

炼制技术

木质纤维素原料中漆酶天然介体的研究进展

邱卫华, 陈洪章

中国科学院过程工程研究所 生物质炼制工程北京市重点实验室, 北京 100190

邱卫华, 陈洪章. 木质纤维素原料中漆酶天然介体的研究进展. 生物工程学报, 2014, 30(5): 726-733.

Qiu WH, Chen HZ. Progress in natural laccase mediators from lignocelluloses. Chin J Biotech, 2014, 30(5): 726-733.

摘要: 漆酶作为一种多功能金属氧化酶, 被认为是未来工业生物催化中“可持续环境友好过程生物技术的工具”。但是由于典型漆酶催化体系中合成介体存在价格昂贵且有毒等问题而一直未能实现工业化。从木质素小分子前体物质或者中间体及降解产物中寻找稳定、高效、低毒和价廉的天然介体成为当前的研究热点和重点。本文从漆酶介体的类型与催化机理、木质纤维素原料炼制中间产物(如汽爆秸秆水洗液、造纸黑液、木质纤维素生物降解产物等)中天然介体的种类与分离等方面, 论述从木质纤维素原料降解产物中分离漆酶天然介体并进行应用的可行性, 为挖掘高反应活性的漆酶天然催化介体, 构建漆酶多介体连续催化体系, 实现木质纤维素原料降解产物的定向高值利用奠定基础。

关键词: 漆酶, 天然介体, 木质纤维素原料, 漆酶介体催化体系

Progress in natural laccase mediators from lignocelluloses

Weihua Qiu, and Hongzhang Chen

Beijing Key Laboratory of Biomass Refining Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: Laccase is one of the most important oxidoreductase with industrialization potential. However, due to the high cost and catalytic toxicity of laccase synthetic mediator, the laccase-mediator-system still cannot achieve industrialization. Therefore, searching for high efficient, environment-friendly, and cheap natural mediator from small molecule precursors

Received: January 24, 2014; **Accepted:** March 10, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21206176), Special Funds of the Science and Technology Innovation Base for Beijing Key Laboratory of Biomass Refining Engineering (No. Z13111000280000), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB707401).

Corresponding author: Hongzhang Chen. Tel: 86-10-82544982; Fax: +86-10-82627071; E-mail: hzchen@home.ipe.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 21206176), 生物质炼制工程北京市重点实验室 2013 年度科技创新基地培育与发展工程专项项目 (No. Z13111000280000), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB707401) 资助。

网络出版时间: 2014-04-02

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140053.html>

or intermediates and degradation products of lignin has been considered as a hot research topic. Therefore, we introduce the type and catalytic mechanism of laccase mediator, the composition and separation of natural laccase mediator from water washed solution of steam exploded straw, black liquor and lignocelluloses degradation products during the fermentation of white-rot fungi. We also provide the theoretical and technical direction for exploring of high reactive of laccase natural mediators and achieving the oriented high-value utilization of lignocellulose degradation products.

Keywords: laccase, natural mediator, lignocellulose degradation products, laccase-mediator system

由于氧化还原酶的催化反应复杂、催化效率高和催化特异性等特点,成为具有广泛应用价值的生物催化剂。漆酶是一种多功能金属氧化酶,由于其宽泛的催化底物谱,被认为是未来工业生物催化中“可持续环境友好过程生物技术的工具”^[1-2]。漆酶及漆酶介体体系的研究涉及到人类衣、食、住、行的方方面面,包括环境污染物的生物降解或转化、木质纤维原料的降解或改性,食品工业中酚类物质的去除,受杀虫剂、除草剂、炸药等污染的土壤的生物修复,制浆造纸、石化、纺织行业的废水处理,抗癌药物、洗涤剂、化妆品、抗菌材料、生物胶粘剂等的合成,医疗诊断,生物传感器,生物燃料电池等等^[1,3-6]。总之,无论是作为结构与功能关系的研究模型,还是将来作为绿色环保工具应用于生物技术工业,漆酶的研究都具有非常巨大的意义。

然而,目前一直未能实现漆酶介体催化体系的规模化工业应用,主要原因在于漆酶催化介体多为人工合成介体,存在市场价格昂贵,难确保其本身或其衍生物不具有毒性等问题^[1]。寻找稳定、高效、低毒和价廉的天然介体成为当前的研究热点和重点。由于汽爆水洗液、制浆造纸黑液等中所含木质素降解产物中富含可以作为漆酶催化反应的天然介体,它们具有环境和生态的优势而引起了国内外学者浓厚的研究兴趣。文中将介绍国内外学者从木质纤维素

原料降解产物中分离得到绿色、高效的漆酶天然介体的研究进展,并就漆酶-天然介体体系构建及应用研究中存在的一些问题进行展望。以期拓宽木质纤维素原料产品炼制范围、降低漆酶-介体体系催化成本提供参考。

1 漆酶天然介体的研究进展

漆酶作为木质素降解酶系的一种,其氧化还原电势是比较低的,大约是在 300–800 mV 之间(相对于标准氢电极来说),因此仅仅能够氧化降解酚型的木质素结构单元,而不能氧化降解木质素结构的非酚型的结构单元。1990年,经研究发现在小分子物质(即介体)以及氧气存在的条件下,来源于云芝菌 *Coriolus versicolor* 的漆酶可以氧化降解非酚型的木素结构模型物。Li 等^[7]从一种仅分泌漆酶且具有强木质素降解能力的朱红栓菌 *Pycnoporus cinnabarinus* 的培养液中发现了一种生物体系自身的介体 3-HAA (3-hydroxyanthranilic acid),这种化合物同其他已发现的介体一样具有协同漆酶降解木质素的能力。此发现进一步证实漆酶降解木质素是通过漆酶和小分子介体的共同作用。由于介体能够催化占木质素 80%以上非酚结构发生芳环断裂、 β -醚键断裂、 C_{α} - C_{β} 断裂和 C_{α} 氧化等反应^[8],而引起了国内外学者的广泛关注。人们发现一些含有 N=O 或 N-OH 的化合物也具有传递电子的作用。然而到目前为止,

有效的介体仅有少数几种。已报道的漆酶合成介体主要有紫脲酸 (VIO)^[9]、1-羟基苯丙三唑 (HBT)、N-羟基-N-乙酰基苯胺 (NHA)^[10]、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) (ABTS) 等^[11]。但是这些化合物的价格仍然偏高。目前也有一些实验室自行合成的化合物,如 N-羟基-N-乙酰基苯胺 (NHA),该化合物的氧化还原电势为 1.325 V。这些介体的电极反应具有部分可逆性,在漆酶/介体体系催化反应时,它们被漆酶作用产生 N-O·自由基,后者经传递电子作用后能返回原始状态^[12]。

但是目前合成介体最大的问题是其价格高,且影响漆酶的活性和稳定性,所以许多学者开始寻找高效、廉价的天然介体。Camarero 等^[1,13]首次用木质素小分子酚类衍生物作为漆酶的天然介体,发现乙酰丁香酮、乙酰香草酮、对香豆酸、二甲基苯酚、乙基香草醛、甲基香草酸酯、丁香醛、三甲氧基苯酚、香草醛和香草醇等一些可衍生自木质素的酚醛类小分子都能促进漆酶对染料的脱色。Camarero 等^[14]和 Fillat 等^[15]均研究了以乙酰丁香酮、对香豆酸、丁香醛等植物多酚为漆酶天然介体催化纸浆脱木素,结果表明与合成介体 ABTS 或 HBT 相比,天然介体同样可以提高纸浆中木质素的脱除率、增加纸浆白度,并降低纸浆的 Kappa 值。对于 *P. cinnabarinus* ss3 漆酶,单独漆酶催化不能使活性黑 5 和天青 B 脱色,但是以对香豆酸 (PCA),阿魏酸 (FA) 和芥子酸 (SA) 为漆酶天然介体进行漆酶催化染料脱色时,漆酶/SA 催化体系对染料都具有很高的脱色率。*P. cinnabarinus* ss3 漆酶对 SA 的特异性常数是 ABTS 的 16 倍,二甲氧基苯酚 (DMP) 的 2 倍和 PCA 的 400 倍。漆酶/PCA 催化天青 B 脱色率 (2 h) 可以达到 57.6%,而

漆酶/SA 催化活性黑 5 脱色率 (2 h) 达到 94.1%。而对于染料酸性蓝 74,加入介体可以使漆酶催化脱色速率显著提高,单独漆酶催化、漆酶/PCA 和漆酶/SA 催化体系经 5 min 的脱色率分别为 4.1%、52.0%和 85.5%^[16]。

虽然漆酶天然介体催化体系的催化性能相对于合成介体还有差距,但是天然介体对于保持漆酶活性具有优势。长绒毛栓菌 *Trametes villosa* 漆酶/丁香醛催化体系使桉树 (*Eucalyptus*) Kraft 浆其脱木素率达到 28%,且白度达到 63.5%;而对于漆酶活性而言,虽然漆酶/紫脲酸 (VA) 体系使浆脱木质素率达到 42%,且白度达到 73.5%,但却是以漆酶失活为代价的,经过同样时间的处理,在漆酶/丁香醛体系中漆酶活性保持 31.0% (无介体体系漆酶活性保持率为 38.5%),而漆酶/HBT 体系和漆酶/VA 体系中漆酶活性保持率分别只有 0.5%和 2.7%^[17]。因此,天然介体在漆酶催化体系的应用中具有广泛的应用前景。

2 漆酶-介体催化机理的研究

在漆酶介体催化体系中,介体先于底物迅速与漆酶反应,产生自由基后再与底物发生氧化作用,同时自身被还原。小分子合成介体克服了漆酶的低氧化还原电势和蛋白质大分子进攻木素所形成较大空间位阻的障碍,提高了漆酶的氧化还原能力。这些介体以不同的催化机制实现漆酶与非酚类及大分子木质素类等底物间的电子传递。其最本质的催化机理是漆酶催化底物产生苯氧自由基 (PhO·) 或者氮氧自由基 (NN-O·),自由基之间通过电子传递实现漆酶对底物的最终氧化^[18]。目前对 ABTS、HBT、NHA 等合成介体的催化机理已有较为清晰的认

知。ABTS 作为介质时,氧化剂是 ABTS 的二价阳离子 (ABTS dication) 而不是酶,而氧化态的 ABTS 在氧化底物时反过来又被还原成为 ABTS^[19];漆酶/HBT 介质系统催化氧化底物过程中,HBT 被氧化成为氧化态 HBT,后者作为氧化剂氧化底物。氧化态 HBT 的形成是反应速率的决定步骤,但是 HBT/底物比值高时,氧化态 HBT 是作为三电子氧化剂,而且最后不可逆地还原为苯并三唑 (BT);NHA 也是一种常用的介质,漆酶与 NHA 协同作用时,漆酶氧化 NHA 产生 N-O 自由基,自由基进攻底物后可返回到 NHA,但其中部分 NHA 的自由基会衰退变成其他物质而不完全可逆^[12]。

从现有的研究来看,许多天然介体的催化降解效果与人工合成介质相当,甚至优于合成介质^[1,20-21]。Jeon 等^[21]发现不同介质组成的“鸡尾酒”混合物比单个介质更能提高漆酶氧化的能力,在多种介质同时存在时,可以显著地加快底物的氧化。通过对 ABTS⁺ 自由基的观察发现,蓝绿色的 ABTS⁺ 脱色过程中存在从乙酰香草酮或者香草醛到 ABTS⁺ 的电子传递,而 ABTS⁺ 的脱色与 PCP 的脱除率呈正相关,说明在催化过程中存在从乙酰香兰酮 (Acetovanillone, AV) 或者香兰素 (Vanillin, VA) 到 ABTS⁺ 的电子传递。且在只有 ABTS⁺ 时,五氯苯酚 (Pentachlorophenol, PCP) 的脱除率非常低,说明在漆酶/ABTS/AV 或者漆酶/ABTS/VA 体系中 AV 或者 VA 参与了 PCP 脱除的反应。Qiu 等^[22]以汽爆预处理原料为基质固态发酵的漆酶所得到的粗酶液,在无介质的条件下催化木质素改性,发现在无介质体系下漆酶可以催化木质素苯环上的酚羟基、取代基及羰基发生开裂,分析认为可能是发酵基质汽爆秸秆中含

有降解产生的木质素小分子降解物进入到酶液中,而微生物产漆酶过程中催化底物发生进一步降解产生的小分子木质素降解物也进入到漆酶酶液中,这些物质和漆酶构成了漆酶/天然介质催化体系,因此可以催化木质素的羰基等的降解。

3 汽爆水解液中漆酶天然介体的研究

预处理是木质纤维素原料相对于淀粉及糖类原料获得较高生物转化效率的关键过程中最大的区别技术之一。木质纤维素原料在预处理过程都会产生多种化合物,其种类及含量随纤维素原料性质及预处理条件的不同而不同^[23]。在各种预处理手段中,蒸汽爆破预处理被认为是构建木质纤维素原料炼制体系的核心技术^[24]。在汽爆的汽相蒸煮作用下,木质素则发生 β -O-4 酯键和愈创木基断裂等反应而降解^[25-26]。朱均均等^[27]采用高效液相色谱和气质联用色谱技术对溶剂分级分离得到的水解液不同分离级分进行了鉴定,共得到了 14 种芳香类化合物、22 种脂肪酸化合物和 5 种呋喃化合物,其中一些小分子芳香类化合物,如紫丁香醛、香草醛等已经被证实是漆酶催化的天然介质^[12, 28]。

但是,目前木质纤维素原料的汽爆水解液中小分子酚类物质仍然是被视为影响后续生物转化的因素之一,而着重关注其脱除和降解,尚未见到关于水解液中漆酶天然介体的分离和利用的报道。Qiu 等^[29]采用纳滤和有机溶剂连续萃取将汽爆玉米秸秆水洗液进行了分级分离,发现分级得到的乙醚萃取物 (EE) 和乙酸乙酯萃取物 (EAE) 中存在漆酶的天然介质,以其为介质漆酶对三苯甲烷类染料孔雀绿和结晶紫的脱色效果和以 ABTS 为介质相当。以漆酶/EE 和

漆酶/ABTS 催化结晶紫 8 h 脱色率分别为 66.95%和 61.9%，而漆酶/EE、漆酶/EAE 和漆酶/ABTS 催化孔雀绿 1 h 脱色率均高于 80%。这展示了从木质纤维素原料的汽爆水解液中获得高性能漆酶天然介体的可行性。实际上木质纤维素原料汽爆水洗液可以看作是一个包含多种小分子木质素降解产物的混合介体体系。而已有研究表明，在不同介体组成的混合体系中，介体之间存在着漆酶催化底物反应的连续电子传递^[16]。

4 造纸黑液中漆酶天然介体的研究

造纸黑液中本身存在的和大分子木质素降解后生成的小分子酚类化合物也是漆酶天然介体的资源库。罗小林等^[30]从尾叶桉 KP 法制浆黑液中分离得到包括愈创木酚 (Guaiacol)、儿茶酚 (Catechol)、紫丁香酚 (Syringol)、3-甲氧基儿茶酚 (3-methoxycatechol)、香草醛 (Vanillin)、乙酰香草酮 (Acetovanillone)、紫丁香醛 (Syringaldehyde)、香草酸 (Vanillic acid)、乙酰丁香酮 (Acetosyringone)、紫丁香酸 (Syringic acid) 等 18 种小分子酚类化合物。这些酚类物质中大部分都可以作为漆酶的天然介体。GC-MS 分析从桉木硫酸盐浆黑液中分离的小分子酚类物质发现，其中丁香醇含量占 21.74%，其次是乙酰丁香酮占 15.23%，还有丁香醛 (4.91%)、丁香树脂 (2.12%) 等^[31]。Camarero 等^[14]发现，桉木硫酸盐黑液中含有的部分小分子酚类化合物具有与 HBT (1-羟基苯并三唑) 相当的催化漆酶的活性。利用丁香醛、乙酰丁香酮等和 HBT 作为漆酶的介体对纸浆进行漂白，证明丁香醛、乙酰丁香酮/漆酶体系的酶催化性能虽然稍低于 HBT/漆酶催化体系，但是它们的

用量仅为 HBT 的 50%。

另外一种从黑液中制备漆酶天然介体的方法是先从黑液中得到木质素，再通过氧化降解得到木质素降解产物，从其降解产物中寻找漆酶天然介体。周生飞等^[32-33]从竹子硫酸盐法蒸煮液中制备碱木质素，再以湿空气氧化法降解木质素，可产生对羟基苯甲酸、香草酸、对羟基苯甲醛、丁香酸、香草醛、丁香醛和乙酰丁香酮等多种小分子酚醛化合物。这些小分子酚醛化合物及萃取自木质素降解液的小分子酚醛混合物，都可作为漆酶/介体体系的天然介体用于硫酸盐法竹浆的全无氯漂白，都能不同程度地促进竹浆最终白度的提高和木质素的脱除。

5 白腐菌代谢产物或木质素降解产物中漆酶天然介体的研究

3-羟基邻氨基苯甲酸 (3-Hydroxyanthranilic acid, 3-HAA) 是在朱红栓菌 *Phanerochaete cinnabarinus* 发酵培养液中发现的一种代谢产物，也是第一个被发现的可作为漆酶介体的天然产物。1996 年 Eggert 等^[34]发现加入 3-HAA 后漆酶可以催化非酚型木质素二聚物模型化合物 (1-(3,4-二甲氧基苯基)-2-(2-甲氧基苯基)-丙烷-1,3-二醇 (Veratrylglycerol- β -guaiacyl ether, VG) 的氧化。而 3-HAA 和 ABTS 作为漆酶介体，在催化效率和底物特异性等方面均具有显著的差别。3-HAA 和 ABTS 为介体，云芝菌 *Trametes versicolor* 漆酶催化 VG 转化率分别为 60%和 10%。但是对于 *P. cinnabarinus* 漆酶，以 ABTS 为介体时藜芦醇在 24 h 内被全部氧化，而 3-HAA 只能氧化 15%的藜芦醇。但是，至今尚未见到其他白腐菌代谢产物作为漆酶天然介体的报道。

另外一类漆酶天然介体的来源是在木质纤维素原料的白腐菌降解过程中木质素降解产生的降解物。木质素在白腐菌分泌的木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶中两种或者以上酶的共同作用下,降解成小分子芳香族化合物,这些化合物很多可以作为漆酶的天然介体。Ahmad 等^[35]研究了不同木质纤维素原料磨木木质素的微生物降解,发现经微生物降解后的主要所含的降解产物为 3-甲氧基-4-羟基-苯丙酮结构和 1-羟基-2,4-二羧基苯甲酸结构。Bugg 等^[36]对木质纤维素原料白腐菌或者细菌降解产物进行了详细的分析,发现来源于木质素的降解产物有苯甲酸及其衍生物 (Benzoic acid)、二苯醚 (Diphenyl ether)、5,5'-双羧酸联苯 (Biphenyl-5,5'-dicarboxylic acid)、2,2'-双羟基联苯 (2,2'-dihydroxy)、3'-羟基苯丙酮 (3'-Hydroxypropiofenone)、苯乙酮 (Acetophenone)、肉桂酸 (Cinnamic acid)、苯甲醛 (Benzaldehyde)。Singh 等^[37]从麦草 *Phanerochaete chrysosporium* 降解产物中检测到苯(基)吡喃酮 (Benzopyrone)、苯基香豆满 (Phenylcoumaran)、肉桂醇 (Cinnamyl alcohol) 等结构的化合物,它们均来自木质素降解。这些降解产物也是漆酶潜在的天然介体的来源。但是,由于来源于木质纤维素原料木质素降解产物物质组成的复杂性和多样性,目前尚未见到采用上述物质作为漆酶天然介体的研究,今后仍需要对这些物质在漆酶-介体催化体系中的作用及其对酶活性的潜在影响进行深入研究和验证。

6 结论与展望

由于催化体系中合成介体存在价格昂贵且有有毒等问题,漆酶一直难以实现工业化的应用。

寻找稳定、高效、低毒和价廉的天然介体成为当前的研究热点和重点。而木质纤维素原料中木质素降解产生的小分子物质已经证明是良好的漆酶天然介体(如木质素汽爆预处理降解产物、造纸废液中小分子木质素降解产物等)。但是,目前这类物质的浓度通常较低,且组成复杂,分离纯化成本高,因此漆酶天然介体的经济性也是制约漆酶/天然介体体系工业化应用的瓶颈之一。另一方面,天然介体不是无毒,其毒性也仍然需要深入研究。因此,木质纤维素原料中天然漆酶介体的研究重点仍然在如何高效-低成本-低毒地构建漆酶/天然介体催化体系是未来漆酶/介体工业化应用的研究重点。

由于漆酶介体之间存在连续电子传递现象,而木质纤维素原料汽爆水解液等混合体系中存在多种木质素小分子化合物,其中同时并存着多种漆酶催化天然介体(如香草醛、丁香醛等),因此,在类似木质纤维素汽爆水解液此类多介体混合体系中,阐明漆酶与多种天然介体之间的协同自催化机制,构建漆酶/多介体连续催化体系将为木质纤维素原料降解产物的合理开发应用提供科学依据,为其高值化利用开辟新的途径。

REFERENCES

- [1] Camarero S, Cañas AI. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(6): 694–705.
- [2] Ibrahim V, Mendoza L, Mamo G, et al. Blue laccase from *Galerina* sp.: properties and potential for Kraft lignin demethylation. *Process Biochem*, 2011, 46(1): 379–384.
- [3] Rawal R, Chawla S, Pundir C. Polyphenol biosensor

- based on laccase immobilized onto silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline gold electrode. *Biocatal Biotransfor*, 2011, 419(2): 196–204.
- [4] Schmitt S, de Souza R, Bettin F, et al. Decolorization of aqueous solutions of disperse textile dyes by oxidoreductases. *Biocatal Biotransfor*, 2012, 30(1): 48–56.
- [5] Singh Arora D, Kumar Sharma R. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl Biochem Biotech*, 2010, 160(6): 1760–1788.
- [6] Strong P, Claus H. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. *Crit Rev Env Sci Tec*, 2011, 41(4): 373–434.
- [7] Li KC, Horanyi PS, Collins R, et al. Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 28(4/5): 301–307.
- [8] Kawai S, Iwatsuki M, Nakagawa M, et al. An alternative β -ether cleavage pathway for a non-phenolic β -O-4 lignin model dimer catalyzed by a laccase-mediator system. *Enzyme Microb Technol*, 2004, 35(2/3): 154–160.
- [9] Ibarra D, Monte MC, Blanco A, et al. Enzymatic deinking of secondary fibers: cellulases/hemicellulases versus laccase-mediator system. *J Ind Microbiol Biot*, 2012, 39(1): 1–9.
- [10] Valls C, Colom JF, Baffert C, et al. Comparing the efficiency of the laccase-NHA and laccase-HBT systems in eucalyptus pulp bleaching. *Biochem Eng J*, 2010, 49(3): 401–407.
- [11] Solís-Oba M, Almendáriz J, Viniegra-González G. Biotechnological treatment for colorless denim and textile wastewater treatment with laccase and ABTS. *Rev Int Contam Ambie*, 2008, 24(1): 5–11.
- [12] Fu SY, Zhan HY, Yu HS, et al. Reactive ability of NHA in the laccase and mediator system (LMS), *China Pulp Paper*, 2001, 20(5): 1–5 (in Chinese). 付时雨, 詹怀宇, 余惠生, 等. 漆酶/介体催化体系中介体的反应性能. *中国造纸*, 2001, 20(5): 1–5.
- [13] Camarero S, Ibarra D, Martinez MJ, et al. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microb*, 2005, 71(4): 1775–1784.
- [14] Camarero S, Ibarra D, Martinez AT, et al. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 40(5): 1264–1271.
- [15] Fillat A, Colom JF, Vidal T, et al. A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. *Bioresour Technol*, 2010, 101(11): 4104–4110.
- [16] Camarero S, Cañas AI, Nousiainen P, et al. p-hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds. *Environ Sci Technol*, 2008, 42(17): 6703–6709.
- [17] Moldes D, Díaz M, Tzanov T, et al. Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus Kraft pulp. *Bioresour Technol*, 2008, 99(17): 7959–7965.
- [18] Majcherczyk A, Johannes C, Hüttermann A, et al. Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Appl Microbiol Biot*, 1999, 51(2): 267–276.
- [19] Potthast A, Rosenau T, Fischer K. Oxidation of benzyl alcohols by the laccase mediator system (LMS)-A comprehensive kinetic description. *Holzforschung*, 2005, 55(1): 47–56.
- [20] Bibi I, Bhatti HN, Asgher M. Comparative study of natural and synthetic phenolic compounds as efficient laccase mediators for the transformation of cationic dye. *Biochem Eng J*, 2011, 56(3): 225–231.
- [21] Jeon JR, Murugesan K, Kim YM, et al. Synergistic effect of laccase mediators on pentachlorophenol removal by *Ganoderma lucidum* laccase. *Appl Microbiol Biot*, 2008, 81(4): 783–790.
- [22] Qiu WH, Chen HZ. An alkali-stable enzyme with laccase activity from entophytic fungus and the enzymatic modification of alkali lignin. *Bioresour*

- Technol, 2008, 99(13): 5480–5484.
- [23] Almeida JR, Modig T, Petersson A, et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. J Chem Technol Biot, 2007, 82(4): 340–349.
- [24] Chen HZ, Qiu WH. Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. Biotechnol Adv, 2010, 28(5): 556–562.
- [25] Chen HZ, Liu LY. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. Bioresour Technol, 2007, 98(3): 666–676.
- [26] Wang K, Jiang JX, Xu F, et al. Influence of steaming pressure on steam explosion pretreatment of Lespedeza stalks (*Lespedeza cyrtobotrya*). II. Characteristics of degraded lignin. J Appl Polym Sci, 2010, 116(3): 1617–1625.
- [27] Zhu JJ, Yong Q, Chen SY. Identification of degraded products from steam-exploded corn stalk. Chem Ind Forest Prod, 2009, 29(2): 22–26 (in Chinese).
朱均均, 勇强, 陈尚铨. 玉米秸秆蒸汽爆破降解产物的分析. 林产化学与工业, 2009, 29(2): 22–26.
- [28] Jiang ZJ, Zhu JJ, Li X, et al. Determination of main degradation products of lignin using reversed-phase high performance liquid chromatography. Chin J Chromatogr, 2011, 29: 59–62 (in Chinese).
江智婧, 朱均均, 李鑫, 等. 反相高效液相色谱法定量分析木质素的主要降解产物. 色谱, 2011, 29(1): 59–62.
- [29] Qiu WH, Zhang WY, Chen HZ. Natural laccase mediators separated from water-washed solution of steam exploded corn straw by nanofiltration and organic solvent fractionation. Bioresour Technol, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.044>.
- [30] Luo XL, Zhan HY, Fu SY, et al. Separation and gc-ms analysis of low-molecular-weight phenolic compounds from black liquor of *Eucalyptus urophylla* Kraft pulping. Chem Ind Forest Prod, 2009, 29(4): 53–58 (in Chinese).
罗小林, 詹怀宇, 付时雨, 等. 尾叶桉 KP 法制浆黑液中低分子酚类化合物的分离与 GC-MS 分析. 林产化学与工业, 2009, 29(4): 53–58.
- [31] Luo XL, Zhan HY, Fu SY, et al. Application of low-molecular-weight phenols isolated from black liquors as natural mediators of laccase. T China Pulp Pap, 2008, 23(3): 102–105 (in Chinese).
罗小林, 詹怀宇, 付时雨, 等. 从黑液中分离低分子酚类化合物作为漆酶的天然介体. 中国造纸学报, 2008, 23(3): 102–105.
- [32] Zhou SF, Zhan HY, Yao XR, et al. The mechanism of bamboo Kraft pulp laccase and natural mediator system bleaching. Trans China Pulp Pap, 2012, 27(2): 7–13 (in Chinese).
周生飞, 詹怀宇, 姚向荣, 等. 漆酶/天然介体体系漂白硫酸盐竹浆的机理研究. 中国造纸学报, 2012, 27(2): 7–13.
- [33] Zhou SF, Zhan HY, Huang ZK, et al. Laccase natural mediator system bleaching of bamboo Kraft pulp. Paper Pap Making, 2011, 30(7): 48–51 (in Chinese).
周生飞, 詹怀宇, 黄周坤, 等. 漆酶-天然介体体系用于硫酸盐竹浆漂白. 纸和造纸, 2011, 30(7): 48–51.
- [34] Eggert C, Temp U, Jeffrey FD, et al. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. FEBS Lett, 1996, 391(1/2): 144–148.
- [35] Ahmad M, Taylor CR, Pink D, et al. Development of novel assays for lignin degradation: comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. Mol Biosyst, 2010, 6(5): 815–821.
- [36] Bugg TDH, Ahmad M, Hardiman EM, et al. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. Nat Prod Rep, 2011, 28(12): 1883–1897.
- [37] Singh D, Zeng JJ, Laskar DD, et al. Investigation of wheat straw biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Biomass Bioenerg, 2011, 35(3): 1030–1040.

(本文责编 陈宏宇)