

刘海宇, 申露, 梁胜焕, 程飞. 铜锰离子添加下奶油栓孔菌的木质素降解酶活性、耐受性及移除能力[J]. 应用与环境生物学报, 2023, 29 (5): 1211-1219
Liu HY, Shen L, Liang SH, Cheng F. Lignin-degrading enzymatic activities, tolerance, and removal ability of *Trametes lactinea* under the addition of Cu^{2+} and Mn^{2+} [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2023, 29 (5): 1211-1219

铜锰离子添加下奶油栓孔菌的木质素降解酶活性、耐受性及移除能力

刘海宇 申露 梁胜焕 程飞✉

广西大学林学院 南宁 530004

摘要 漆酶 (Lac) 和锰过氧化物酶 (MnP) 是木质素降解酶系主要成员, 不同浓度 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 下特定真菌菌株的 Lac 和 MnP 活性、金属耐受性与移除能力有待深入探索. 以奶油栓孔菌 (*Trametes lactinea*) 为材料, 通过控制液体培养基初始 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度, 观测不同浓度铜锰离子对 Lac 和 MnP 活性、菌丝体生长、黑色素产量及最终离子浓度的影响. 结果显示, Lac 活性含 Cu^{2+} 各处理均优于对照, 后 20 d 高于前 20 d. 前 20 d, 0.5 和 1.0 mmol/L Cu^{2+} 诱导效果较好; 后 20 d, 10.0 mmol/L 的 Lac 活性最高. 2.0、3.0 和 10.0 mmol/L Cu^{2+} 诱导 Lac 活性, 也抑制菌丝体生长, 不过该菌株能降低 Cu^{2+} 浓度. 0.5、0.7 和 1.0 mmol/L Mn^{2+} 的 Lac 活性诱导效果相对稳定, 2.0、5.0 和 10.0 mmol/L 的波动较大, 仅 10.0 mmol/L 对菌丝体生长有微弱抑制. Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 均诱导 MnP 活性, 但 MnP 活性低. 该菌 Cu^{2+} 胁迫下产生更多黑色素, 对 Mn^{2+} 耐受性较强. 0.5-10.0 mmol/L 范围内该菌株 Cu^{2+} 移除能力随初始浓度增加而增强. 本研究表明 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 都能诱导该菌株产生更强的 Lac 和 MnP 活性; 该菌株有较好的 Cu^{2+} 移除能力, 对 Mn^{2+} 耐受性强于 Cu^{2+} ; 结果可为木质素降解酶活性诱导、高产漆酶菌株发掘和重金属污染生物修复等提供参考. (图 10 表 4 参 56)

关键词 奶油栓孔菌; 漆酶; 锰过氧化物酶; 菌丝体生长; 金属耐受

Lignin-degrading enzymatic activities, tolerance, and removal ability of *Trametes lactinea* under the addition of Cu^{2+} and Mn^{2+}

LIU Haiyu, SHEN Lu, LIANG Shenghuan & CHENG Fei✉

College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract Laccase (Lac) and manganese peroxidase (MnP) are the two major lignin-degrading enzymes. Under different concentrations of Cu^{2+} and Mn^{2+} , the Lac and MnP activities, metal tolerance, and removal capability of specific fungal strains need further exploration. In this study, a strain of *Trametes lactinea* was used as a research model to observe the effects of Cu^{2+} and Mn^{2+} on Lac and MnP activity, mycelial growth, melanin production, and final ion concentration by controlling the initial concentrations of Cu^{2+} and Mn^{2+} in the liquid culture medium. The results showed that the Lac activity of each treatment supplemented with Cu^{2+} was greater than that of the control and was higher in the last 20 days than in the first 20 days. In the first 20 days, 0.5 and 1.0 mmol/L Cu^{2+} had better induction effects. Lac activity at 10.0 mmol/L was the highest during the last 20 days. Cu^{2+} (2.0, 3.0, and 10.0 mmol/L) induced Lac activity and inhibited mycelia growth; however, the strain reduced the Cu^{2+} concentration. For Mn^{2+} , the induction effects of 0.5, 0.7, and 1.0 mmol/L on Lac activity were relatively stable. However, the activities of 2.0, 5.0, and 10.0 mmol/L showed evident fluctuations, and only 10.0 mmol/L weakly inhibited the mycelia growth. Both Cu^{2+} and Mn^{2+} induced MnP activity; however, the MnP activity was low. This strain produced more melanin under Cu^{2+} stress and exhibited strong tolerance to Mn^{2+} . The Cu^{2+} removal capacity of the strain increased as the concentration increased from 0.5 to 10.0 mmol/L. In summary, both Cu^{2+} and Mn^{2+} were powerful inducers of Lac and MnP activities in the strain, which could remove Cu^{2+} and was more tolerant to Mn^{2+} than to Cu^{2+} . This study provides a reference for the induction of lignin-degrading enzyme activity, the identification of laccase-producing strains, and the bioremediation of heavy metal pollution.

Keywords *Trametes lactinea*; laccase; manganese peroxidase; mycelium growth; metal tolerance

收稿日期 Received: 2022-06-28 接受日期 Accepted: 2023-01-04

国家自然科学基金项目 (32160359) 和广西自然科学基金项目 (2017GXNSFAA198007) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (32160359) and Natural Science Foundation of Guangxi, China (2017GXNSFAA198007)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: feicheng@gxu.edu.cn)

漆酶 (laccase, Lac) 是一类含铜多酚氧化酶, 催化许多有机和无机底物, 尤其是酚类的单电子氧化, 在介质存在下能降解非酚类物质, 水通常是除氧化产物外的唯一产物^[1-2], 已在生物制浆、染料脱色、环境修复和工业废水处理^[3-5]等领域得到一定应用。相比其他来源Lac, 一些真菌Lac氧化还原电位更高, 参与木质纤维素降解, 催化能力更强^[6]。锰过氧化物酶 (manganese peroxidase, MnP) 是含血红素的糖蛋白, 能氧化众多酚类物质, 在介质协助下可降解非酚类物质, 和Lac同为木质素降解酶系主要成员^[7-9]。

铜是Lac结构和功能基本单元的组分, Lac结构上大多含4个铜^[9-10]。Cu²⁺显著诱导毛头鬼伞 (*Coprinus comatus*)、云芝栓孔菌 (*Trametes versicolor*)、硬毛栓孔菌 (*Trametes trogii*)、毛栓孔菌 (*Trametes hirsuta*) Lac活性, 抑制革耳 (*Panus rudi*) Lac活性^[11-15]。MnP晶体结构含Mn²⁺结合位点, 偏好Mn²⁺作其单电子供体^[7, 16]。Mn²⁺显著诱导毛头鬼伞、黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) Lac活性^[11, 17]。0.5 mmol/L Mn²⁺促进烟管孔菌 (*Bjerkandera adusta*) MnP活性, 而0.5 mmol/L Cu²⁺则有抑制作用^[18]。铜和锰是真菌生长发育和功能运转必需的微量元素, 同时是重金属, 过量会毒害真菌^[19-20], 但不少微生物对它们有一定的耐受性或移除能力^[21-22]。CuSO₄和MnSO₄是许多真菌常用的Lac和MnP活性诱导剂, 诱导剂及其浓度是影响酶活性的最关键因素, 然而它们具体的诱导能力、最适诱导浓度以及菌丝体对Cu²⁺、Mn²⁺耐受性和移除能力, 不同真菌物种乃至菌株可能差异甚大^[6, 11-15, 17-18], 因此有必要就特定菌株开展相关探究。

栓孔菌是出色的Lac生产者, 在我国种类多分布广^[23-26]。奶油栓孔菌 (*Trametes lactinea*) 是热带和亚热带地区栓孔菌属常见的一种白腐菌^[26], 所产栓孔菌酸、多糖等被认为是潜在的新药来源^[27-28]。相同培养条件下, 该菌的Lac活性高于红栓孔菌 (*Trametes coccinea*) 不亚于云芝栓孔菌^[29]。该菌产黑色素, 对胁迫的忍耐力较强^[22, 29]。然而, 有关Cu²⁺和Mn²⁺对奶油栓孔菌Lac和MnP活性的诱导效果以及该菌对它们的耐受性和移除能力的研究尚无。该菌是桉树人工林较常见的木材腐朽菌, 本研究以从桉树伐桩分离纯化得到奶油栓孔菌菌株为研究材料, 研究不同浓度外源Cu²⁺和Mn²⁺添加对Lac和MnP活性、菌丝体生长、黑色素产量及最终离子浓度的影响, 讨论液体培养过程中菌丝体对Cu²⁺和Mn²⁺的耐受性和移除能力, 以期为木质纤维素降解酶活性诱导、高产菌株发掘和重金属污染生物修复等提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料来源

2021年4月奶油栓孔菌子实体采自广西国有七坡林场桉树二代林皆伐后的伐桩, 经分离纯化获得纯培养物。菌种用PDA活化, 之后转接至新的PDA上, 待菌丝体铺满后开展后续实验。

1.2 外源Cu²⁺和Mn²⁺添加下漆酶和锰过氧化物酶活性

1.2.1 菌丝体液体培养 金属离子添加实验用PDJ液体培养基。与PDA相比, PDJ不加琼脂, 但加入2.0 g酵母膏, 其余成分与PDA相同。向PDJ液体培养基中分别只加CuSO₄或MnSO₄。Cu²⁺浓度梯度为0 (CK, 未添加)、0.5、1.0、2.0、3.0和10.0 mmol/L, Mn²⁺浓度梯度为0 (CK, 未添加)、0.5、0.7、1.0、2.0、5.0和10.0 mmol/L。无菌条件下, 各瓶接入4个直径0.5 cm的菌块, 各浓度设3个重复。接种后透气封口膜封口, 再

裹上无菌保鲜袋, 30 °C下振荡 (130 r/min) 发酵。接种后每隔5 d在无菌条件, 从各处理的3个重复内分别先吸取2.0 mL菌液移至对应的3个离心管, 再从这3个重复内分别吸取0.7 mL菌液都累加到同1个离心管作为该处理酶活测定时的空白对照, 空白对照高温灭活。所有离心管4 °C、13 000 r/min离心25 min, 上清液为粗酶液。

1.2.2 酶活性测定 Lac活性测定采用ABTS法^[30]。由酶液10 μL、0.08 mol/L pH 5.0的醋酸钠缓冲液95 μL和底物10 mmol/L的ABTS 95 μL混匀成200 μL的反应体系, 于30 °C测定3 min内反应体系在420 nm处的吸光度。MnP活性测定采用2, 6-二甲苯酚 (2,6-dimethylphenol, 2,6-DMP) 法^[31]。300 μL反应体系中含0.05 mol/L醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 60 μL、1 mmol/L 2,6-DMP溶液60 μL、1 mmol/L MnSO₄溶液60 μL、粗酶液100 μL和2.0 mmol/L H₂O₂ 20 μL, 于30 °C测定3 min内反应体系在469 nm处的吸光度。1 U酶活的定义为每分钟转化1 μmol底物或生成1 μmol产物所需的酶量。各处理空白对照使用上述对应的灭活菌液替换活性菌液进行。

1.3 液体培养下Cu²⁺和Mn²⁺终浓度、菌丝体生物量和黑色素含量

1.3.1 Cu²⁺和Mn²⁺最终浓度测定 培养结束时, 培养液中Cu²⁺浓度用乙胺基二硫代甲酸分光光度法^[32]测定, Mn²⁺浓度用电感耦合等离子体原子发射光谱法^[33]测定。

1.3.2 菌丝体生物量测定 滤纸60 °C下烘干至恒重并称重, 过滤法分离菌丝体和菌液, 菌丝体连同滤纸烘干至恒重, 以过滤后烘干滤纸和菌丝体总干重与过滤前烘干滤纸干重的差值为菌丝体生物量。

1.3.3 黑色素粗品含量测定和表征 参照Dullah等的方法^[29]并稍做改动。以1 mol/L NaOH将过滤后的菌液pH调至约10.0, 高压灭菌30 min, 6 000 r/min离心10 min去除杂质, 上清液以1 mol/L HCL将pH调至约2.0, 4 °C静置过夜, 7 500 r/min离心10 min, 60 °C烘干, 称重。将各处理的黑色素粗品充分混匀, 用紫外可见分光光度计和傅里叶红外光谱仪对混样进行定性分析^[29]。

1.4 数据分析

用IBM SPSS Statistics 25.0进行单因素差异分析, 先检验组间数据的方差齐性, 若Levene检验 $P > 0.05$, 则进行单因素方差分析和Waller-Duncan多重比较, 否则进行Kruskal-Wallis秩和非参数检验。双因素非参数检验使用R4.1.1的ARTool包的art和anova函数进行^[34]。对于差异分析, 若 $P < 0.05$ 则认为处理间差异显著, $P < 0.01$ 则认为处理间差异极显著。Pearson相关性分析用于探讨酶活性、菌丝体生物量与Cu²⁺和Mn²⁺浓度间的关系。R4.1.1等软件绘制图表。

2 结果与分析

2.1 Cu²⁺浓度对奶油栓孔菌酶活的影响

2.1.1 Lac活性 培养天数相同Cu²⁺浓度不同Lac活性差异显著 (图1, $P < 0.05$)。酶活随培养天数增加呈明显波动, 但总体上, 第25-40天 (d 25-40) 的酶活性高于d 5-20, 从d 5的0-27.8 U/L上升至d 40的64.0-920.0 U/L。对比无Cu²⁺的空白对照, d 5, 各处理与对照均无显著差异; d 10, 1.0 mmol/L Cu²⁺处理显著促进酶活; d 15, 0.5 mmol/L显著促进酶活; d 20, 0.5和10.0 mmol/L显著促进酶活; d 25, 0.5、2.0和10.0 mmol/L显著促进酶活; d 30, 1.0和10.0 mmol/L显著促进酶活; d 35-40, 5个浓度处理均显著促进酶活。从整体看, Cu²⁺

浓度、培养天数以及两者的交互作用都极显著影响Lac活性(表1, $P < 0.01$)。

表1 Cu^{2+} 浓度和培养天数对奶油栓孔菌漆酶活性影响的双因素非参数检验
Table 1 Two-factor nonparametric test for the effects of Cu^{2+} concentration and culture days on laccase activity of *Trametes lactinea*

因素 Factor	自由度 Degree of freedom	F值 F value	显著性 Significance
浓度 Concentration	5	121.513	**
天数 Days	7	98.155	**
浓度×天数 Concentration × days	35	14.441	**

“***”表示差异极显著($P < 0.01$)。

“***” represents extremely significant differences ($P < 0.01$).

2.1.2 MnP活性 培养天数相同 Cu^{2+} 浓度不同MnP活性差异显著(图2, $P < 0.05$)。培养天数增加,酶活性明显波动,但总体上, d 25-40的活性高于d 5-20,从d 5的0.6-1.5 U/L上升至d 40的1.5-12.0 U/L。与对照相比, d 5, 3.0 mmol/L Cu^{2+} 处理

显著促进酶活; d 10, 各处理与对照无显著差异; d 15, 0.5和3.0 mmol/L显著促进酶活; d 20, 10.0 mmol/L显著促进酶活; d 25, 各处理与对照无显著差异; d 30, 10.0 mmol/L显著促进酶活; d 35, 0.5和10.0 mmol/L显著促进酶活; d 40, 0.5和10.0 mmol/L显著促进酶活。从整体看, Cu^{2+} 浓度、培养天数和它们的交互作用都极显著影响MnP活性(表2, $P < 0.01$)。

表2 Cu^{2+} 浓度和培养天数对奶油栓孔菌锰过氧化物酶活性影响的双因素非参数检验

Table 2 Two-factor nonparametric test for the effects of Cu^{2+} concentration and culture days on manganese peroxidase activity of *Trametes lactinea*

因素 Factor	自由度 Degree of freedom	F值 F value	显著性 Significance
浓度 Concentrations	5	32.242	**
天数 Days	7	20.234	**
浓度×天数 Concentrations × days	35	7.316	**

“***”表示差异极显著($P < 0.01$)。

“***” represents extremely significant differences ($P < 0.01$).

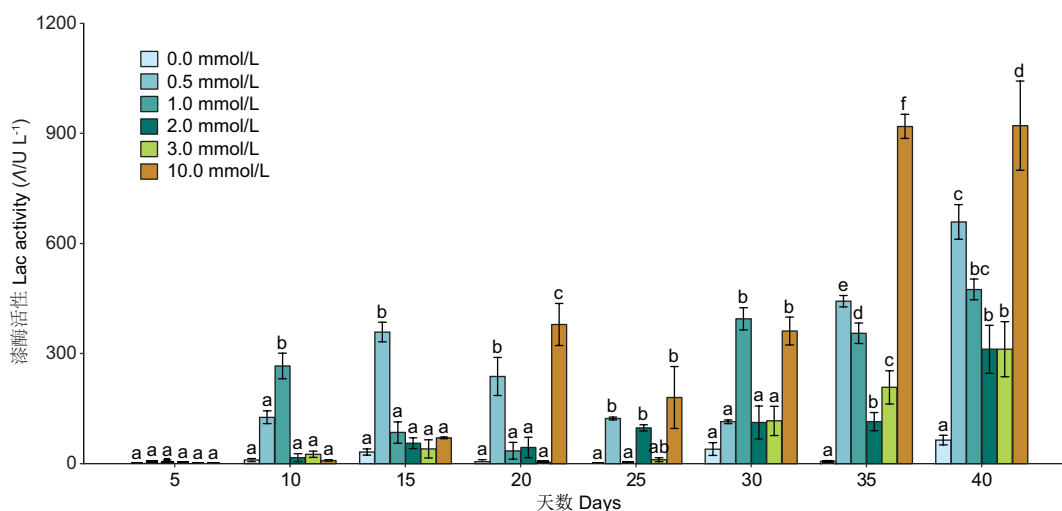


图1 不同浓度 Cu^{2+} 处理下奶油栓孔菌液体培养过程中漆酶活性变化。数据以平均值±标准误差($N = 3$)形式表示;不同小写字母表示同一天数不同浓度 Cu^{2+} 处理间差异显著($P < 0.05$);下同。

Fig. 1 Variations in laccase activities of *Trametes lactinea* in liquid culture treated with different concentrations of Cu^{2+} . Data are expressed as means ± standard error ($N = 3$). Different lowercase letters indicate that significant differences exist between treatments with different concentrations of Cu^{2+} on the same day ($P < 0.05$). The same as below.

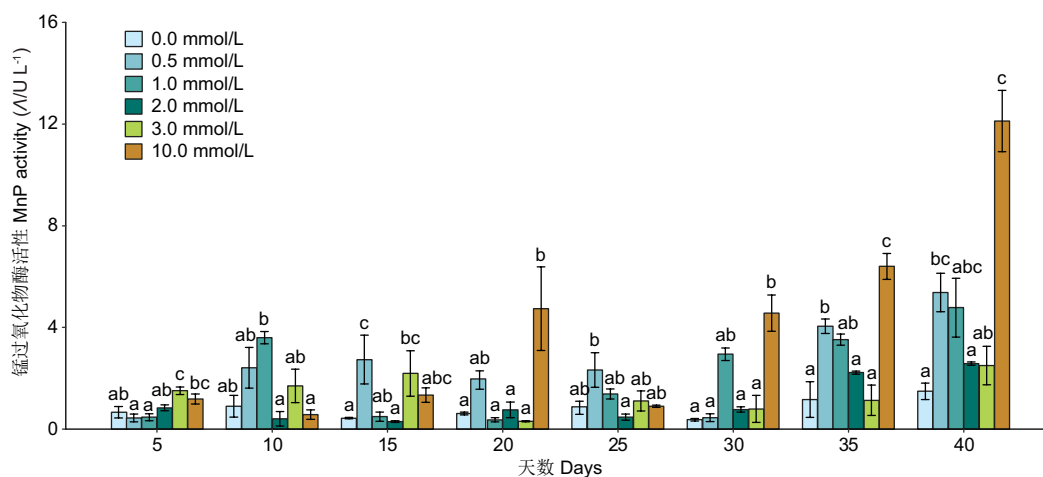


图2 不同浓度 Cu^{2+} 处理下奶油栓孔菌液体培养过程中锰过氧化物酶活性变化。

Fig. 2 Variations in manganese peroxidase activities of *Trametes lactinea* in liquid culture treated with different concentrations of Cu^{2+} .

2.2 Cu^{2+} 浓度对奶油栓孔菌酶活的影响

2.2.1 Lac活性 培养天数相同 Mn^{2+} 浓度不同Lac活性差异显著(图3, $P < 0.05$)。菌液中Lac活性大体呈d 10明显上升d 15回落,之后相对平稳或逐渐回升的趋势。对比无 Mn^{2+} 空白处理, d 5,各处理均显著促进酶活; d 10,除5.0 mmol/L,其余处理均显著促进酶活; d 15,0.5和1.0 mmol/L显著促进酶活; d 20,除2.0 mmol/L,其余处理均显著促进酶活; d 25,0.5、0.7、1.0和5.0 mmol/L显著促进酶活; d 30,0.5和5.0 mmol/L显著促进酶活; d 35,0.5、0.7和5.0 mmol/L显著促进酶活; d 40,0.5、0.7、2.0和5.0 mmol/L显著促进酶活。从整体看, Mn^{2+} 浓度、培养天数和它们的交互作用都极显著影响Lac活性(表3, $P < 0.01$)。

2.2.2 MnP活性 培养天数相同 Mn^{2+} 浓度不同MnP活性差异显著(图4, $P < 0.05$)。菌液中MnP活性大体呈d 10明显上升, d 15大幅回落,之后相对平稳或逐渐回升的趋势。对比无 Mn^{2+} 空白处理, d 5,2.0和5.0 mmol/L显著促进酶活; d 10,0.5、0.7、1.0和10.0 mmol/L显著促进酶活; d 15,1.0 mmol/L

表3 Mn^{2+} 浓度和培养天数对奶油栓孔菌漆酶活性影响的双因素非参数检验

Table 3 Two-factor nonparametric test for the effects of Mn^{2+} concentration and culture days on laccase activity of *Trametes lactinea*

因素 Factor	自由度 Degree of freedom	F值 F value	显著性 Significance
浓度 Concentration	6	25.245	**
天数 Days	7	26.858	**
浓度×天数 Concentration × days	42	3.003	**

“***”表示差异极显著($P < 0.01$)。

“***” represents extremely significant differences ($P < 0.01$).

显著促进酶活; d 20,1.0 mmol/L显著促进酶活; d 25、35和40,各处理与对照无显著差异; d 30,0.5、0.7和1.0 mmol/L显著促进酶活。从整体看, Mn^{2+} 浓度、培养天数和它们的交互作用都极显著影响MnP活性(表4, $P < 0.01$)。

2.3 菌液颜色

相比无 Cu^{2+} 对照,5个 Cu^{2+} 浓度处理的菌液呈现明显发黑,且黑色程度随 Cu^{2+} 浓度增加而明显变深(图5A)。然而,6

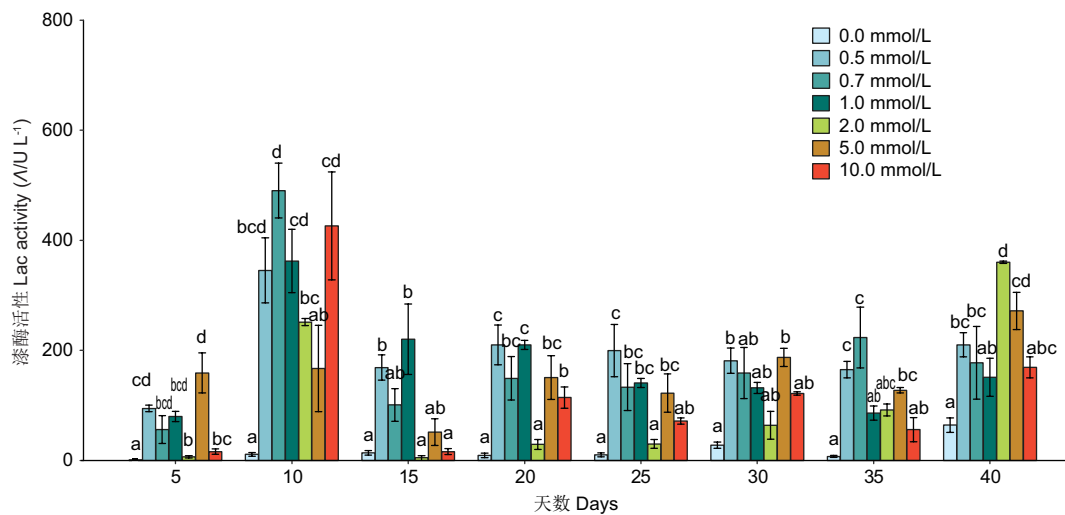


图3 不同浓度 Mn^{2+} 处理下奶油栓孔菌液体培养过程中漆酶活性变化。数据以平均值±标准误差($N = 3$)形式表示;不同小写字母表示同一天数不同浓度 Mn^{2+} 处理间差异显著($P < 0.05$);下同。

Fig. 3 Variations in laccase activities of *Trametes lactinea* in liquid culture treated with different concentrations of Mn^{2+} . Data are expressed as means ± standard error ($N = 3$). Different lowercase letters indicate that significant differences exist between treatments with different concentrations of Mn^{2+} on the same day ($P < 0.05$). The same as below.

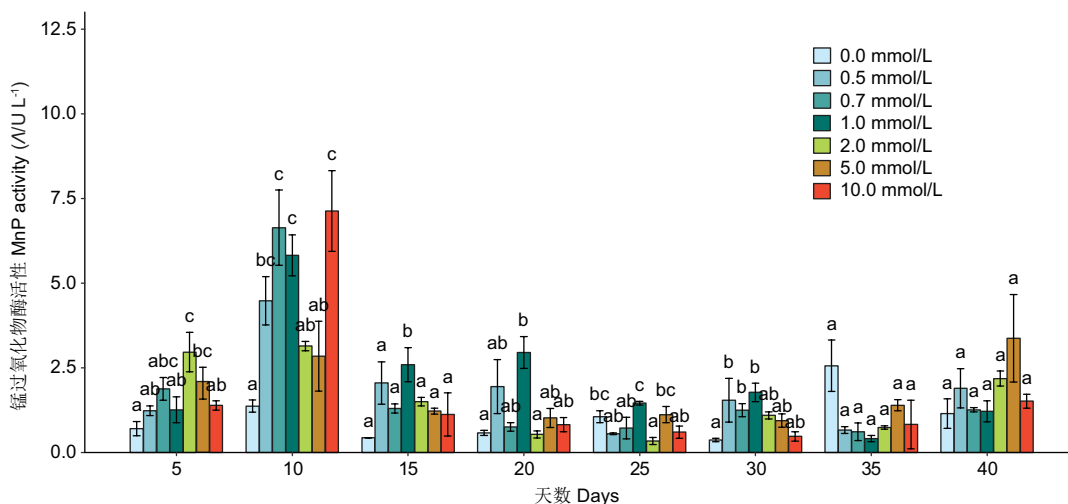


图4 不同浓度 Mn^{2+} 处理下奶油栓孔菌液体培养过程中锰过氧化物酶活性变化。

Fig. 4 Variations in manganese peroxidase activities in liquid culture of *Trametes lactinea* treated with different concentrations of Mn^{2+} .

表4 Mn^{2+} 浓度和培养天数对奶油栓孔菌锰过氧化物酶活性影响的双因素非参数检验

Table 4 Two-factor nonparametric test for the effects of Mn^{2+} concentration and culture days on manganese peroxidase activity of *Trametes lactinea*

因素 Factor	自由度 Degree of freedom	F值 F value	显著性 Significance
浓度 Concentration	6	7.225	**
天数 Days	7	19.365	**
浓度×天数 Concentration × days	42	3.612	**

“***”表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

“***” represents extremely significant differences ($P < 0.01$).

个 Mn^{2+} 浓度处理的菌液颜色与无 Mn^{2+} 对照相比无明显差异,颜色未明显发黑(图5B)。

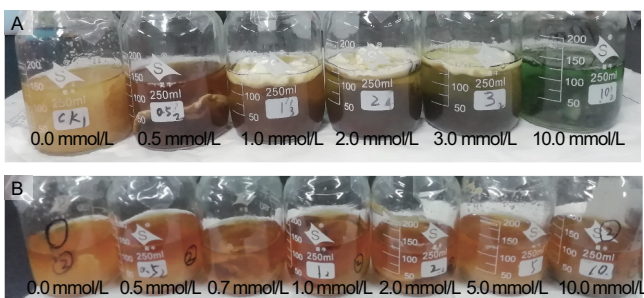


图5 培养40天后菌液颜色。A, B: Cu^{2+} 处理和 Mn^{2+} 处理。

Fig. 5 Colour of liquid medium with mycelia after 40 d culture. A, B: Cu^{2+} treatment and Mn^{2+} treatment.

2.4 黑色素粗品含量及其定性表征

菌丝体培养40 d后,不同 Cu^{2+} 浓度处理的黑色素粗品含量差异显著(图6, $P < 0.05$)。黑色素粗品含量大体随 Cu^{2+} 浓度增加而显著增加。与 Cu^{2+} 不同,相比对照,仅10.0 mmol/L Mn^{2+} 处理的黑色素粗品含量明显较高。

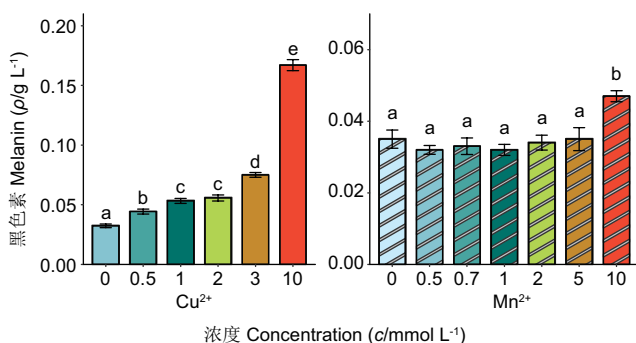


图6 不同浓度 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 处理下奶油栓孔菌菌丝体产黑色素粗品含量。数据以平均值±标准误差($N = 3$)形式表示;不同小写字母表示不同处理差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 6 Amount of coarse melanin produced by *Trametes lactinea* treated with different concentrations of Cu^{2+} or Mn^{2+} . Data are expressed as means ± standard error ($N = 3$). Different lowercase letters indicate that significant differences exist between different treatments ($P < 0.05$).

如图7A,黑色素粗品在230 nm处有最大吸收峰,之后快速下降,为典型的黑色素吸收轮廓^[35-36]。

如图7B,该菌株的黑色素粗品在3 403、3 284处的特征吸收峰和在3 300-3 500范围的宽吸收与O—H和N—H的伸缩振动有关,2 922处的特征吸收峰则与C—H的振动有关,1

649处的特征峰与C=C、COO—、C=O的振动有关,1 077处的吸收峰与酚类的C—O或羧基振动有关^[35-36]。该菌株黑色素粗品的红外光谱特征与木耳(*Auricularia auricula*)的较为相似^[36]。

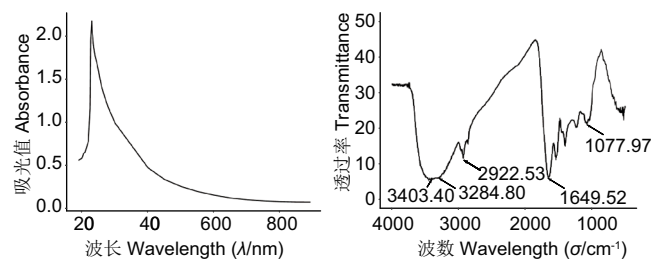


图7 奶油栓孔菌黑色素粗品光谱特征。A: 紫外-可见光谱; B: 傅里叶变换红外光谱。

Fig. 7 Spectroscopic characterization of coarse melanin of *Trametes lactinea*. A: Ultraviolet-visible spectrum; B: Fourier-transform infrared spectroscopy spectrum.

2.5 菌丝体最终生物量

菌丝体培养40 d后,不同浓度 Cu^{2+} 处理的生物量差异显著(图8, $P < 0.05$)。0.5 mmol/L生物量最大,显著高于2.0、3.0和10.0 mmol/L,而3.0 mmol/L生物量最小。大体上,低浓度 Cu^{2+} 处理的生物量较高,说明 Cu^{2+} 浓度过高抑制奶油栓孔菌菌丝体生长。与 Cu^{2+} 不同,40 d后,相比对照,仅10.0 mmol/L Mn^{2+} 处理的生物量显著较低(图8, $P < 0.05$),其他的均与对照无显著差异。

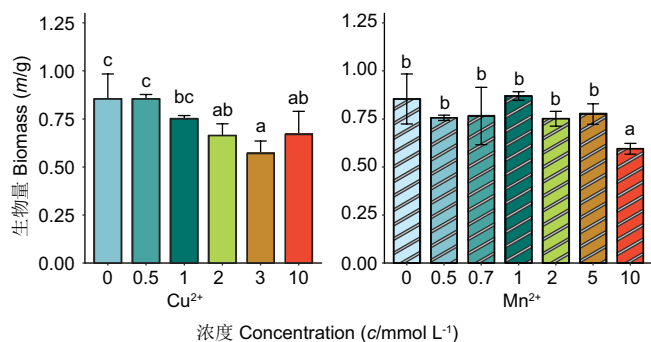


图8 不同浓度 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 处理下奶油栓孔菌菌丝体生物量。数据以平均值±标准误差($N = 3$)形式表示;不同小写字母表示不同处理差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 8 Mycelial biomass of *Trametes lactinea* treated with different concentrations of Cu^{2+} or Mn^{2+} . Data are expressed as means ± standard error ($N = 3$). Different lowercase letters indicate that significant differences exist between different treatments ($P < 0.05$).

2.6 最终离子浓度与初始浓度的比值

各处理的 Cu^{2+} 最终浓度较初始浓度均呈下降趋势,最终浓度为初始浓度的84.58%、69.69%、56.29%、51.66%、44.99%,10.0 mmol/L降幅最大,0.5 mmol/L降幅最小,降幅大体随浓度增加而增加(图9)。与 Cu^{2+} 不同,各 Mn^{2+} 处理的最终浓度与其最初浓度相比变化很小,仅微弱下降(图9)。

2.7 酶活性、菌丝体生物量和离子浓度之间的关系

各浓度 Cu^{2+} 处理下,Lac与MnP活性呈极显著正相关,2种酶活性均与初始和最终 Cu^{2+} 浓度极显著正相关(图10, $P < 0.01$)。生物量与 Cu^{2+} 浓度负相关但不显著,与Lac和MnP活性均无显著相关性。

各浓度 Mn^{2+} 处理下,Lac与MnP活性呈极显著正相关(图

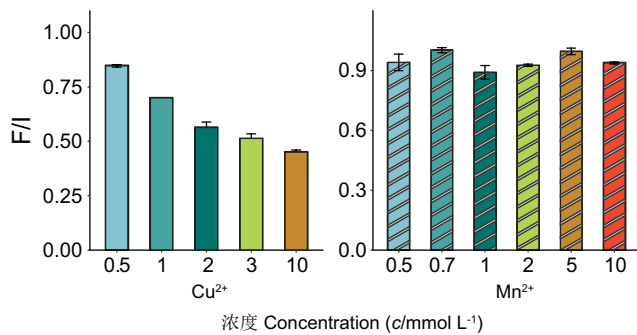


图9 液体培养基中 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 最终浓度与初始浓度的比值。F/I表示最终离子浓度与初始离子浓度的比值；数据以平均值±标准误差 ($N = 3$) 形式表示。

Fig. 9 Ratio of final Cu^{2+} and Mn^{2+} concentrations to the initial ones of the liquid medium. F/I is the ratio of final ion concentrations to initial ones. Data are expressed as means \pm standard error ($N = 3$).

10, $P < 0.01$), 2种酶活性与初始和最终 Mn^{2+} 浓度均无显著相关性。生物量与 Mn^{2+} 浓度极显著正相关(图10, $P < 0.01$), 与Lac和MnP活性均无显著相关性。

3 讨论

3.1 培养体系添加 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 对奶油栓孔菌Lac和MnP活性的影响

Lac活性与酶产量(表达量)、同工酶组成、酶活性本身及酶稳定性有关, 而它们皆受 Cu^{2+} 影响^[11-12]。本研究各处理Lac活性均高于对照, 可见培养体系添加 Cu^{2+} 促进Lac活性。物种乃至菌株不同, Lac活性诱导的最适 Cu^{2+} 浓度不同^[6, 11-15, 17]。本研究, 0.5和1.0 mmol/L Cu^{2+} 自d 10表现出持续的酶活促进作用; 而10.0 mmol/L d 20开始明显促进酶活, d 35-40效果最强, 且显著高于0.5和1.0 mmol/L。因此, 该菌培养短于20 d, 0.5和1.0 mmol/L Cu^{2+} 的Lac活性促进效果较好, 否则10.0 mmol/L效果更佳。前人发现, 真菌Lac对 Cu^{2+} 的稳定性强, 一定浓度的 Cu^{2+} 对Lac活性本身有一定促进作用^[12, 37-39]。反应体系100 mmol/L Cu^{2+} 仅略微抑制大白口蘑(*Tricholoma giganteum*) Lac活性^[37], 800 mmol/L Cu^{2+} 仅略微抑制灵芝(*Ganoderma lucidum*) Lac活性^[38]。本研究2.0、3.0、10.0

mmol/L Cu^{2+} 均抑制菌丝体生长, 但其Lac活性却显著高于对照, 可知0.5-10.0 mmol/L Cu^{2+} 对该菌Lac的稳定性无明显影响。 Cu^{2+} 对平菇(*Pleurotus ostreatus*) Lac活性本身的促进作用为阈值激活型, 反应体系添加0.25-1.0 mmol/L Cu^{2+} , Lac活性本身均提升约1.75倍^[12]。类似地, 将云芝栓孔菌Lac与纳米铜一起包埋固定, Lac活性提高1.7倍^[39]。而本研究, 相比对照 Cu^{2+} 对Lac活性的促进效果远超2倍, 说明除对Lac活性的直接促进作用外, Cu^{2+} 也可能还诱导Lac产量增加或同工酶表达。 Cu^{2+} 过量会毒害真菌^[19-20]。10.0 mmol/L Cu^{2+} 处理的Lac活性前15 d很低, 而之后显著高于对照。观察发现该处理菌丝体生长受到严重抑制, 生物量15 d后才开始明显积累, 故推测前15 d其Lac活性低是菌丝体生物量少Lac产量低所致。2.0、3.0、10.0 mmol/L Cu^{2+} 均造成胁迫, 但仅10.0 mmol/L Lac活性在后期高于1.0 mmol/L。这可能与Lac参与重金属等胁迫应激反应有关^[29, 40-41], 10 mmol/L造成的胁迫更强, 引发的应激机制和反应也更强, 当生物量积累到一定程度需要产生更多Lac应对胁迫。相似地, 奶油栓孔菌与云芝栓孔菌共培养时Lac活性升高被认为是2种真菌相互竞争导致活性氧胁迫增强所致^[29]。Lac活性时间变化为前20 d有一个活性峰值, 之后下降, d 35-40活性高于之前的峰值。该结果与Pillet等用不同浓度 Cu^{2+} 连续40 d诱导云芝栓孔菌Lac活性以及An等用2.0 mmol/L Cu^{2+} 连续20 d诱导平菇Lac活性的结果相似, 都观察到多个活性峰值, 最大峰值在培养后期^[12, 42]。碳氮营养限制诱导许多真菌Lac活性^[6], Lac活性有多个峰值, 最大峰值在培养后期, 可能是因为培养时间较长导致营养限制。类似地, d 40 2.0 mmol/L Mn^{2+} 处理的Lac活性显著高于d 35。

Mn^{2+} 也是奶油栓孔菌Lac活性的强力诱导剂, 物种乃至菌株不同, 适宜的 Mn^{2+} 诱导浓度也差异明显^[11, 17, 42]。本研究, 各 Mn^{2+} 处理的Lac活性均在d 10出现一个峰值, 其中0.7 mmol/L处理的Lac活性最高。之后Lac活性明显下降, 0.5、0.7和1.0 mmol/L处理的Lac活性下降到一定程度后在d 15-40保持相对稳定, 而较高浓度处理的Lac活性在d 15触底后明显回升, d 40天2.0和5.0 mmol/L处理的Lac活性甚至高于第一个峰值。0.5、0.7和1.0 mmol/L Mn^{2+} 的酶活性诱导效果较为稳定, 而2.0、5.0和10.0 mmol/L则波动较大。因此, 综合考虑最大Lac活性和酶活活动情况, 以 Mn^{2+} 作诱导剂, 0.7 mmol/L是合适的Lac诱导浓度。本研究10.0 mmol/L的 Mn^{2+} 对该菌株造成的胁迫

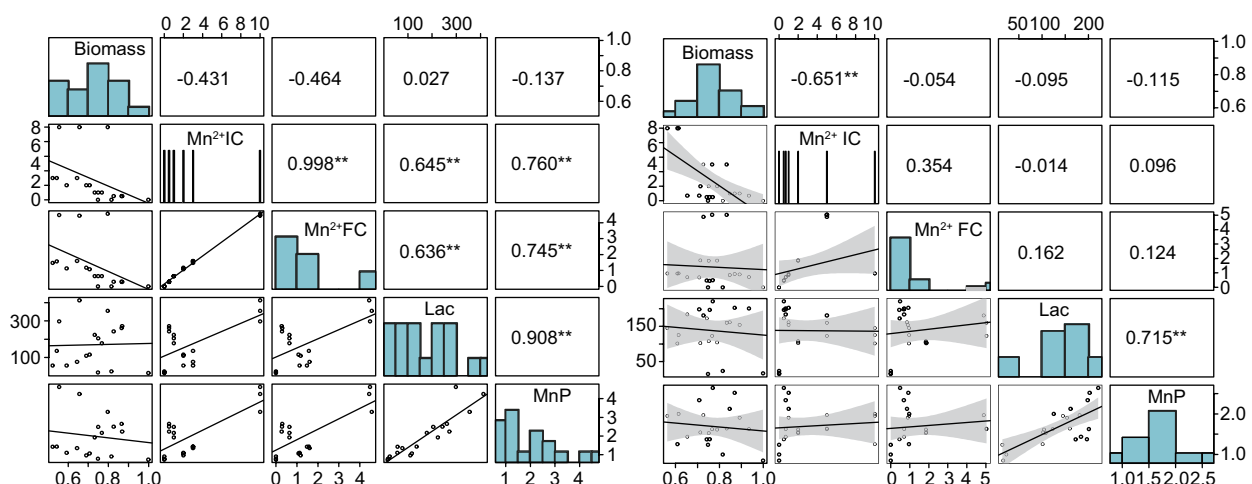


图10 Lac活性、MnP活性、菌丝体生物量及 Cu^{2+} 或 Mn^{2+} 浓度的皮尔逊相关。IC、FC分别表示初始与最终离子浓度。

Fig. 10 Pearson correlation among laccase activity, manganese peroxidase activity, mycelium biomass and Cu^{2+} or Mn^{2+} concentration. IC and FC represent initial and final ion concentrations respectively.

迫很小,强度远比不上相同浓度的 Cu^{2+} ,这可能是未观察到胁迫下有更高Lac活性现象的原因。

本研究发现, Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 均显著促进MnP活性,能诱导MnP产生,但MnP活性很低。真菌物种间或种内的产酶特性可能存在明显差异^[6, 43]。Dullah等发现相同条件下奶油栓孔菌产Lac活性高于红栓孔菌,不亚于云芝栓孔菌^[29]。本研究Lac活性远高于MnP活性,未检测到木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)活性。Naidu等发现奶油栓孔菌可以产3种木质素降解酶,但MnP和LiP活性远低于Lac^[44]。因此,可能是产酶特性导致奶油栓孔菌产Lac活性较高,MnP较低。编码LiP的基因多为诱导型,受碳氮营养限制的调控^[45-46]。此外,液体培养会显著抑制LiP和MnP的活性^[47-48]。本研究所用培养基氮素较为充足,采用液体培养,可能是MnP活性低,未检测到LiP活性的另一原因。

3.2 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 毒害与奶油栓孔菌的耐受性

铜锰是重金属元素,过量会毒害生物体,甚至造成污染。本研究,2.0、3.0、10.0 mmol/L Cu^{2+} 和10.0 mmol/L Mn^{2+} 处理的生物量显著小于对照,说明 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 过量会毒害奶油栓孔菌菌丝体。重金属胁迫下,微生物通过多种途径譬如酶、金属结合蛋白、色素、特殊转录因子、外排系统、有机酸以及胞外聚合物等方式应对,其中色素会引起菌丝体或菌液的颜色明显改变^[21-22]。奶油栓孔菌能产生更多的黑色素抵御环境胁迫^[29, 49]。类似地,Portis等发现 Cu^{2+} 胁迫下柳氏副球孢子菌(*Paracoccidioides lutzii*)产生更多的黑色素以对抗 Cu^{2+} 胁迫^[50]。本研究,相比对照含 Cu^{2+} 菌液发黑且黑色随浓度增加而加深,黑色素生成是菌液发黑的原因,且 Cu^{2+} 浓度越高黑色素含量越高,可见菌株与 Cu^{2+} 胁迫对抗强烈。与 Cu^{2+} 不同,奶油栓孔菌对 Mn^{2+} 的敏感性较低,仅10.0 mmol/L下受到较弱的抑制,菌液中 Mn^{2+} 浓度下降幅度小,菌液未明显发黑,黑色素含量也低,可见应激反应不强。Lac与黑色素合成有关^[41],本研究 Mn^{2+} 显著促进Lac活性,也促进黑色素生成,但相比 Cu^{2+} 处理其产量明显更少。总之,同等浓度下 Cu^{2+} 导致的胁迫更强,菌丝体产生更多黑色素,而 Mn^{2+} 造成的胁迫较小,黑色素产量也少,该菌株对 Mn^{2+} 的耐受性强于 Cu^{2+} 。

3.3 奶油栓孔菌对 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 的移除与重金属污染的生物修复潜力

通过生物吸附、微沉淀、胞内积累、生物氧化和还原等,不少微生物具有移除受污染土壤、水体中过量重金属离子的能力^[22]。本研究中,40 d后,5个处理的 Cu^{2+} 浓度由初始的0.5、1.0、2.0、3.0和10.0 mmol/L分别降至原来的84.58%、69.69%、56.29%、51.66%和44.99%,移除效率随初始浓度增加而增强。该菌株 Cu^{2+} 移除能力不亚于塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)菌株AF3^[21]。该菌移除 Cu^{2+} 的能力随胁迫强度增加而上升,可能是其应激反应和机制随所受胁迫度增加而增强的结果。黑色素能吸附污水中的铜、铅等

重金属离子,与 Cu^{2+} 亲和力最强^[51-52]。前人通过傅里叶红外光谱、电子顺磁共振等技术证明黑色素具有羧基、氨基、羟基等官能团,可以通过离子交换、络合作用、螯合作用等方式吸附金属离子^[52-54]。真菌黑色素是一类由吡啶或酚类单体形成的非均相多聚物组成的复杂次生代谢物,对黑色素的核磁共振、2维核磁共振结果表明黑色素具有脂肪族和芳香族结构^[55]。Sun等借助核磁共振光谱在木耳(*Auricularia auricular*)黑色素中检测到明显的脂肪族和芳香族信号,并结合黑色素样品的元素分析、高效液相色谱和傅里叶红外光谱等结果,综合分析认为木耳黑色素的缩合分子式为 $[\text{C}_{18}(\text{OR})_3\text{H}_7\text{O}_4\text{N}_2]_n$ ^[36]。此外,黑色素具有耐热、微溶于水和不溶于一般有机溶剂等理化性质^[52]。因此,黑色素的官能团组成、结构和理化特性等一起使其具有吸附并移除铜等金属离子的能力。Oh等在实验室水平将真菌黑色素与污水混匀振荡,等吸附至平衡后再离心将黑色素和水分离开,实现将 Cu^{2+} 等重金属从水中移除的目的^[52]。本研究发现奶油栓孔菌黑色素与木耳的相似都具有羧基、氨基、羟基等官能团^[36]。因此,黑色素可能参与奶油栓孔菌对 Cu^{2+} 的移除。该菌对 Mn^{2+} 的移除效果一般,这可能与其对 Mn^{2+} 的耐受性更强有关。本研究所用浓度对其造成的胁迫较小,引发应激反应和机制较弱, Mn^{2+} 浓度的略微下降可能是该菌为满足菌丝体正常生长吸收所致。我国部分地区存在不同程度的铜、铅等重金属离子污染^[56]。总之,奶油栓孔菌可以移除 Cu^{2+} ,具有一定生物修复重金属污染的应用潜力。

4 结论

Lac活性含 Cu^{2+} 各处理均优于对照,后20 d高于前20 d。前20 d,0.5和1.0 mmol/L Cu^{2+} 诱导效果较好;后20 d,10.0 mmol/L的Lac活性最高。2.0、3.0和10.0 mmol/L Cu^{2+} 既诱导Lac活性,也抑制菌丝体生长,但该菌能降低 Cu^{2+} 浓度。0.5、0.7和1.0 mmol/L Mn^{2+} 的Lac活性诱导效果相对稳定,2.0、5.0和10.0 mmol/L的波动较大。 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 均诱导MnP活性,但MnP活性低。该菌 Cu^{2+} 胁迫下产生更多黑色素,对 Mn^{2+} 耐受性较强。0.5-10.0 mmol/L范围内该菌的 Cu^{2+} 移除能力随初始浓度升高而增强。综上, Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 都是该菌Lac和MnP活性的强力诱导剂,高浓度的 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 虽然会抑制菌丝体生长但也能诱导Lac和MnP活性,而且该菌能降低培养液的 Cu^{2+} 浓度,随着培养时间增长胁迫减轻至一定程度后高浓度 Cu^{2+} 的诱导效果更强。该菌株主产Lac,产黑色素,对 Mn^{2+} 耐受性强,有生物修复铜等重金属污染的潜力。本研究就 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 对Lac和MnP活性的诱导提出了新见解,可为木质素降解酶活性诱导、高产漆酶菌株发掘和重金属污染生物修复等提供参考。 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 诱导Lac和MnP活性的过程相当复杂,不同浓度下Lac和MnP同工酶组成、各自的表达情况、 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 的共同作用有待探究。

参考文献 [References]

- 1 Hakulinen N, Rouvinen J. Three-dimensional structures of laccases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, **72** (5): 857-868
- 2 Paavola J, Battistin U, Ogata C, Georgiadis M. Crystal structures of a dodecameric multicopper oxidase from *Marinithermus hydrothermalis* [J]. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2021, **77** (10): 1336-1345
- 3 Ponnusamy VK, Nguyen DD, Dharmaraja J, Shobana S, Banu JR, Saratale RG, Chang SW, Kumar G. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential [J]. *Bioresour Technol*, 2019, **271**: 462-472
- 4 Deska M, Kończak B. Immobilized fungal laccase as "green catalyst" for the decolourization process-state of the art [J].

- Process Biochem*, 2019, **84**: 112-123
- 5 王国栋, 陈晓亚. 漆酶的性质、功能、催化机理和应用[J]. 植物学通报, 2003, **4**: 469-475 [Wang GD, Chen XY. The properties, functions, catalytic mechanism and applicability of laccase [J]. *Chin Bull Bot*, 2003, **4**: 469-475]
 - 6 Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Delgado-Boada JM. Fungal laccases [J]. *Fungal Biol Rev*, 2013, **27** (3): 67-82
 - 7 Abdel-Hamid AM, Solbiati JO, Cann IKO. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications [J]. *Adv Appl Microbiol*, 2013, **82**: 1-28
 - 8 Boer CG, Obici L, Souza CGMde, Peralta RM. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme [J]. *Bioresour Technol*, 2004, **94** (2): 107-112
 - 9 Garavaglia S, Teresa Cambria M, Miglio M, Ragusa S, Iacobazzi V, Palmieri F, D'Ambrosio C, Scaloni A, Rizzi M. The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair [J]. *J Mol Biol*, 2004, **342** (5): 1519-1531
 - 10 王海磊, 李宗义. 三种重要木质素降解酶研究进展[J]. 生物学杂志, 2003, **5**: 9-11+33 [Wang HL, Li ZY. Three important enzymes for lignin degradation [J]. *J Biol*, 2003, **5**: 9-11+33]
 - 11 Lu X, Ding SJ. Effect of Cu²⁺, Mn²⁺ and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus* [J]. *Mycoscience*, 2010, **51** (1): 68-74
 - 12 Pillet L, Dufresne R, Crelier S. Copper-induced production of laccases for lignin depolymerisation and micropollutant degradation by laccase-mediator systems [J]. *Chimia*, 2021, **75** (12): 1058-1065
 - 13 Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhoub A, Sayadi S, Martinez AT, Martinez MJ. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme [J]. *Enzyme Microbiol Technol*, 2006, **39** (1): 141-148
 - 14 胡渤海, 王寿南, 陈青君, 张国庆, 杨佳玥, 徐鑫, 韩鹏, 张宇轩, 李兵. 一种白腐真菌的分离、鉴定、培养及产漆酶条件[J]. 应用与环境生物学报, 2018, **24** (2): 367-373 [Hu BY, Wang SN, Chen QJ, Zhang GQ, Yang JY, Xu X, Han P, Zhang YX, Li B. Isolation, identification, culture conditions, and laccase production of white rot fungus [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2018, **24** (2): 367-373]
 - 15 李小凤, 韩鹏, 陈青君, 赵智靖, 徐诗毅, 王秋颖, 关体坤, 张国庆. 高产漆酶草耳的分离鉴定、培养条件、液体发酵及偶氮染料脱色[J]. 应用与环境生物学报, 2022, **28** (3): 699-704 [Li XF, Han P, Chen QJ, Zhao ZJ, Xu SY, Wang QY, Guan TK, Zhang GQ. Isolation, identification, culture conditions, liquid fermentation and azo dyes decolorization of high laccase-producing *Panus* strain [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2022, **28** (3): 699-704]
 - 16 Sollewijn Gelpke M, Youngs H, Gold M. Role of arginine 177 in the MnII binding site of manganese peroxidase. Studies with R177D, R177E, R177N, and R177Q mutants [J]. *Eur J Biochem*, 2001, **267** (24): 7038-7045
 - 17 陈中维, 杨锐, 李宁杰, 兰琪, 刘洁. 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[J]. 菌物学报, 2021, **40** (6): 1538-1548 [Chen ZW, Yang R, Li NJ, Lan Q, Liu J. Optimization of culture conditions for laccase production of *Phanerochaete chrysosporium* and efficiency of the laccase in Congo Red degradation [J]. *Mycosystema*, 2021, **40** (6): 1538-1548]
 - 18 李思, 程伟, 张富美, 尚晓静, 侯瑞. 烟管孔菌G14产锰过氧化物酶条件优化及其对染料的脱色[J]. 菌物学报, 2021, **40** (6): 1511-1524 [Li S, Cheng W, Zhang FM, Shang XZ, Hou R. Optimization of production conditions and dye decolorization ability of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* G14 [J]. *Mycosystema*, 2021, **40** (6): 1511-1524]
 - 19 Ballou ER, Wilson D. The roles of zinc and copper sensing in fungal pathogenesis [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2016, **32**: 128-134
 - 20 Smith AD, Logeman BL, Thiele DJ. Copper acquisition and utilization in fungi [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2017, **71** (1): 597-623
 - 21 Anusha P, Narayanan M, Natarajan D, Kandasamy S, Chinnathambi A, Alharbi SA, Brindhadevi K. Assessment of hexavalent chromium (VI) biosorption competence of indigenous *Aspergillus tubingensis* AF3 isolated from bauxite mine tailing [J]. *Chemosphere*, 2021, **282**: 131055
 - 22 Kolhe N, Damle E, Pradhan A, Zinjarde S. A comprehensive assessment of *Yarrowia lipolytica* and its interactions with metals: current updates and future prospective [J]. *Biotechnol Adv*, 2022, **59**: 107967
 - 23 司静, 崔宝凯. 绒毛栓孔菌液体培养过程中胞外酶活性的研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2012, **31** (1): 70-77 [Si J, Cui BK. Studies on activities of extracellular enzymes in liquid culture of *Trametes pubescens* [J]. *Genomics Appl Biol*, 2012, **31** (1): 70-77]
 - 24 司静, 崔宝凯, 戴玉成. 栓孔菌属漆酶高产菌株的初步筛选及其产酶条件的优化[J]. 微生物学通报, 2011, **38** (3): 405-416 [Si J, Cui BK, Dai YC. Primary screening of effective *Trametes* strains with high laccase-productivity and optimization of conditions on laccase production [J]. *Microbiol Chin*, 2011, **38** (3): 405-416]
 - 25 甄静, 李冠杰, 李伟, 杜志敏, 王继雯, 尹文兵, 陈国参. 毛栓孔菌XYG422菌株产漆酶发酵条件优化及对玉米秸秆生物降解的研究[J]. 菌物学报, 2017, **36** (6): 718-729 [Zhen J, Li GJ, Li W, Du ZM, Wang JW, Yin WB, Chen GC. Fermentation condition optimization of laccase producing strain *Trametes hirsuta* XYG422 and its activity on corn straw degradation [J]. *Mycosystema*, 2017, **36** (6): 718-729]
 - 26 Cui BK, Li HJ, Ji X, Zhou JL, Song J, Si J, Yang ZL, Dai YC. Species diversity, taxonomy and phylogeny of Polyporaceae (Basidiomycota) in China [J]. *Fungal Divers*, 2019, **97**: 137-392
 - 27 Hao JB, Ye LY, Meng GL, Song YJ, Fu JS, Wu XP. The protective effect and crucial biological pathways analysis of *Trametes lactinea* mycelium polysaccharides on acute alcoholic liver injury in mice based on transcriptomics and metabolomics [J]. *Food Sci Hum Well*, 2021, **10** (4): 480-489
 - 28 Wang JZ, Wang AL, He HB, She XX, He YM, Li S, Liu LQ, Luo T, Huang NN, Luo HJ, Zou K. Trametenolic acid B protects against cerebral ischemia and reperfusion injury through modulation of microRNA-10a and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, **112**: 108692
 - 29 Dullah S, Hazarika DJ, Goswami G, Borgohain T, Ghosh A, Barooah M, Bhattacharyya A, Boro R. Melanin production and laccase mediated oxidative stress alleviation during fungal-fungal interaction among basidiomycete fungi [J]. *IMA Fungus*, 2021, **12** (1): 33
 - 30 林俊芳, 刘志明, 陈晓阳, 郭丽琼, 王杰. 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 JF, Liu ZM, Chen XY, Guo LQ, Wang J. Evaluation of assay methods for determining fungal laccase activity [J]. *Chin J Bioproc Eng*, 2009, **7** (4): 1-8]
 - 31 Naidu Y, Siddiqui Y, Rafii MY, Saud HM, Idris AS. Investigating the effect of white-rot hymenomycetes biodegradation on basal stem rot infected oil palm wood blocks: biochemical and anatomical

- characterization [J]. *Ind Crop Prod*, 2017, **108**: 872-882
- 32 孙德志, 孙怡, 秦占斌, 高杰, 高筠. 铜试剂测定溶液铜离子浓度分光光度法的改进[J]. 化学工程师, 2019, **33** (3): 70-73+40 [Sun DZ, Sun Y, Qin ZB, Gao J, Gao Y. Improvement of spectrophotometric method for determination of copper ions concentration in solution by copper reagent [J]. *Chem Eng*, 2019, **33** (3): 70-73+40]
- 33 罗夏琳, 胡玉斐, 李攻科. 微波辅助消解-电感耦合等离子体原子发射光谱测定烟草中的重金属[J]. 分析科学学报, 2016, **32** (2): 249-252 [Luo XL, Hu YF, Li Gk. Determination of heavy metals in tobaccos by microwave-assisted digestion-inductively coupled plasma-optical emission spectrometry [J]. *J Anal Sci*, 2016, **32** (2): 249-252]
- 34 Durner E. Effective analysis of interactive effects with non-normal data using the aligned rank transform, ARTool and SAS® university edition [J]. *Horticulture*, 2019, **5** (3): 57-70
- 35 Rudrappa M, Kumar MS, Kumar RS, Almansour AI, Perumal K, Nayaka S. Bioproduction, purification and physicochemical characterization of melanin from *Streptomyces* sp. strain MR28 [J]. *Microbiol Res*, 2022, **263**: 127130
- 36 Sun SJ, Zhang XJ, Sun SW, Zhang LY, Shan SK, Zhu H. Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure [J]. *Food Chem*, 2016, **190**: 801-807
- 37 Rudakiya DM, Patel DH, Gupte A. Exploiting the potential of metal and solvent tolerant laccase from *Tricholoma giganteum* AGDR1 for the removal of pesticides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, **144**: 586-595
- 38 Wang H, Deng W, Shen MH, Yan G, Zhao W, Yang Y. A laccase Gl-LAC-4 purified from white-rot fungus *Ganoderma lucidum* had a strong ability to degrade and detoxify the alkylphenol pollutants 4-*n*-octylphenol and 2-phenylphenol [J]. *J Hazard Mater*, 2021, **408**: 124775
- 39 Jiang S, Ren D, Wang Z, Zhang SQ, Zhang XQ, Chen WS. Improved stability and promoted activity of laccase by One-Pot encapsulation with Cu (PABA) nanoarchitectonics and its application for removal of Azo dyes [J]. *Ecotoxicol Environ Safe*, 2022, **234**: 113366
- 40 Kaur K, Sharma A, Capalash N, Sharma P. Multicopper oxidases: biocatalysts in microbial pathogenesis and stress management [J]. *Microbiol Res*, 2019, **222**: 1-13
- 41 潘越, 冯志勇, 陈辉, 陈明杰, 汪虹, 张津京. 食用菌黑色素代谢的研究进展[J]. 生物学杂志, 2014, **31** (1): 68-70+74 [Pan Y, Feng ZY, Chen H, Chen MJ, Wang H, Zhang JJ. Advances in research on the melanin metabolism of edible fungi [J]. *J Biol*, 2014, **31** (1): 68-70+74]
- 42 An Q, Han M, Bian L, Han Z, Han N, Xiao Y, Zhang F. Enhanced laccase activity of white rot fungi induced by different metal ions under submerged fermentation [J]. *BioResources*, 2020, **15** (4): 8369-8383
- 43 Simonić J, Vukojevic J, Stajic M, Glamoclija J. Intraspecific diversity within *Ganoderma lucidum* in the production of laccase and Mn-oxidizing peroxidases during plant residues fermentation [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, **162** (2): 408-415
- 44 Naidu Y, Siddiqui Y, Abu SI. Comprehensive studies on optimization of ligno-hemicellulolytic enzymes by indigenous white rot hymenomycetes under solid-state cultivation using agro-industrial wastes [J]. *J Environ Manag*, 2020, **259**: 110056
- 45 江明锋, 张义正. 培养于天然冷杉木片的黄孢原毛平革菌木质素过氧化物酶基因表达的RT-PCR分析[J]. 微生物学报, 2003, **1**: 65-72 [Jiang MF, Zhang YZ. RT-PCR analysis of *Phanerochaete chrysosporium* lip genes in colonized fir wood [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2003, **1**: 65-72]
- 46 李华钟, 章燕芳, 华兆哲, 陈坚. 黄孢原毛平革菌选择性合成木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶[J]. 过程工程学报, 2002 (2): 137-141 [Li HZ, Zhang YF, Hua ZZ, Chen J. Selective synthesis of lignin peroxidase and manganese peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Chin J Process Eng*, 2002 (2): 137-141]
- 47 Jiménez-Tobon GA, Penninckx MJ, Lejeune R. The relationship between pellet size and production of Mn(II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture [J]. *Enzyme Microbiol Technol*, 1997, **21** (7): 537-542
- 48 高大文, 文湘华, 钱易. 白腐真菌培养条件对其分泌木质素降解酶的影响[J]. 中国环境科学, 2005, **5**: 572-575 [Gao DW, Wen XH, Qian Y. Influence of culturing conditions of white rot fungus on the secretion of ligninolytic enzymes [J]. *Chin Environ Sci*, 2005, **5**: 572-575]
- 49 Cordero RJB, Casadevall A. Functions of fungal melanin beyond virulence [J]. *Fungal Biol Rev*, 2017, **31** (2): 99-112
- 50 Portis IG, de Sousa Lima P, Paes RA, Oliveira LN, Pereira CA, Parente-Rocha JA, Pereira M, Nosanchuk JD, de Almeida Soares CM. Copper overload in *Paracoccidioides lutzii* results in the accumulation of ergosterol and melanin [J]. *Microbiol Res*, 2020, **239**: 126524
- 51 Fogarty RV, Tobin JM. Fungal melanins and their interactions with metals [J]. *Enzyme Microbiol Technol*, 1996, **19** (4): 311-317
- 52 Oh JJ, Kim JY, Kim YJ, Kim S, Kim GH. Utilization of extracellular fungal melanin as an eco-friendly biosorbent for treatment of metal-contaminated effluents [J]. *Chemosphere*, 2021, **272**: 129884
- 53 Buszman E, Pilawa B, Zdybel M, Wilczyński S, Gondzik A, Witoszyńska T, Wilczok T. EPR examination of Zn²⁺ and Cu²⁺ binding by pigmented soil fungi *Cladosporium cladosporioides* [J]. *Sci Total Environ*, 2006, **363** (1): 195-205
- 54 Fu WQ, Wen Y, Tang WJ, Yao Z. Cu(II) removal from aqueous solution by ultrafiltration assisted with chestnut shell pigment [J]. *Water Conserv Sci Eng*, 2022: 1-10
- 55 Toledo AV, Franco MEE, Yanil Lopez SM, Troncozo MI, Saparrat MCN, Balatti PA. Melanins in fungi: types, localization and putative biological roles [J]. *Physiol Mol Plant P*, 2017, **99**: 2-6
- 56 王萌, 李杉杉, 李晓越, 赵中秋, 陈世宝. 我国土壤中铜的污染现状与修复研究进展[J]. 地学前缘, 2018, **25** (5): 305-313 [Wang M, Li SS, Li XY, Zhao ZQ, Chen SB. An overview of current status of copper pollution in soil and remediation efforts in China [J]. *Earth Sci Front*, 2018, **25** (5): 305-313]