

The Research Progress on Laccase Biotransformation Phenolic Compound

Xin Li, Shiting Yao, Ning Dang, Guangxin Lu*

Agriculture and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining Qinghai

Email: 907434358@qq.com, *lugx74@qq.com

Received: Sep. 7th, 2017; accepted: Sep. 21st, 2017; published: Sep. 29th, 2017

Abstract

As a kind of green environmental protection of polyphenol oxidase, laccase has good degradation effects on organic aromatic, especially phenolic compounds, and derivatives. It also has advantages and potential in the industrial wastewater treatment, bioremediation of polluted environment, biomass utilization, and other areas of application. In this paper, the nature source of phenolic compounds and removing method were simply summarized to lay the foundation for further reasonable use of phenolic compound.

Keywords

Laccase, Biotransformation, Phenolic Compounds

漆酶生物转化酚类化合物的研究进展

李欣, 姚世庭, 党宁, 芦光新*

青海大学农牧学院, 青海 西宁

Email: 907434358@qq.com, *lugx74@qq.com

收稿日期: 2017年9月7日; 录用日期: 2017年9月21日; 发布日期: 2017年9月29日

摘要

漆酶作为一种绿色环保的多酚氧化酶类, 对有机芳香化合物(尤其酚类)及衍生物均具有良好的降解效果, 在生物质利用、工业废水的处理、污染环境的生物修复以及在食品和动物营养等领域应用方面具有优势和潜力。本文就自然界酚类化合物的来源及去除方法进行简单总结, 旨在为进一步合理利用酚类化合物奠定基础。

关键词

漆酶, 生物转化, 酚类化合物

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

自然界酚类化合物来源广泛, 一类是植物本身在生长发育过程中形成的次级代谢产物, 另一类来源于工业、农业生产及环境中有机物的降解产物。酚类化合物是化学工业的重要原料, 同时也是工业排放的重要污染物。由于酚类化合物在不同学科领域中具有“利”和“弊”的两面性, 国内外学者对酚类化合物进行了广泛的研究, 涉及面从传统的领域扩展到了农业、食品、药理、营养、生化、日化、植保、功能高分子材料等多个领域[1]。近年来, 酚类化合物的利用和降解成为一个热点研究问题, 受到了国内外学者的高度重视。

1. 自然界中酚类化合物的来源及存在形式

1.1. 环境中酚类化合物

环境中酚类化合物来源于三个方面: (1) 直接来源于工业合成的废弃物, 诸如煤气、焦化、炼油、冶金、机械制造、玻璃、石油化工、木材纤维、化学有机合成工业、塑料、医药、农药、油漆等工业排出的废水中均含有酚类化合物, 印染和纺织工业废水中含有大量芳香环染料, 造纸工业的漂白废水中含有大量的氯化有机物, 如氯苯酚、氯化脂肪酸、氯化树脂酸等[2]。(2) 来源于农业生产, 如农药 2,4-D(含有 2,4-二氯酚)和 2,4,5-T(含有 2,4,5-三氯酚)的大量使用, 杀菌剂和除草剂中氯酚类化合物被广泛应用等[3]; (3) 来自某些有机物在环境中的降解。酚类化合物具有毒性, 对环境中的生物具有强烈的毒害、致畸、致多发性脑神经病变作用[4]。在环境中酚类化合物的含量虽然低, 但其性质活泼, 与土壤的相互作用复杂, 具有难降解性和积累性。酚类化合物作为一类重要的环境污染物, 许多国家已将其列入重点污染物的名单之中。因此, 如何采取有效的方法控制酚类化合物对环境的污染是摆在人们面前急需亟待的问题。

1.2. 植物酚类化合物

植物酚类化合物也统称为植物多酚类化合物(Plant polyphenol), 是广泛存在于植物体内的多羟基酚类化合物的总称[5], 其含量仅次于纤维素、半纤维素和木质素, 主要存在于植物的皮、根、木、叶、果实等器官中[6]。目前发现多酚类化合物在自然界的储量非常丰富, 含多酚类化合物较多的植物超过 600 种, 在某些针叶树皮中多酚含量达 20%~40% [7], 根据苯环数量和结构组成可分为黄酮类、酚酸、酚醇、芪类和木脂素等五类[8]。植物体内的多酚类化合物主要以结合态的形式存在, 常常有一个或多个糖基连接在它的羟基部位, 也有以直接连接在芳香环碳原子上的形式存在, 还可与其它化合物连接, 如羧酸、有机酸、胺类、脂类和蛋白质等, 此外, 也很容易和金属离子形成络合物[9]。植物多酚类化合物通过适当降解得到的产物可作为工业生产的原料。如从水解类多酚可以得到酸或小分子的酸酯, 它是制药行业重要的原材料[10]。另外, 多酚类化合物的分解为更易人体吸收的酚酸小分子物质, 增加了多酚的生物利用度和活性。这一特性在促进人体健康和食品加工方面有一定的应用潜力[9]。植物多酚类化合物因其独特

的化学结构,具有抗肿瘤、抗氧化、抑菌、抗病毒等多种生理功能[11]。在医药、食品、保健品及日用化学品等方面得到了广泛应用[12]。随着天然产物开发的逐渐兴起,植物多酚类化合物成为当前研究的热点[13]。

2. 酚类化合物的降解方法

随着酚类化合物毒性研究的深入,其环境浓度的日趋增加和污染范围的日益扩大受到人们的普遍关注,也使得酚类化合物去除方法及其机理的研究成为全球性的热点。酚类化合物降解方式主要有生物和化学氧化降解两种。化学氧化降解的方法则因条件较强烈,得到的小分子会继续发生反应,最终产物很复杂。而生物降解的条件比较温和,所得小分子产物的产率较高,同时又不会引入其它杂质。

2.1. 化学氧化降解

化学氧化降解是利用氧化剂的氧化性能,使酚类化合物分解,从而转化为无毒或毒性较小的物质,化学氧化降解是传统的有机物降解技术,常见的化学氧化剂包括臭氧氧化、二氧化锰氧化、高铁酸盐氧化和零价铁氧化。如臭氧(O_3)具有强氧化性,对许多酚类化合物具有极高的氧化效率[14]。去除酚类化合物的机理是臭氧与酚类化合物邻位和对位碳原子上的电子云发生亲电反应,从而达到降解的效果。但酚类化合物在臭氧作用下会生成有毒的苯醌类中间产物,进而生成甲酸、草酸等短链羧酸,最终被矿化为 CO_2 和 H_2O 。锰氧化物能有效促进环境中的多酚类物质发生聚合反应[15], Stone 等[16]利用锰氧化物与酚类化合物反应,提出了锰氧化物与酚类物质反应的“表面位点结合模型(Surface Site-Binding Model)”机理。高铁酸盐(FeO_4^{2-})作为一种强氧化剂,具有选择性的氧化剂,对酚类化合物具有明显的去除效果[17]。零价铁在降解有机物的过程中形成的 $Fe(OH)_3$ 对水中污染物具有一定的吸附和絮凝作用,因此被用于水中有机物的去除。研究发现,多金属氧酸盐[18]、腐植酸和富里酸[19]可作为加速电子传递的中介,能促进电子从 FeO 表面至 O_2 的转移,加速 H_2O_2 的生成,促进对4-氯酚、4-溴酚、4-氟酚、4-硝基酚、2,4-二氯酚、2,4,5-三氯酚和双酚A的降解速率。

2.2. 生物酶促反应

研究表明,酶可催化酚类化合物发生氧化偶合反应[20][21]。由于酶具有高度的专一性和高效的催化性,对酚类化合物具有很高的降解效率。催化酚类化合物降解常用的酶包括过氧化物酶(Peroxidases)和漆酶(Laccases)两大类。过氧化物酶和漆酶分别在过氧化物和氧气存在的条件下,可以氧化酚类化合物,形成苯氧自由基[22];而苯氧自由基之间发生聚合反应,生成多聚物沉淀,从而将其中去除。与过氧化物酶相比,漆酶具有巨大的实际应用价值。首先,LiP和MnP是在限碳、限氮条件下产生的严格次级代谢产物,在工业废水处理过程中,碳、氮源营养物质的大量存在限制了细胞对酶的分泌。其次,LiP和MnP在降解有机污染物时,需要大量的 H_2O_2 作为辅助剂[23],这限制了其在实际生产中的应用。漆酶可在没有 H_2O_2 存在下,直接对底物催化氧化。

3. 漆酶的来源及催化机理

3.1. 漆酶的来源

已有的研究证实,漆酶存在于植物、微生物、动物、昆虫的质体的各种器官或组织中。漆酶由日本人吉田[24]首次在紫胶漆树的渗出液中发现的,随后人们发现微生物(真菌、细菌)、动物、昆虫也能分泌这种酶。相对于植物和动物来讲,微生物漆酶来源相对丰富,主要分为真菌来源和细菌来源。漆酶在植物中主要起到合成木质素的作用,而真菌和细菌所分泌的漆酶作用恰恰相反,主要起降解木质素的作用

[25]。目前真菌来源的漆酶研究比较广泛而且深入, 为其他来源的漆酶研究积累了丰富的参考资料。

真菌漆酶最早由 Bertrand [26]发现, 之后很长一段时间未受关注, 直到白腐真菌的木质素降解功能被揭示, 真菌漆酶的研究才倍受瞩目。真菌漆酶具备多种生理生化功能, 广泛参与形态发生、与植物寄主相互作用、应激防御以及木质素降解等过程[27]。同时, 漆酶也与菌体色素合成、孢子产生、子实体发育[28]、逆境防御和腐殖质形成[29]等多种生物学过程有关。另外, 值得一提的是, 真菌产漆酶具有以下几个优点: (1) 真菌分泌的漆酶都是胞外酶, 使得漆酶的分纯化相比胞内酶而言稍显容易, 而且在胞外的稳定性也较好; (2) 真菌产酶效率高, 产生漆酶酶系结构较合理, 相互间可发生强烈的协同作用; (3) 真菌分泌漆酶可同时产生许多纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、淀粉酶等, 这些酶的协同效应可有效降解木质素, 真菌被认为是能够有效降解木质纤维素类物质的资源[30]。

目前漆酶的最普遍来源是真菌, 已知在多种真菌菌株分泌物中都检测到了漆酶的活性, 有许多报道称子囊菌纲(Ascomycetes)的许多真菌产漆酶, 例如 *Gaeumannomyces graminis*、*Magnaporthe grisea*、*Ophiostoma novoulmi*、*Melanocarpus albomyces*、*Monocillium indicum*、*Neurospora crassa*、*Podospora anserina* 等[31]。此外, 漆酶在担子菌纲和半知菌纲中也分布广泛, 例如研究较多的白腐菌、革菌属、栓菌属、蜜环菌属、多孔菌属、鬼伞属等[32], 近年来, 课题组从高寒草地土壤环境中筛选获得小皮伞属真菌能够分泌耐低温、偏酸性漆酶[33]。但是, 不同种类的真菌产生的降解木质纤维素酶的组分和用途不同[34]。因此, 有必要对来自不同背景的不同种类的真菌产生的酶进行深入地研究, 确证来自不同菌株的漆酶活性及其可利用性。

3.2. 漆酶生物转化酚类化合物的机理

酚类化合物是指芳香烃中苯环上的氢原子被羟基取代所生成的化合物, 是芳径的含羟基衍生物。根据其分子中所含的羟基数目可分为一元酚和多元酚。酚类化合物有易被氧化的官能团-羟基, 其氧化还原机理包括电子的转移、质子反应、氢键的形成、中间体自由基的产生等。漆酶(Laccase EC 1.10.3.2), 在木质纤维素类物质的生物降解方面有重要应用前景[27]。漆酶与木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase, LiP)和锰过氧化物酶(Manganese dependent peroxidase, MnP)共同构成木质素降解酶系[35]。就结构而言, 漆酶是一种含铜的糖蛋白氧化酶, 也称为多铜氧化酶; 其催化特性和激活位点上的四个铜原子有关[36]。漆酶是单电子氧化还原酶, 它催化不同类型底物氧化反应的机理主要表现在两方面。一方面是底物自由基中间体的生成。漆酶可催化氧化酚类和芳香胺类化合物, 同时分子氧被还原为水。在这一过程中, 漆酶从被氧化的底物分子中提取一个电子, 使之形成自由基, 该自由基不稳定, 可进一步发生聚合或解聚反应。在 O_2 存在下, 还原态漆酶被氧化, O_2 被还原为水。另一方面, 漆酶催化底物氧化和对 O_2 的还原是通过四个铜离子协同传递电子和价态变化来实现的。漆酶催化 4 个连续的单电子转移氧化还原性底物, 将分子氧还原为水。漆酶在氧化底物(例如单酚、二酚、多酚、氨基酚、甲氧基苯酚或芳香类化合物)过程中通过断开芳香基环或苯氧基的官能团, 将分子氧(O_2)还原为(H_2O) [37] [38]。但是, 漆酶的低氧化电位限制了其对非酚型木质素化合物的氧化能力[39] [40]。然而, 在合适的氧化还原介体存在时, 可以增加漆酶对非酚型木质素化合物作用的底物范围, 包括苯甲基和烯丙基醇类和醚类[41] [42] [43], 可催化氧化非酚型木质素化合物[44] [45] [46]; 这些介质可以来源于木质素降解过程中形成的衍生物, 也可以来源于真菌菌丝的此生代谢产物[31] [47]。研究发现, 愈创木酚(Guaiacol)和 1-羟基苯丙三唑(1-hydroxybenzotriazole, HBT)能够增加漆酶的活性[48], 在漆酶介导的降解木质素的过程中, 氧化木质素中的酚型单元形成苯氧自由基, 漆酶通过氧化底物形成中间产物而增加了氧化还原电位, 从而进一步氧化了底物[49], 漆酶也可以催化多种酚类和芳香胺类化合物的氧化[50]。因此, 漆酶可以有效降解和转化木质素相关结构[51] [52]。但漆酶具有其特异的氧化还原电位的机理仍不清楚。

4. 漆酶降解酚类化合物的应用

漆酶作为一种绿色环保的多酚氧化酶类,对有机芳香(尤其酚类)化合物及衍生物,均具有良好的降解效果,在生物质利用、工业废水的处理、污染环境的生物修复、动物营养以及生态系统物质循环等领域应用方面具有优势和潜力。

4.1. 生物质利用方面的应用

随着全球应对气候变化、节能减排和低碳经济所面临的压力,对生物转化和利用木质纤维素类物质的研究引起了学者们的关注和重视。从生物质利用的角度,研究降解农作物秸秆或能源植物木质纤维素类物质生产可再生能源,如生物燃料等,其核心内容就是木质纤维素类物质的降解。木质纤维素是植物细胞壁的主要成分,占植物总生物量 35%~50% [53] [54]。自然界中木质纤维素来源丰富,在自然状态下极难分解[55]。主要有两个原因:(1) 纤维素和半纤维素、木质素共价结合,纤维素被木质素包裹。(2) 纤维素形成致密的晶体结构,阻碍了纤维素酶分子与纤维素的接近[56]。(3) 木质纤维类物质的生物转化过程中产生一些小分子量的酚类化合物、包括丁香醛、羟基苯甲醛和香草醛等化合物,这些化合物对微生物分泌纤维素降解酶有钝化作用,并且抑制植物细胞壁物质的降解过程[57]。因此,降解多酚类化合物是实现木质纤维素类物质高效转化的基础。

植物化合物如芳香族聚合物是木质素分解过程的一个瓶颈[58]。迄今为止木质素分解研究中,木质素过氧化酶和锰氧化物酶、漆酶等胞外酶都参与降解植物木质素或残体[59]。由于它们的氧化还原潜力,木质素分解过氧化酶可以直接作用芳香族(优先酚醛)结构分子,而锰氧化物酶被认为是最常见的木质素修饰酶,漆酶能够氧化酚类化合物中的苯环,通过增加介质可以提高其降解效率[60] [61]。

4.2. 工业污染物处理及生物修复方面的应用

漆酶对许多难降解异生化合物,主要是有机芳香(尤其酚类)化合物及衍生物,均具有良好的降解效果。漆酶加剧五氯苯酚(PCP)等酚类物质及其衍生物的降解[62],可令多环芳烃几乎完全矿化[63],漆酶可使氯代农药彻底分解[64],漆酶对染料的脱色起重要作用[65],漆酶对 PAHs 的转化能力也已得到了广泛证实[66],具有漆酶活性的真菌对 PAHs 具有一定降解能力。因此被用于含酚废水的处理和污染环境的生物修复[67] [68]。因此,漆酶应用于工业氧化处理过程中,例如各类漂白[69]、生物去污[70]、制浆和造纸工业[71] [72]、去除除草剂[73] [74],生物燃料[75]。

4.3. 在动物营养方面的应用

植物酚类化合物含量较高,影响放牧家畜对营养物质的吸收和利用。多酚类化合物影响哺乳动物的行为[76] [77],单宁的存在会降低适口性,从而影响家畜的摄食量[78],植物单宁是动物的主要抗营养因素之一[79],影响动物对蛋白质、纤维素、淀粉和脂肪的消化,降低饲草料的营养价值。蛋白质消化率的降低主要由于单宁容易与蛋白质形成不易消化的复合物,降低蛋白质的利用率[80] [81],从而降低其它营养物质的消化率,其主要原因是单宁对主要的消化促进酶如纤维素酶的活性产生抑制作用[82],此外,单宁还与肠道表皮细胞发生反应,降低肠壁的渗透性,使养分难以通过肠壁吸收[83]。如果将多酚类化合物进行降解,形成小分子酚酸,可以有效提高多酚化合物的生物利用度。

4.4. 在生态系统物质循环方面的应用

多酚类化合物除了对生物的作用外,还能影响生态系统中的营养循环,起到抗贫瘠的作用,例如:生长在酸性、贫瘠土壤中的树木能利用单宁来提高氮元素的利用率[84] [85],从而使自身得到正常的生长

发育；另外，由于单宁的渗出影响了植株凋落物的降解率、腐殖质的形成、N 的循环和最终的植物营养[86]，漆酶可以降解酚类化合物，从而能够促进物质循环。已有的研究发现，在自然界的木质素降解过程中，用于纤维素降解的酶主要有羧甲基纤维素酶、滤纸糖酶等水解酶[87]，但由于纤维素通常与木质素紧密链接[88]，只有脱木质化后的纤维素才能够被微生物降解[89]。在自然界的木质素降解过程中，主要的降解酶以木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶为主[90]。郝杰杰等[91]对马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)落叶分解的研究中也发现，链格孢(*Alternaria* sp.)，青霉(*Penicillium* sp.)，头孢霉(*Cephalosporium* sp.)，木霉(*Trichoderma* sp.)，拟盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis* sp.)和烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)等6种半知菌前期的降解主要依赖于CMCase和FPA酶活性的高低，后期则由木质素酶和纤维素酶协同作用来决定。芦光新等[92][93]研究来自高寒草地土壤菌株*Microdochium bolleyi*对2种草坪草凋落物细胞壁物质的分解可以分为2个阶段：第1阶段菌株*Microdochium bolleyi*主要分泌漆酶，脱木质化是要经过解聚作用，然后才能降解利用木质素，漆酶出现的较早，可能为后期木质素解聚和降解奠定了基础；第2阶段主要是纤维素酶和木聚糖酶起主导作用，降解凋落物细胞壁中的纤维素和半纤维素；第3阶段菌株*Microdochium bolleyi*开始分泌木质素酶，并且与纤维素酶和半纤维素一并参与凋落物细胞壁物质的分解。

植物有机化合物的分解代表全球变化重要的过程[94]，其中包括元素循环在内的异养微生物参与的有机质分解是陆地生态系统中一个重要的物质循环和能量流动的重要部分[95]。早期对漆酶功能的研究主要集中在是白腐真菌及其对木材腐烂的功能方面([47], p.59)，随着分子生物学技术的发展，现在可以评估土壤微生物多样性和群落结构与复杂的生态系统的关系及其生态功能[96][97]。目前的研究的焦点已经转移到不同土壤生态系统，如植物凋落物、森林土壤和矿物质土壤。采用网袋法对单一或混合植物凋落物降解的研究为更好地理解植物凋落物分解的机制及影响因素奠定了基础[98]。研究发现，在木质素含量丰富的土壤有机质降解的后期，多酚氧化酶(漆酶)活性增加，并且真菌生物量也增加[99][100]。然而，通过对比针叶林和落叶两种凋落物类型的可分解性，不仅揭示了木质素含量和分解率之间的相关性，而且也指出植物凋落物中氮含量的影响[101]。类似的研究也发现不同类型的森林有机层，橡树森林有机层的酚氧化酶活性比枫树-椴木森林有机层的含量高[102][103]，这表明不同类型的有机质影响土壤微生物酶活性降解木质素和酚类化合物，进而影响碳(C)存储、SOM形成和凋落物对营养的释放。不管凋落物类型，相关酶活性与微生物(真菌)群落的生物量、丰富度、组成及其分布有关[104][105]。从生态的角度来看，这些研究体现链接生态系统过程与生物之间的重要性，特别是生物多样性及其酶活性之间的关系[95][96][106]。

5. 研究展望

漆酶作为一种绿色环保的多酚氧化酶类，对有机芳香化合物(尤其酚类)及衍生物均具有良好的降解效果，在生物质利用、工业废水的处理、污染环境的生物修复以及在食品和动物营养等领域应用方面具有优势和潜力。国内外很多文献报道产漆酶微生物具有很大的开发潜力和应用前景，对漆酶的价值进行了深入地研究，涉及到各个领域，是一个新的研究热点，但仍存在不少问题。如漆酶商业化应用中缺少大量廉价的酶源供应，菌株合成漆酶水平偏低，生长缓慢，重组酶催化效率低等。近年来，现代分子生物学和蛋白工程技术的突破，为研究基因表达和重组酶提供了强有力的技术手段。我们认为今后应该加强以下几方面的研究：

(1) 尽管漆酶的应用价值广，但是植物、动物、昆虫等天然来源的漆酶产量低、价格昂贵，依赖野生天然来源的漆酶生产，难以满足工业需求，漆酶的产业化受到限制。因此，从不同环境中分离和筛选产漆酶真菌，了解真菌的生物学特性和产酶特性，明确产漆酶的酶学性质和酶的稳定性，仍然是人们继续努力的方向和目标，寻求产漆酶的生物资源是摆在人们面前亟待解决的问题。

(2) 菌株合成漆酶水平偏低, 生长缓慢, 鉴于大多数微生物分泌漆酶的量仍然非常有限, 研究如何增加真菌漆酶的产量, 利用发酵条件较易实现, 生产周期较短且酶活性保持较稳定的漆酶会更有现实价值。

(3) 漆酶在高温易失活等又是其应用受阻的一个重要原因, 需加强对不同漆酶分子晶体结构的研究, 通过比较其结构异同来研究漆酶的性质与功能; 通过研究不同漆酶分子活性中心的序列与结构差异, 研究不同漆酶间不同的催化机制, 为高活性漆酶在蛋白质水平的改造提供依据; 加强分子生物学及分子遗传学领域的研究, 了解漆酶基因的结构、功能及其在转录、翻译等各个水平的表达调控机制, 进而从基因水平对漆酶及产酶菌株进行优化。

(4) 蛋白质工程技术可以用来优化各种漆酶催化活性。漆酶的异源表达系统的构建和利用为漆酶工业化大规模生产提供了一条新的可发展途径。重组漆酶已经报道, 但重组漆酶效率低。开发漆酶高表达菌株, 探索酶合成代谢的影响因子及其作用规律, 构建漆酶基因工程菌和基因敲除、诱变等方法将大大促进真菌漆酶功能与表达调控机制的研究。

(5) 漆酶作为一种环境友好的绿色催化剂, 因其催化反应条件温和、无毒副产物产生而日益引起关注。在介体分子的协助下, 漆酶的底物范围大大拓宽, 其催化反应速率和转化率也得以大幅提高, 因此, 产漆酶微生物在有机污染物降解方面具有广阔的应用前景。但是, 目前漆酶对酚类化合物的降解都是以某一类酚为材料进行功能实验, 并且大多为单一方法进行, 尚未将物理、化学及生物方法结合起来进行研究, 多酚的构效关系及不同酚类化合物的降解机理还不清楚等问题, 对于酚类化合物的降解的研究仍有待学者们的进一步深入。

(6) 开拓漆酶新的应用领域和应用途径。漆酶是最适用于土壤分子生态学研究, 在最近大量的研究中, 漆酶编码的基因被用作分子标记, 用于研究在生态或环境变量的影响下与凋落物分解和土壤有机质循环有关的土壤真菌的结构和功能多样性。随着分子生物学的发展, 将土壤环境真菌漆酶基因多样性与胞外酶的活性和植物凋落物分解联系起来, 对研究真菌漆酶在物质循环和能量流动中的作用, 具有重要的意义。

基金项目

国家自然科学基金项目(31460152, 41261064)资助。

参考文献 (References)

- [1] Song, L.J., Di, Y. and Shi, B. (2000) The Significance and Development Trend in Research of Plant Polyphenols. *Progress in Chemistry*, **12**, 161-170.
- [2] 郑巧英. 酚类物质在土壤中的生物降解[J]. 农业环境保护, 1995, 12(2): 82-84, 90.
- [3] Puma, G.L. and Yue, P.L. (1999) Photocatalytic Oxidation of Chlorophenols in Single-Component and Multicomponent Systems. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **38**, 3238-3245.
- [4] Wang, F., Liu, Y., Wang, Y., *et al.* (2012) Laccase and Its Applications. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, **10**, 70-75.
- [5] Haslam, E. (1989) Plant Polyphenols-Vegetable Tannins Revisited. Cambridge University Press, Cambridge, 170.
- [6] 林樱姬, 赵萍, 王雅. 植物多酚的提取方法和生物活性研究进展[J]. 陕西农业科学, 2009, 55(6): 105-107.
- [7] Hernes, P.J., Benner, R., Cowie, G.L., *et al.* (2001) Tannin Diagenesis in Mangrove Leaves from a Tropical Estuary: A Novel Molecular Approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **65**, 3109-3122.
[https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00641-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00641-X)
- [8] Weichselbaum, E. and Buttriss, J.L. (2010) Polyphenols in the Diet. *Nutrition Bulletin*, **35**, 157-164.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2010.01821.x>
- [9] Yang, Y., Yang, R.L., Zou, Y.X., *et al.* (2014) Recent Advances in Biotransformation of Natural Polyphenols by Gut Microflora. *Food Science*, **35**, 319-325.
- [10] Bi, L.W., Wu, Z.S., Chen, J.H., *et al.* (1997) Study on Preparation of Pharmaceutical Tannic Acid by Solvent-Extraction. *Chemistry and Industry of Forest Products*, **17**, 41-45.

- [11] Wang, X.F. and Zhang, H. (2012) Research Advances of Polyphenols Physiology Function. *Food Research and Development*, **33**, 211-214.
- [12] 狄莹, 石碧. 植物单宁化学研究进展[J]. 化学通报, 1999(3): 1-5.
- [13] Pang, D.R., Liu, F., Liao, S.T., *et al.* (2013) Research Progress and Application of Plant Polyphenols Compounds. *Guangdong Agricultural Sciences*, **4**, 91-94.
- [14] Huber, M.M., Canonica, S., Park, G.Y., *et al.* (2003) Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes. *Environmental Science & Technology*, **37**, 1016-1024.
- [15] Shindo, H. and Huang, P.M. (1982) Role of Mn(IV) Oxide in Abiotic Formation of Humic Substances in the Environment. *Nature*, **298**, 363-365. <https://doi.org/10.1038/298363a0>
- [16] Stone, A.T. and Morgan, J.J. (1984) Reduction and Dissolution of Manganese(III) and Manganese(IV) Oxides by Organics. I. Reaction with Hydroquinone. *Environmental Science & Technology*, **18**, 450-456. <https://doi.org/10.1021/es00124a011>
- [17] Li, C., Li, X.Z., Graham, N., *et al.* (2008) The Aqueous Degradation of Bisphenol A and Steroid Estrogens by Ferrate. *Water Research*, **42**, 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.023>
- [18] Lee, J., Kim, J. and Choi, W. (2007) Oxidation on Zerovalent Iron Promoted by Polyoxometalate as an Electron Shuttle. *Environmental Science & Technology*, **41**, 3335-3340. <https://doi.org/10.1021/es062430g>
- [19] Kang, S.H. and Choi, W. (2009) Oxidative Degradation of Organic Compounds Using Zero-Valent Iron in the Presence of Natural Organic Matter Serving as an Electron Shuttle. *Environmental Science & Technology*, **43**, 878-883. <https://doi.org/10.1021/es801705f>
- [20] Bollag, J.M. (1992) Enzymes Catalyzing Oxidative Coupling Reactions of Pollutants. *Metal Ions in Biological Systems*, **28**, 205-217.
- [21] Duran, N. and Esposito, E. (2000) Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-Like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: A Review. *Applied Catalysis B: Environment*, **28**, 83-99. [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(00\)00168-5](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(00)00168-5)
- [22] Huang, Q.G., Selig, H. and Weber, W.J. (2002) Peroxidase-Catalyzed Oxidative Coupling of Phenols in the Presence of Geosorbents: Rates of Non-Extractable Product Formation. *Environmental Science & Technology*, **36**, 596-602. <https://doi.org/10.1021/es010512t>
- [23] Lawrence, Y. and Jian, Y. (1997) Ligninase-Catalysed Decolorization of Synthetic Dyes. *Water Research*, **31**, 1187-1193. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00380-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00380-6)
- [24] Yoshi, H. (1883) Chemistry of Lacquer. *Journal of the Chemical Society*, **43**, 472-486.
- [25] Bao, W.O., Malley, D.M., Whetten, R., *et al.* (1993) A Laccase Associated with Lignification in Loblolly Pine Xylem. *Science*, **260**, 672-674. <https://doi.org/10.1126/science.260.5108.672>
- [26] Bertrand, G. (1896) Preparation biochimique du sorbose. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences*, **122**, 900-903.
- [27] Lundell, T.K., Mäkelä, M.R. and Hildén, K. (2010) Lignin-Modifying Enzymes in Filamentous Basidiomycetes-Ecological, Functional and Phylogenetic Review. *Journal of Basic Microbiology*, **50**, 5-20. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900338>
- [28] Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., *et al.* (2003) Biosynthesis of Fungal Melanins and Their Importance for Human Pathogenic Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **38**, 143-158. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00526-1](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00526-1)
- [29] Burke, R.M. and Cairney, J.W.G. (2002) Laccases and Other Polyphenol Oxidases in Ecto- and Ericoid Mycorrhizal Fungi. *Mycorrhiza*, **12**, 105-116. <https://doi.org/10.1007/s00572-002-0162-0>
- [30] Lu, L., Zhao, M., Zhang, B.B., *et al.* (2007) Purification and Characterization of Laccase from *Pycnoporus sanguineus* and Decolorization of an Anthraquinone Dye by the Enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**, 1232-1239. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0767-x>
- [31] Baldrian, P. (2006) Fungal Laccases-Occurrence and Properties. *FEMS Microbiology Reviews*, **30**, 215-242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
- [32] Smith, M., Shnyreva, A., Wood, D.A., *et al.* (1998) Tandem Organization and Highly Disparate Expression of the Two Laccase Genes *lcc1* and *lcc2* in the Cultivated Mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, **144**, 1063-1069. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-4-1063>
- [33] 芦光新, 王军邦, 陈秀蓉, 等. 东祁连山高寒草地土壤产漆酶真菌的筛选、鉴定及产酶条件的初步研究[J]. 草业学报, 2014, 23(2): 243-252.
- [34] Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., *et al.* (2010) Laccases: A Never-Ending Story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 369-385. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>

- [35] Hakulinen, N., Kiiskinen, L.L., Kruus, K., *et al.* (2002) Crystal Structure of a Laccase from *Melanocarpus albomyces* with an Intact Trinuclear Copper Site. *Nature Structural Biology*, **9**, 601-605. <https://doi.org/10.1038/nsb823>
- [36] Solomon, E.I., Sundaram, U.M. and Machonkin, T.E. (1996) Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*, **96**, 2563-2605. <https://doi.org/10.1021/cr950046o>
- [37] Thurston, C.F. (1994) The Structure and Function of Fungal Laccases. *Microbiology*, **140**, 19-26. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>
- [38] Wong, D.W.S. (2008) Structure and Action Mechanism of Lignolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **157**, 174. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>
- [39] Kersten, P.J., Kalyanaraman, B., Hammel, K.E., *et al.* (1990) Comparison of Lignin Peroxidase, Horseradish Peroxidase and Laccase in Theoxidation of Methoxybenzenes. *Biochemistry Journal*, **268**, 475-480. <https://doi.org/10.1042/bj2680475>
- [40] Ten Have, R. and Teunissen, P.J.M. (2001) Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi. *Chemical Reviews*, **101**, 3397-3414. <https://doi.org/10.1021/cr000115l>
- [41] Crestini, C. and Argyropoulos, D.S. (1998) The Early Oxidative Biodegradation Steps of Residual Kraft Lignin Models with Laccase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **6**, 2161-2169. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(98\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(98)00173-4)
- [42] Fabbrini, M., Galli, C. and Gentili, P. (2002) Comparing the Catalytic Efficiency of Some Mediators of Laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **16**, 231-240. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(01\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(01)00067-4)
- [43] Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P., *et al.* (2001) An Oxidation of Alcohols by Oxygen with the Enzyme Laccase and Mediation by TEMPO. *Tetrahedron Letters*, **42**, 7551-7553. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)01463-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01463-0)
- [44] Chadwick, R.J. (1995) Enhanced Enzyme Removal of Chloro-Phenols in the Presence of Cosubstrates. *Water Research*, **29**, 2720-2724. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00101-P](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00101-P)
- [45] Bollag, J.M., Shulleworh, K.L. and Anderson, D.H. (1998) Laccase Mediated Detoxification of Phenolic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 3086-3091.
- [46] Bajpai, P. (1999) Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry. *Biotechnology Progress*, **15**, 147-157. <https://doi.org/10.1021/bp990013k>
- [47] Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., *et al.* (2001) Fungal Laccase: Properties and Activity on Lignin. *Journal of Basic Microbiology*, **41**, 185-227. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200107\)41:3/4<185::AID-JOBM185>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200107)41:3/4<185::AID-JOBM185>3.0.CO;2-T)
- [48] Kang, K.H., Dec, J., Park, H., *et al.* (2002) Transformation of the Fungicide Cyprodinil by a Laccase of *Trametes villosa* in Presence of Phenolic Mediators and Humic Acid. *Water Research*, **36**, 4907-4915. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00198-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00198-7)
- [49] Cantarella, G., Galli, C. and Gentili, P. (2003) Free Radical versus Electron-Transfer Routes of Oxidation of Hydrocarbons by Laccase/Mediator Systems: Catalytic or Stoichiometric Procedures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **22**, 135-144. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00198-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00198-7)
- [50] 韩君莉, 郭丽琼, 林俊芳. 漆酶结构的研究进展[J]. 生物加工过程, 2006, 4(4): 1-6.
- [51] Frasconi, M., Favero, G., Boer, H., *et al.* (2010) Kinetic and Biochemical Properties of High and Low Redox Potential Laccases from Fungal and Plant Origin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **18**, 899-908. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.018>
- [52] Sidhu, S.S., Huang, Q., Carrow, R.N., *et al.* (2012) Use of Fungal Laccases to Facilitate Biodethatching: A New Approach. *HortScience*, **47**, 1536-1542.
- [53] Lyndl, R., Paul, J.W., Vanzyl, W.H., *et al.* (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**, 506-577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- [54] Hou, P.B., Li, Y.Z., Wu, B.Z., *et al.* (2006) Cellulolytic Complex Exists in Cellulolytic Myxobacterium Sorangium. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 273-278. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.08.044>
- [55] Hankin, L. and Anagnostakis, S.L. (1977) Solid Medium Containing Carboxymethyl Cellulose to Detect CX Cellulase Activity of Microorganisms. *Journal of General Microbiology*, **98**, 109-105. <https://doi.org/10.1099/00221287-98-1-109>
- [56] Wei, H., Xu, Q., Larry, E., *et al.* (2009) Natural Paradigms of Plant Cell Wall Degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, **20**, 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.008>
- [57] Savitha, S.D., Gururaj, B.T., Nityanand, C., *et al.* (2011) Isolation of Laccase Producing Fungi and Partial Characterization of Laccase. *Biotechnology and Bioengineering*, **1**, 543-549
- [58] Berg, B. and McLaugherty, C. (2003) Plant Litter, Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration. Springer, Berlin, 300.
- [59] Allison, S.D., LeBauer, D.S., Rosario, O.M., *et al.* (2009) Low Levels of Nitrogen Addition Stimulate Decomposition by Boreal Forest Fungi. *Soil Biology & Biochemistry*, **41**, 293-302. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.032>

- [60] Martínez, Á.T., Speranza, M., Ruiz Dueñas, F.J., *et al.* (2005) Biodegradation of Lignocellulosics: Microbial, Chemical and Enzymatic Aspects of the Fungal Attack of Lignin. *International Microbiology*, **8**, 195-204.
- [61] Steffen, K.T., Cajthaml, T., Šnajdr, J., *et al.* (2007) Differential Degradation of Oak (*Quercus petraea*) Leaf Litter by Litter Decomposing Basidiomycetes. *Research in Microbiology*, **158**, 477-455. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.04.002>
- [62] Ricotta, A., Unz, R.F., Bollag, J.M., *et al.* (1996) Role of a Laccase in the Degradation of Pentachlorophenol. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **57**, 560-567. <https://doi.org/10.1007/s001289900227>
- [63] Majcherczyk, A., Johannes, C. and Huttermann, A. (1998) Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by Laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 335-341. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00199-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00199-3)
- [64] 缪静, 姜竹茂. 漆酶的最新研究进展[J]. 烟台师范学院学报(自然科学版), 2001, 17(2): 146-150.
- [65] Elithabeth, R., Michael, A.P. and Rafael, V.D. (1999) Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. *Current Microbiology*, **38**, 27-32. <https://doi.org/10.1007/PL00006767>
- [66] 王晓锋, 张磊. 有机污染土壤的微生物修复研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(2): 125-132.
- [67] Klibanov, A.M., Tu, T.M. and Scott, K.P. (1983) Peroxidase-Catalyzed Removal of Phenols from Coal-Conversion Waste Waters. *Science*, **221**, 259-261. <https://doi.org/10.1126/science.221.4607.259-a>
- [68] Yu, J., Taylor, K.E., Zou, H.X., *et al.* (1994) Phenol Conversion and Dimeric Intermediates in Horseradish Peroxidase-Catalyzed Phenol Removal from Water. *Environmental Science & Technology*, **28**, 2154-2160. <https://doi.org/10.1021/es00061a025>
- [69] Chhabra, M., Mishra, S. and Sreekrishnan, T.R. (2008) Mediator-Assisted Decolorization and Detoxification of Textile Dyes/Dye Mixture by *Cyathus bulleri* Laccase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **151**, 587-598. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8234-z>
- [70] Jadhav, U.U., Dawkar, V.V., Ghodake, G.S., *et al.* (2008) Biodegradation of Direct Red 5B, A Textile Dye by Newly isolated *Comamonas* sp UVS. *Journal of Hazardous Materials*, **158**, 507-516. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.01.099>
- [71] Oudia, A., Queiroz, J. and Simões, R. (2008) Potential and Limitation of *Trametes versicolor* Laccase on Biodegradation of *Eucalyptus globulus* and *Pinus pinaster* Kraft Pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, **43**, 144-148. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.016>
- [72] Virk, A.P., Sharma, P. and Capalash, N. (2012) Use of Laccase in Pulp and Paper Industry. *Biotechnology Progress Biotechnology*, **28**, 21-32. <https://doi.org/10.1002/btpr.727>
- [73] Coelho, J.S., Souza, C.G.M., Oliveira, A.L., *et al.* (2010a) Comparative Removal of Bentazon by *Ganoderma lucidum* in Liquid and Solid State Cultures. *Current Microbiology*, **60**, 350-355. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9548-y>
- [74] Coelho, J.S., Oliveira, A.L., Souza, C.G.M., *et al.* (2010b) Effect of the Herbicides Bentazon and Diuron on the Production of Ligninolytic Enzymes by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **64**, 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.12.006>
- [75] Parawira, W. and Tekere, M. (2011) Biotechnological Strategies to Overcome Inhibitors in Lignocellulose Hydrolysates for Ethanol Production: Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, **31**, 20-31. <https://doi.org/10.3109/07388551003757816>
- [76] Waterman, P.G. and Mole, S. (1994) Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- [77] Schultz, J.C. (1989) Tannin-Insect Interactions. Chemistry and Significance of Condensed Tannins. Plenum Press, New York, 417-433. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7511-1_26
- [78] Van Hoven, W. (1984) Tannins and Digestibility in Greater Kudu. *Canadian Journal of Plant Science*, **64**, 177-198. <https://doi.org/10.4141/cjas84-212>
- [79] Hagerman, A.E. and Butler, L.G. (1989) Choosing Appropriate Methods and Standards for Assaying Tannins. *Chemical Ecology*, **15**, 1795-1810. <https://doi.org/10.1007/BF01012267>
- [80] Butler, L.G., Riedle, D.L., Lebyrk, D.G., *et al.* (1984) Interaction of Proteins with Sorghum Tannin: Mechanism, Specificity and Significance. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **61**, 916-920. <https://doi.org/10.1007/BF02542166>
- [81] Reddy, N.R., Pierson, M.D., Sathe, S.K., *et al.* (1985) Dry Bean Tannins: A Review of Nutritional Implications. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **62**, 541-549. <https://doi.org/10.1007/BF02542329>
- [82] Van-Soest, P.J. and McDowell, R.E. (1987) Predicting the Digestibility of Tropic Al Browse. *Journal of Animal Science*, **65**, 339.

- [83] Harborne, J.B. (1984) Phenolic Compounds. In: *Phytochemical Methods*, Springer, Netherlands, 37-99.
- [84] Northrup, R.R. and Vogt, K.A. (1995) Polyphenol Control of Nitrogen Release from Pine Litter. *Nature*, **377**, 227-229. <https://doi.org/10.1038/377227a0>
- [85] Appel, H.M. (1993) Phenolics in Ecological Interactions: The Importance of Oxidation. *Chemical Ecology*, **19**, 1521-1552. <https://doi.org/10.1007/BF00984895>
- [86] Baldrian, P. (2009) Ectomycorrhizal Fungi and Their Enzymes in Soils: Is There Enough Evidence for Their Role as Facultative Soil Saprotrophs? *Oecologia*, **161**, 657-660. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1433-7>
- [87] Takashima, S., Iikura, H., Nakamura, A., *et al.* (1998) Over Production of Recombinant *Trichoderma reesei* Cellulases by *Aspergillus oryzae* and Their Enzymatic Properties. *Biotechnology Letter*, **65**, 163-171.
- [88] Lee, J. (1997) Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. *Journal of Biotechnology*, **56**, 1-24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00073-4)
- [89] Boominathan, K. and Reedy, C.A. (1992) Fungal Degradation of Lignin. In: Arora, D.S., Elander, R.P., Mukerji, K.G., *et al.*, Eds., *Handbook of Applied Mycology*, Vol. 4, Marcel Dekker, New York, 763-782.
- [90] Sugiura, M., Hirai, H. and Nishida, T. (2003) Purification and Characterization of a Novel Lignin Peroxidase from White-Rot Fungus *Phanerochaete sordida* YK-6241. *FEMS Microbiology Letters*, **224**, 285-290. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00447-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00447-6)
- [91] 郝杰杰, 宋福强, 田兴军, 等. 几株半知菌对马尾松落叶的分解——木质纤维素酶的活性动力学[J]. 林业科学, 2006, 42(11): 69-75.
- [92] 芦光新, 陈秀蓉, 杨成德, 等. 一株纤维素分解菌的鉴定及对两种草坪草凋落物分解活性的研究[J]. 草业学报, 2011a, 20(6): 170-179.
- [93] 芦光新, 陈秀蓉, 杨成德, 等. 真菌分泌纤维素酶与2种草坪草凋落物有机质降解相互关系的研究[J]. 草地学报, 2011b, 19(6): 954-959.
- [94] Sinsabaugh, R.L., Lauber, C.L., Weintraub, M.N., *et al.* (2008) Stoichiometry of Soil Enzyme Activity at Global Scale. Reviews and Synthesis. *Ecological Letters*, **11**, 1252-1264.
- [95] Prescott, C.E. (2005) Do Rates of Litter Decomposition Tell Us Anything We Really Need to Know? *Forest Ecology and Management*, **220**, 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.08.005>
- [96] Leckie, S.E. (2005) Methods of Microbial Community Profiling and Their Application to Forest Soil. *Forest Ecology and Management*, **220**, 88-106. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.08.007>
- [97] Zak, D.R., Blackwood, C.B. and Waldrop, M.P. (2006) A Molecular Dawn for Biogeochemistry. *Trends in Ecology & Evolution*, **21**, 288-295. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.04.003>
- [98] Gartner, T.B. and Cardon, Z.G. (2004) Decomposition Dynamics in Mixed-Species Leaf Litter. *Oikos*, **104**, 230-246. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.12738.x>
- [99] Di Nardo, C., Cinquegrana, A., Papa, S., *et al.* (2004) Laccase and Peroxidase Isoenzymes during Leaf Litter Decomposition of *Quercus ilex* in a Mediterranean Ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, **36**, 1539-1544. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.013>
- [100] Fioretto, A., Papa, S., Curcio, E., *et al.* (2000) Enzyme Dynamics on Decomposition of *Cistus incanus* and *Myrtus communis* in a Mediterranean Ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, **32**, 1847-1855. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00158-9)
- [101] Berg, B. and Meentemeyer, V. (2002) Litter Quality in a North European Transect versus Carbon Storage Potential. *Plant Soil*, **242**, 83-92. <https://doi.org/10.1023/A:1019637807021>
- [102] Gallo, M., Amonette, R., Lauber, C., *et al.* (2004) Microbial Community Structure and Oxidative Enzyme Activity in Nitrogen-Amended North Temperate Forest Soils. *Microbial Ecology*, **48**, 218-229. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-9001-x>
- [103] Sinsabaugh, R.L., Gallo, M.E., Lauber, C., *et al.* (2005) Extracellular Enzyme Activities and Soil Organic Matter Dynamics for Northern Hardwood Forests Receiving Simulated Nitrogen Deposition. *Biogeochemistry*, **75**, 201-215. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-7112-1>
- [104] Lindahl, B.D., Ihrmark, K., Boberg, J., *et al.* (2007) Spatial Separation of Litter Decomposition and Mycorrhizal Nitrogen Uptake in a Boreal Forest. *New Phytologist*, **173**, 611-620. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01936.x>
- [105] Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., *et al.* (2008) Spatial Variability of Enzyme Activities and Microbial Biomass in the Upper Layer of *Quercus petraea* Forest Soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**, 2068-2075. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.015>
- [106] Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., *et al.* (2003) Microbial Diversity and Soil Functions. *European Journal of Soil Science*, **54**, 655-670. <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：amb@hanspub.org