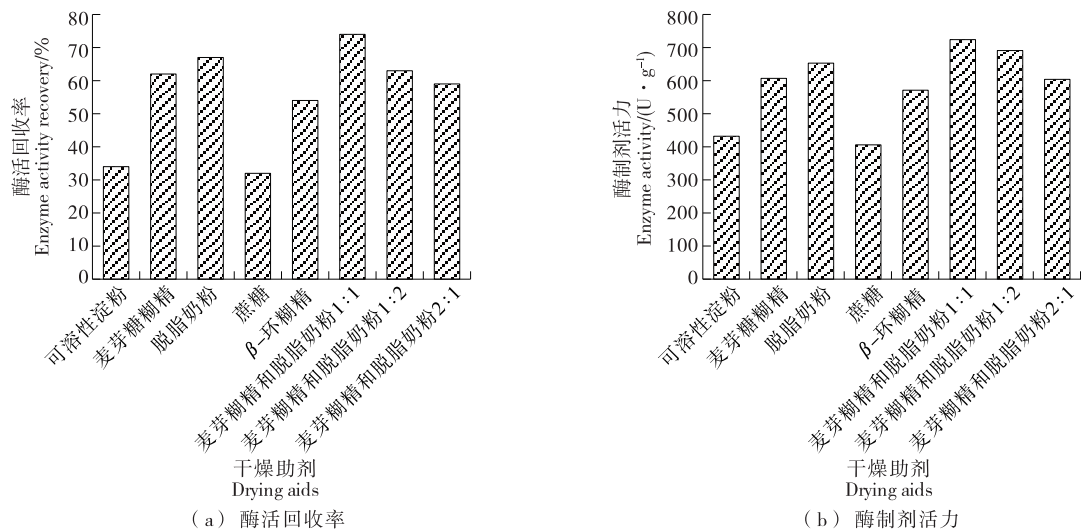


图4 干燥助剂对喷制酶粉活性的影响
Figure 4 Effect of drying auxiliaries on the activity of spraying enzyme powder

表4 进料流量对喷制酶粉活性的影响

Table 4 Effect of feed flow rate on the activity of spraying enzyme powder

进料流量/(mL·h ⁻¹)	酶活回收率/%	酶制剂活力/(U·g ⁻¹)	粉末状态	酶制剂水溶性
100	45	424	干燥状况良好、粉末均匀	可溶性好、均一溶液
120	53	590	干燥状况良好、粉末均匀	可溶性好、均一溶液
140	64	624	干燥状况很好、粉末均匀	可溶性好、均一溶液
160	71	669	干燥状况良好、粉末均匀	可溶性好、均一溶液
180	60	603	干燥状况良好、粉末均匀	可溶性好、均一溶液
200	41	543	干燥状况良好、粉末均匀	可溶性好、均一溶液

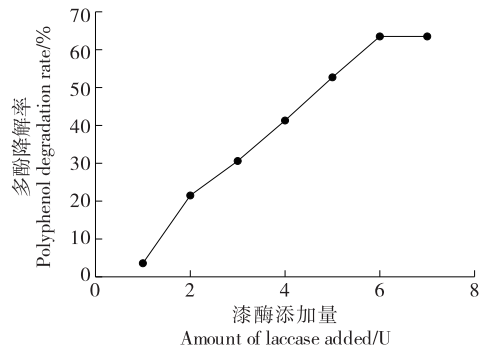


图5 漆酶添加量对蓝莓果汁多酚降解率的影响
Figure 5 Effect of different content of laccase on the degradation rate of polyphenols in blueberry juice

3 结论

榆黄蘑菇渣中漆酶最适提取条件为:采用 pH 4.8 柠檬酸缓冲液,料液比 1:5 (g/mL),提取温度 50 ℃,提取时间 4 h。漆酶反应最适条件为:反应温度 30 ℃,pH 4.8, Cu^{2+} 浓度 10 mmol/L, Mn^{2+} 浓度 5 mmol/L。酶粉制备最适条件为:麦芽糊精和脱脂奶粉按质量比 1:1 混合作为助干

剂,进风口温度 140 ℃,进料流量 160 mL/h。对制备的酶粉进行蓝莓果汁澄清应用试验,在漆酶使用量 6 U/10 mL、酶解温度 55 ℃、酶解时间 120 min 的条件下,蓝莓总酚降解率高达 63.5%。

研究通过优化提取和反应条件,成功制备出了高活性的漆酶粉,并在蓝莓果汁澄清中展现了良好的应用效果。但对漆酶在其他领域应用的探索尚显不足,未来可进一步研究漆酶在印染废水脱色处理及其他生物修复中的应用潜力。此外,优化酶粉的贮藏和稳定性,以及探索其在更广泛条件下的应用,都是未来的关键研究方向。

参考文献

[1] 马驰宇,王雪晴,米志鹏.中国食用菌出口贸易现状、风险及对策[J].北方园艺,2024(12): 142-149.
MA C Y, WANG X Q, MI Z J. Current situation, risks and countermeasures of China's edible fungus export trade[J]. Northern Horticulture, 2024(12): 142-149.
[2] 王伟霞,张之麒,李淑格,等.食用菌菌渣资源化利用研究进展[J].现代园艺,2023,46(13): 59-61.
WANG W X, ZHANG Z L, LI S G, et al. Research progress on

- resource utilization of edible fungus residues[J]. Contemporary Horticulture, 2023, 46(13): 59-61.
- [3] 贺国强, 魏金康, 胡晓艳, 等. 食用菌菌渣理化性质及利用途径研究进展[J]. 蔬菜, 2023(5): 30-40.
- HE G Q, WEI J K, HU X Y, et al. Research progress on the physicochemical properties and utilization pathways of edible mushroom residue[J]. Vegetables, 2023(5): 30-40.
- [4] 张永, 田乔鹏, 任海燕, 等. 杏鲍菇菌渣产漆酶及其在染料脱色中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(7): 116-121.
- ZHANG Y, TIAN Q P, REN H Y, et al. Laccase production by spent compost of *Pleurotus eryngii* and its application in dye decolorization[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(7): 116-121.
- [5] 刘芹, 崔筱, 孔维威, 等. 白灵侧耳菌渣中漆酶的分离纯化与酶学性质[J]. 食用菌学报, 2019(4): 90-99.
- LIU Q, CUI X, KONG W W, et al. Purification and characterization of a laccase from *Pleurotus tuoliensis* cultivation residue[J]. Acta Edulis Fungi, 2019(4): 90-99.
- [6] 张馨, 刘功良, 白卫东, 等. 原核漆酶的研究进展及其应用[J]. 食品工业科技, 2023, 44(15): 451-462.
- ZHANG X, LIU G L, BAI W D, et al. Research progress and application of prokaryotic laccase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(15): 451-462.
- [7] 胡周月, 钱磊, 张志军, 等. 漆酶在食品工业及其他领域上的应用进展[J]. 天津农学院学报, 2019, 26(3): 83-86.
- HU Z Y, QIAN L, ZHANG Z J, et al. Application progress of laccase in food industry and other fields[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2019, 26(3): 83-86.
- [8] 魏胜华, 汤中勋, 张威, 等. 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[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(21): 185-190.
- WEI S H, TANG Z X, ZHANG W, et al. Immobilized laccase by transglutaminase and its application in apple juice clarification[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(21): 185-190.
- [9] 徐园杰, 周立, 李涛, 等. 板栗速溶粉喷雾干燥工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(18): 160-168.
- XU Y J, ZHOU L, LI T, et al. Spray drying technology of instant chestnut powder[J]. Food Research and Development, 2024, 45(18): 160-168.
- [10] 张海洋, 赖春芬, 闫苗, 等. 秀珍菇废菌糠中漆酶制剂的制备工艺[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(3): 81-84.
- ZHANG H Y, LAI C F, YAN M, et al. Preparation of laccase by spray drying from fungi chaff of *Pleurotus geesteranus*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(3): 81-84.
- [11] 张琪, 朱庆峰, 崔百元, 等. 喷雾干燥法制备饲用植酸酶制剂[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(6): 750-753.
- ZHANG Q, ZHU Q F, CUI B Y, et al. Preparation of feed phytase by spray-drying[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2016, 38(6): 750-753.
- [12] 曾洁, 李永幸, 洪清林, 等. 卡拉胶酶固体酶制剂的喷雾干燥制备工艺优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(24): 152-158.
- ZENG J, LI Y X, HONG Q L, et al. Technology research for producing solid carrageenase preparation by spray drying[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(24): 152-158.
- [13] 田友明, 孙元亨, 肖琼, 等. 琼脂硫酸酯酶制剂的制备工艺及其贮藏性能[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2017, 22(2): 16-24.
- TIAN Y M, SUN Y H, XIAO Q, et al. Production of solid agar sulfatase and storage stability of enzyme preparation[J]. Journal of Jimei University (Natural Science Edition), 2017, 22(2): 16-24.
- [14] 林俊芳, 刘志明, 陈晓阳, 等. 真菌漆酶的酶活测定方法评价[J]. 生物加工过程, 2009, 7(4): 1-8.
- LIN J F, LIU Z M, CHEN X Y, et al. Evaluation of enzymatic activity measurement methods for fungal laccase[J]. Bioprocessing, 2009, 7(4): 1-8.
- [15] FRANCESCA D, MARIA A B, CARLO G. Determination of the activity of laccase, and mediated oxidation of a lignin model compound, in aqueous-organic mixed solvents[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 31(1): 25-30.
- [16] PETR B, JIRÍ G. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 206(1): 69-74.
- [17] 梁倩倩, 魏生龙, 丁玲强, 等. 荷叶离褶伞高产漆酶菌株选育及其漆酶酶学特性[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(8): 1 178-1 181.
- LIANG Q Q, WEI S L, DING L Q, et al. Mutational screening of *Lyophyllum decastes* with high yield of laccase and characteristics of laccase from the mutant[J]. Natural Product Research and Development, 2014, 26(8): 1 178-1 181.
- [18] 李彦华. 对米氏常数求法的一点补充[J]. 辽宁工程技术大学学报, 2006(增刊 1): 335-336.
- LI Y H. A supplement to the method of finding the Michaelis constant[J]. Journal of Liaoning Technical University (Natural Science), 2006(Suppl 1): 335-336.
- [19] 曹玉莹, 王爽, 刘怡宁, 等. 植物乳杆菌漆酶的酶学性质及其对生物胺的降解作用[J]. 食品科学, 2023, 44(12): 157-163.
- CAO Y Y, WANG S, LIU Y N, et al. Enzymatic properties of *Lactobacillus plantarum* laccase and its degrading effect on biogenic amines[J]. Food Science, 2023, 44(12): 157-163.
- [20] 邓寒梅, 邵可, 梁家豪, 等. 漆酶的来源及固定化漆酶载体研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(6): 10-15.
- DENG H M, SHAO K, LIANG J H, et al. Source of laccase and research progress on carriers for laccase immobilization[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(6): 10-15.
- [21] 唐禄鑫, 王雅娴, 彭明意, 等. 真菌漆酶及其生产、固定化与应用[J]. 菌物学报, 2023, 42(9): 1 821-1 837.
- TANG L X, WANG Y X, PENG M Y, et al. Fungal laccase and its production, immobilization, and application: a review[J]. Mycosystema, 2023, 42(9): 1 821-1 837.