

百草枯对木质素降解菌产酶及其生物化学变化的影响

赵芸晨^{1,2}, 李建龙¹, 陈育如³, 黄海霞¹, 余醉¹

1 南京大学生命科学院 国家医药重点实验室, 南京 210093

2 河西学院农学系, 张掖 734000

3 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046

摘要: 为研究外源活性氧对木质素降解菌的影响, 本实验对外源百草枯诱导下的杂色云芝(*Coriolus versicolor*)产酶及其生物化学过程进行了研究。将一定浓度的百草枯加入培养 7 d 的杂色云芝菌培养液中, 连续培养 148 h, 测定其胞外木质素降解酶、胞内抗氧化酶的活性及生物化学参数的变化。与对照相比, 30 $\mu\text{mol/L}$ 的百草枯能够显著促进杂色云芝锰依赖过氧化物酶(MnP)、木质素过氧化物酶(LiP)和漆酶(Lac)的活性, 3 种酶活性分别提高了 1.3、7 和 2.5 倍; 在连续培养的前 48 h, 30 $\mu\text{mol/L}$ 的百草枯促进了胞内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的活性。百草枯对于胞外木质素降解酶活性的促进作用比对胞内抗氧化酶活性的促进作用明显。百草枯的加入促进了胞外酚类化合物与甲醛的浓度的增加, 而丙二醛的浓度在培养的前 24 h 内增加, 随后下降。结果表明, 百草枯的加入对白腐菌产生了氧化胁迫, 但菌株的抗氧化系统能够有效地进行氧化剂的清除, 从而阻止氧化剂对机体的氧化伤害。百草枯作为外源氧化胁迫剂, 可以增加木质素降解酶活性, 有利于木质素的降解。

关键词: 杂色云芝, 百草枯, 氧化胁迫, 木质素降解酶, 甲醛

Impact of exogenous paraquat on enzyme exudation and biochemical changes of lignin degradation fungi

Yunchen Zhao^{1,2}, Jianlong Li¹, Yuru Chen³, Haixia Huang¹, and Zui Yu¹

1 State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China

2 Department of Agronomy, Hexi University, Zhangye 734000, China

3 School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

Abstract: To study the effect of exogenous oxygen, we added water solution of paraquat to 7 d cultures of *Coriolus versicolor* for the next 148 h. Enzyme exudation and biochemical process were investigated on the addition of paraquat. We found that compared with the control (without paraquat), the addition of 30 $\mu\text{mol/L}$ paraquat stimulated the activity of manganese dependent peroxidase (MnP), lignin peroxidase(LiP), and laccases (Lac) 7, 2.5 and 1.3 times, respectively. Also, addition of paraquat enhanced activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in the first 48 h. Impact of paraquat on ligninolytic enzymes was significant than that on antioxidant enzyme. Addition of paraquat enhanced phenolic compounds and formaldehyde of cultures too. And concentration of malondialdehyde was increased in the first 24 h. The results showed that addition of paraquat promoted oxidative stress, but the antioxidant systems of the fungal strain are sufficient to prevent mycelia from oxidative stress. As exogenous oxygen, paraquat might be a useful substrate in degradation of lignocellulose.

Received: March 12, 2009; Accepted: June 9, 2009

Corresponding author: Jianlong Li. Tel: +86-25-83592715; E-mail: Jlli2008@nju.edu.cn, jianlongli@gmail.com

Keywords: *Coriolus versicolor*, paraquat, oxidative stress, ligninolytic enzymes, formaldehyde

木质纤维类物质被充分利用生产生物燃料的过程中必须先降解或分离木质素。木质素的降解包括化学、生物、物理或综合处理方式。其中生物预处理具有耗能少、环境条件温和的优点。微生物降解木质素的原理是利用其代谢产生的酶,在常温常压下把复杂的木质素转化为小分子。在木质素的降解菌中,白腐菌是使用最广泛的木质素降解菌。白腐菌能产生完全的木质素降解酶体系,从而解聚和彻底降解木质素^[1]。但自然条件下白腐菌产酶量有限,限制了降解的完全程度。因此提高白腐菌分泌木质素降解酶能力,从而更有效地降解木质素对提高木质纤维类物质的利用具有重要的意义。

活性氧是好氧微生物进行氧代谢时产生的一类化学性质非常活泼的物质,主要包括超氧阴离子自由基、过氧化氢和羟自由基等。白腐菌的木质素降解过程与活性氧之间有很大的相关性,活性氧是胞外木质素降解系统中的一种有用的物质^[2-3],是木质素降解的启动因子^[4-5]。正常情况下细胞自身活性氧的产生和清除代谢是平衡的,但当活性氧的水平超过细胞的抗氧化能力时,对细胞产生氧化胁迫。活性氧作为一种氧化胁迫因子,同时又参与白腐菌对木质素的降解,因此研究活性氧存在时白腐菌的氧化胁迫反应及相关的木质素降解过程具有重要的意义。本实验以百草枯作为外源氧化胁迫剂,以期研究百草枯存在下白腐菌木质素降解酶的产生情况及其生物化学反应,为外源氧化剂与木质素降解之间的相关性提供了一定的理论依据,为木质素的有效降解提供了新的途径。

1 材料与方法

1.1 实验菌种

杂色云芝 009 (*Coriolus versicolor*), 购于南京林业大学菌种保藏中心。

1.2 培养基与培养条件

PDA 固体培养基: 马铃薯浸汁 1 L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, 120 °C 灭菌 20 min。

PDA 液体培养基: 马铃薯浸汁 1 L, 葡萄糖 20 g/L,

120 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基: 10 mmol/L 的醋酸缓冲液(pH 4.5), 内含有葡萄糖 2 g/L, 酒石酸铵 12 mmol/L, KH_2PO_4 1.47×10^{-2} mol/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.03×10^{-3} mol/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6.8×10^{-4} mol/L, VB 12.97×10^{-6} mol/L, 1 g 吐温 80 与 7 mL 微量元素混合液^[6], 120 °C 灭菌 30 min。

培养方法: 将斜面菌种接种于 PDA 固体平板培养基, 当菌体长满平板时用打孔器打下 3~4 片 9 mm² 大小的菌片, 放入 PDA 液体培养基, 于 28 °C、150 r/min 下培养至菌体长满培养基表面, 用匀浆器将菌体混匀后以 2.5% 的接种比例接种于发酵培养基, 28 °C、150 r/min 培养 7 d。

氧化胁迫条件: 百草枯添加浓度通过实验由漆酶活性大小进行确定。本实验所用百草枯的终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$, 于实验开始前准备百草枯水溶液, 直接加入液体培养基, 继续培养 148 h, 培养条件同上。

1.3 测定液的准备

所有测定在加入百草枯 24、48、72、120、148 h 时进行。测定前取一定体积混匀的菌体培养物, 将混匀物在 4000 r/min 下离心 10 min, 上清液用于胞外木质素降解酶(锰依赖过氧化物酶、木质素过氧化物酶、漆酶), 以及低分子物质(甲醛、丙二醛、超氧阴离子、酚类化合物)的测定。用蒸馏水清洗离心后的菌体沉淀物, 再将菌体沉入冷(3 °C~4 °C)磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 7.4)。再用匀浆器在冰浴中保持 4 °C~6 °C 将细胞打破, 破碎细胞于 4 °C 10 000 r/min 下离心 10 min, 收集上清液用于胞内抗氧化酶的测定。

1.4 酶活性测定方法

1.4.1 木质素降解酶活性测定

漆酶(Lac)活性测定采用 Arora 法^[7], 测定过程稍有改动。反应液中包含 3.8 mL 琥珀酸缓冲液、1 mL 愈创木酚、0.2 mL 酶提取液, 反应完成后于 450 nm 处测定分光光度值的变化。木质素过氧化物酶活性(LiP)的测定采用 Tien 法^[8], 也进行了一定的改进, 反应液中加入 0.1 mL H_2O_2 启动反应, 310 nm 测定分光光度值的改变量; 锰过氧化物酶(MnP)活性测定采用 Wariishi 法^[9], 反应终浓度为 0.1 mmol/L 的

H₂O₂ 启动。酶活性的表示方法采用比活力表示为 U/mg 蛋白。

1.4.2 抗氧化酶活性的测定

超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用 Marklund 法^[10], 测定结果以对焦酚自氧化抑制的百分率表示 (1 U=50%的抑制率)。过氧化氢酶(CAT)活性测定采用 Aebi 法^[11], 酶活性的表示方法采用比活力表示为 U/mg 蛋白。

1.5 小分子代谢物质的测定

甲醛浓度的测定: 采用钠氏试剂分光光度法在 410 nm 下进行测定^[12], 测定结果代入标准曲线计算 ($y=0.0457x-0.0039$, $R^2=0.999$)。

酚化合物的测定: 采用磺胺 DASA 检测法, 500 nm 下测定吸光度的变化^[13], 测定结果代入标准曲线计算 ($y=6.35x-0.0213$, $R^2=0.997$)。

超氧阴离子的测定: 采用菌体超氧阴离子产生的快速测定法, 560 nm 下测定吸收值的变化(对照每毫升中含有 40 μ L/mg 的商用 SOD 酶)^[14]。

丙二醛含量的测定: 采用 TBA 法, 分光光度计检测 TBA 的产生量^[15], 并消除影响因子值。

1.6 蛋白质含量的测定

蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法, 以牛血清为标准品^[16]。

2 结果

2.1 百草枯对菌体蛋白含量的影响

外源百草枯加入后, 随着培养时间的增加, 对照的菌体蛋白先下降后上升, 而百草枯处理菌体蛋白含量呈现先下降后上升又下降的趋势(表 1)。

2.2 百草枯对木质素降解酶活性的影响

外源百草枯的加入引起了胞外木质素降解酶活性的显著变化。Lac 活性较对照显著增加, 最高的漆酶活性出现在百草枯加入后 120 h, 为 7 U/mg 蛋白 (图 1), 除 Lac 活性增加外, MnP 与 LiP 的活性也显著增加(图 2、图 3)。最高的 MnP 活性在百草枯加入后 48 h(约 23 U/mg 蛋白), 为对照样品 MnP 活性的 7 倍左右。最高的 LiP 活性出现于百草枯加入后 48 h (约 51 U/mg 蛋白), 为对照样品 LiP 活性的 2.5 倍。

表 1 不同处理时间菌体蛋白的含量

Table 1 Protein of mycelia in different treatment time

t (h)	Protein of mycelia (mg/mL)					
	0	24	48	72	120	148
CK	17.86	17.52	17.34	17.56	17.71	17.75
PQ	17.78	16.32	16.69	18.84	18.52	18.27

Note: data was average of three replicate samples. PQ means paraquat, and CK means control.

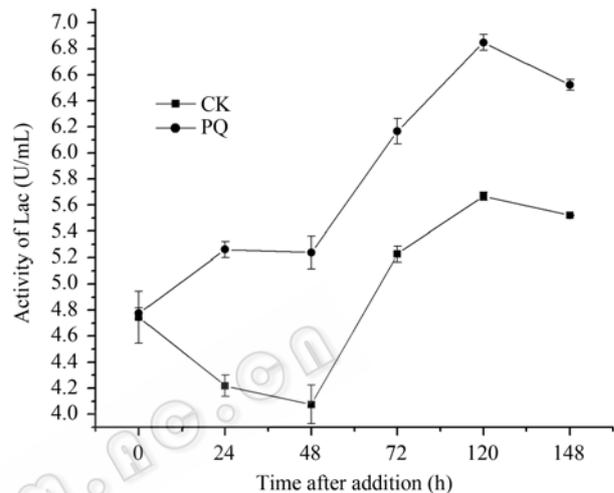


图 1 加入百草枯后漆酶活性的变化

Fig. 1 Lac activity after PQ addition. PQ means paraquat, CK means control.

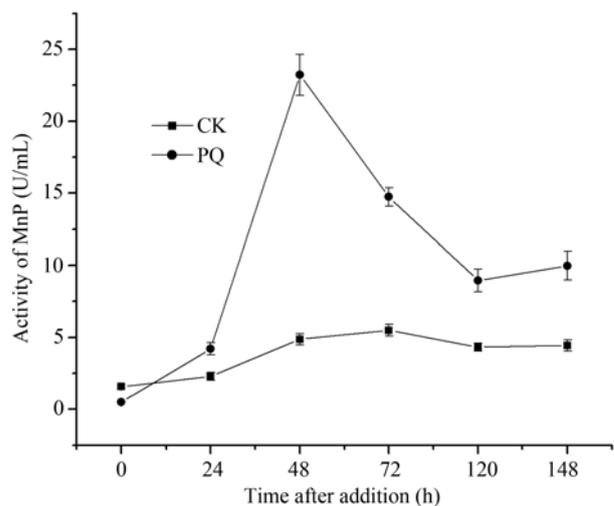


图 2 加入百草枯后锰依赖过氧化物酶活性的变化

Fig. 2 MnP activity after PQ addition. PQ means paraquat, CK means control.

2.3 百草枯对胞内抗氧化酶活性的影响

百草枯加入后前 24 h, SOD 的活性呈现增加趋势, 24 h 后开始下降, 72~120 h 内低于对照。最高的 SOD 活性出现在百草枯加入 24 h, 为对照的 1.5 倍。百草枯的加入只引起适度的 CAT 活性的增加, CAT 活性在加入后 48 h 内呈现增加的趋势, 最高的 CAT 活性出现在百草枯加入的 48 h, 48 h 后持续下降, 120 h 降至低于对照。百草枯对于抗氧化酶活性的促进程度小于对木质素降解酶活性的影响 (图 4、图 5)。

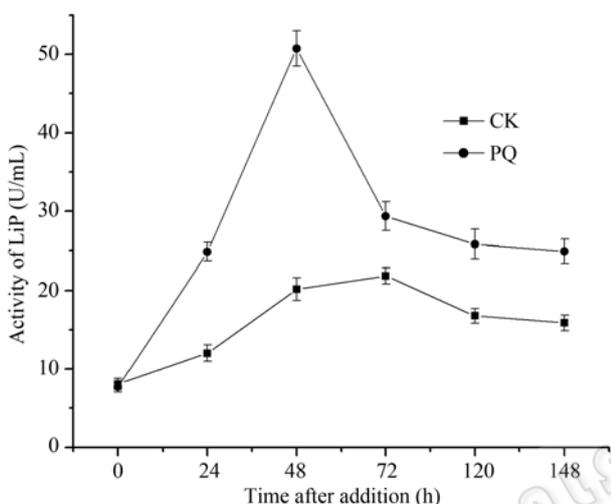


图 3 加入百草枯后木质素过氧化物酶的活性
Fig. 3 LiP activity after PQ addition. PQ means paraquat, CK means control.

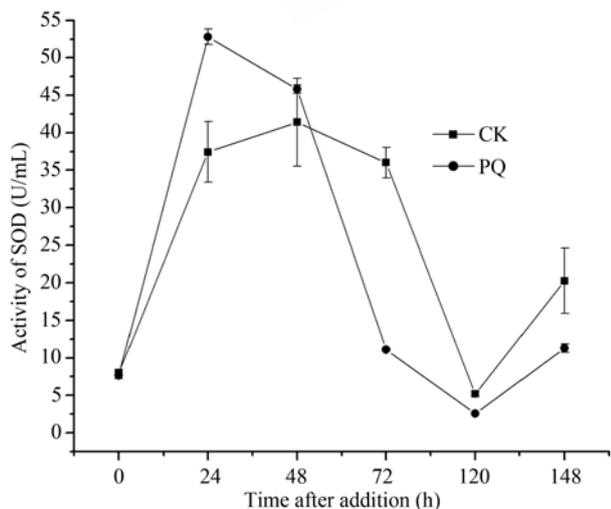


图 4 加入百草枯后超氧化物歧化酶的活性
Fig. 4 SOD activity after PQ addition. PQ means paraquat, CK means control.

2.4 百草枯对超氧阴离子、甲醛含量的影响

为了确定木质素降解酶是否可以引起百草枯的氧化, 试验对培养液中的超氧阴离子的水平进行了测定。与对照相比, 百草枯的加入引起了超氧阴离子水平的增加。超氧阴离子最明显的变化量出现于百草枯加入后的 24 h 与 120 h (图 6)。

甲醛是需氧与厌氧生物在受到氧化胁迫的最初阶段所产生的小分子标记物质, 甲醛的产生证明了氧化胁迫的产生。相对于对照, 百草枯加入后甲醛的浓度增加 (表 2)。

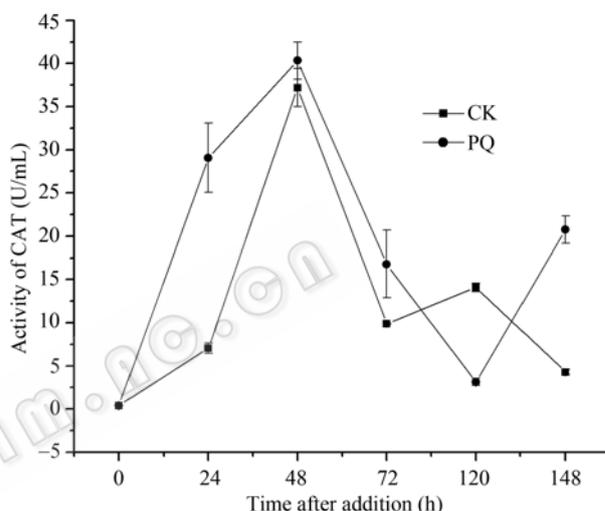


图 5 加入百草枯后过氧化氢酶的活性
Fig. 5 CAT activity after PQ addition. PQ means paraquat, CK means control.

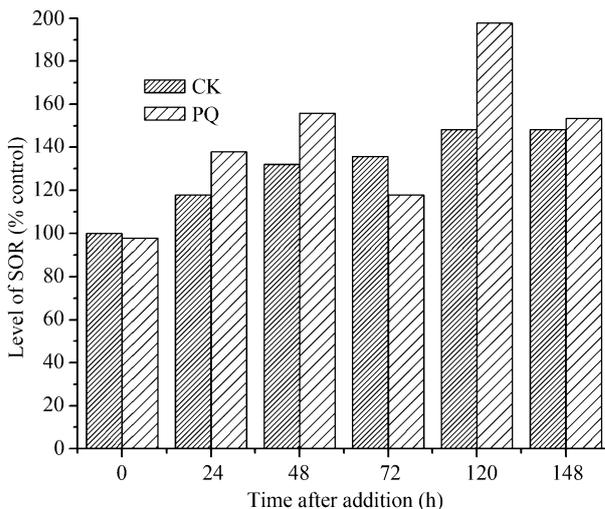


图 6 超氧阴离子水平(与对照相比)
Fig. 6 SOR level after PQ addition (Compared with CK). SOR means superoxide anion radical.

表 2 外源百草枯加入后胞外甲醛的浓度

Table 2 Concentration of extracellular formaldehyde after paraquat addition

<i>t</i> (h)	Extracellular malondialdehyde concentration ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)					
	0	24	48	72	120	148
CK	0.82 \pm 0.04	0.25 \pm 0.05	0.50 \pm 0.03	1.28 \pm 0.10	0.38 \pm 0.03	1.72 \pm 0.08
PQ	0.74 \pm 0.06	1.12 \pm 0.08	1.50 \pm 0.07	1.76 \pm 0.09	0.89 \pm 0.04	2.48 \pm 0.14

Note: data are means \pm SD from at least three independent experiments performed in duplicate. PQ means paraquat, and CK means control.

表 3 外源百草枯加入后胞外丙二醛的浓度

Table 3 Concentration of extracellular malondialdehyde after paraquat addition

<i>t</i> (h)	Extracellular malondialdehyde concentration ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)					
	0	24	48	72	120	148
CK	12.9 \pm 1.04	32.4 \pm 3.05	62.6 \pm 5.03	69.8 \pm 6.10	14.2 \pm 1.33	38.3 \pm 2.48
PQ	12.4 \pm 1.06	51.1 \pm 4.08	39.3 \pm 4.07	8.5 \pm 0.49	9.61 \pm 0.74	10.3 \pm 1.14

Note: data are means \pm SD from at least three independent experiments performed in duplicate. PQ means paraquat, and CK means control.

表 4 外源百草枯加入后酚化合物的浓度

Table 4 Concentration of extracellular phenols after paraquat addition

<i>t</i> (h)	Extracellular phenols concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	0	24	48	72	120	148
CK	0.82 \pm 0.04	0.25 \pm 0.05	0.5 \pm 0.03	1.28 \pm 0.10	0.38 \pm 0.03	1.72 \pm 0.08
PQ	0.74 \pm 0.06	1.12 \pm 0.08	1.5 \pm 0.07	1.76 \pm 0.09	0.89 \pm 0.04	2.48 \pm 0.14

Note: data are means \pm SD from at least three independent experiments performed in duplicate. PQ means paraquat, and CK means control.

2.5 百草枯对丙二醛与酚化合物含量的影响

丙二醛浓度的变化经常被用于指示细胞膜脂过氧化的程度。为了检测百草枯的加入是否引起了菌体的生物损伤,本实验对丙二醛浓度的变化进行了测定,结果发现,相对于对照,前 24 h 丙二醛的浓度显著的增加,24 h 后,丙二醛的浓度持续下降,24 h 后丙二醛的浓度远远小于对照(表 3)。

胞外酚化合物是次级代谢的产物,具有较高的抗氧化与抗衰老的特性。在实验中发现,百草枯的加入引起了胞外酚化合物的增加(表 4)。

3 讨论

3.1 百草枯浓度的确定

活性氧的存在具有双重的特性,一方面自身是氧化胁迫剂,另一方面作为启动子促进白腐菌降解。因此氧化剂的剂量非常重要,剂量不同,细胞的反应、信号的传递、细胞死亡诱导相应不同。为了有效地进行本实验,加入百草枯的浓度以能够使细胞正常生长,而且产生较高的漆酶活性为依据,在 10~60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度范围内,选定加入浓度为 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

3.2 百草枯对白腐菌的影响

3.2.1 百草枯对几种酶活性的影响

由菌体蛋白含量的变化趋势可以看出,百草枯的存在对漆酶起到双重的效果,酶蛋白含量的增加引起漆酶活性的增加;酶蛋白含量较低时,百草枯的存在诱导了漆酶的产生。而对于 MnP 与 LiP,百草枯的存在引起了这 2 种酶的产生,继而表现酶活性的增加。百草枯的存在对于 SOD 与 CAT 酶也存在激活作用。在实验过程中,可以看出 SOD、CAT 的活性在 148 h 出现了一定程度的增加,这可能与菌体在此时的生活状态有关,培养观察发现,此时百草枯处理的菌体液呈现一定浑浊现象,菌体生长呈现停滞,菌体蛋白含量下降,产生一定的毒害,因此抗氧化酶的活性应激增加。MnP 增加应该与比活力的表示有关。

3.2.2 百草枯的氧化胁迫作用

杂色云芝在加入百草枯后受到的氧化胁迫增加,主要表现在以下 3 个方面:一是百草枯的加入增加了超氧阴离子的水平,而超氧阴离子水平的提高证明了活性氧离子的产生。百草枯是一种联吡啶类广

谱性除草剂,它是超氧阴离子的特异产生剂^[17],它截获电子传递链中的电子被还原,还原态的百草枯在自动氧化过程中产生超氧阴离子,并可通过多条途径产生毒性更强的羟自由基。为了清除活性氧,抗氧化酶的活性相应增加。研究表明抗氧化酶(SOD、CAT)是细胞抵抗活性氧胁迫最直接也最有效的方式,其活性的变化能够最直接反映微生物细胞对氧化胁迫应答水平的高低^[18-20]。二是木质素降解酶活性的增加。有研究表明,漆酶的产生是微生物群体对氧化胁迫的应激反应。本实验中,3种木质素降解酶的活性都随百草枯的加入而显著增加,说明木质素氧化酶活性的增加是为适应外源氧化胁迫剂而形成的一种策略。三是作为氧化胁迫反应的标记产物—甲醛的浓度在试验过程中显著增加。

3.2.3 白腐菌的抗氧化系统

实验证明,白腐菌种的抗氧化酶系统能够使菌体受到的活性氧胁迫保持在一个较低的水平,使细胞不受到进一步的氧化伤害。抗氧化酶产生的机制是基于清除有毒活性氧而产生的,微生物不能够长久处于外源氧化胁迫中,为避免长时间暴露于氧化剂而导致的细胞伤害,菌体必须进行快速脱毒反应,这表现在抗氧化酶与抗氧化物的产生,而抗氧化酶的过量产生需要能量。因此当外源氧化剂被清除后,抗氧化酶活性下降以降低能量消耗。SOD是专性清除超氧阴离子而产生的,在本实验中,48 h后SOD的活性发生了很明显的下降,说明超氧阴离子对细胞的伤害水平下降。另外丙二醛浓度的下降也表明细胞所受到的膜脂过氧化程度降低。因此在本实验中,菌种抗氧化酶能够充分清除活性氧胁迫,使活性氧处于较低水平,从而免除细胞进一步的损伤。

3.3 百草枯在木质纤维类物质降解中的作用

由于木质素降解酶与木质素的降解有很大的相关性,因此木质素降解酶的增加,都会引起较多的木质素分解^[21]。因此,希望提高木质素降解酶的活性,增加木质素降解率。热激、化学试剂、过氧化氢等对木质素降解酶的活性具有调节作用^[22-23]。在由MnP与LiP参与的反应中,H₂O₂参与木质素单元的氧化反应并且在木质素的解聚过程中释放化合

物。超氧阴离子可以与Mn²⁺反应产生Mn³⁺,还能与由木质素氧化酶产生的分子进行反应,从而产生解环或脱木素反应。一方面,在生物解聚与生物降解中木腐菌需要活性氧来调节过氧化物酶的产生,另一方面,活性氧又会促进木质素降解酶活性的提高。因此,外源百草枯胁迫使菌体产生较高的木质素降解酶活性的现象可以作为一种有效手段运用于木质素的降解过程,可以通过对活性氧的有效控制来提高对木质素的降解效率。

4 结论

综上所述,外源百草枯可以有效地调节杂色云芝木质素降解酶与抗氧化酶的活性,使木质素降解酶的活性增加,抗氧化酶的活性在加入百草枯前后48 h增加;百草枯对木质素降解酶的影响大于对抗氧化物酶的影响。菌体酚类化合物、丙二醛的浓度也发生了相应的变化。菌株的抗氧化系统能够充分的阻止外源氧化胁迫,因此,在本实验条件下,百草枯是一种有效的氧化胁迫剂,可以用来调控木质素降解酶活性,从而为有效进行木质素降解服务。

REFERENCES

- [1] Schwarze FW, Engels J, Matthech C. *Pilz-Strategie von Holz-Verfall in den Bäumen*. Heidelberg, Berlin, Springer, 2000.
- [2] Hammel KE, Kapich AN, Jensen Jr KA, *et al*. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **30**: 445-453.
- [3] Güillen F, Munoz C, Gomez-Toribo V, *et al*. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 170-175.
- [4] Keyser P, Kirk TK, Zeikus JG. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J Bacteriol*, 1978, **135**: 790-797.
- [5] Kirk TK, Croan S, Tien M. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb Technol*, 1986, **8**: 27-32.
- [6] Collinson LP, Dawes IW. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J Gen Microbiol*, 1992, **138**: 329-335.
- [7] Arora DS, Sandhu DK. Laccase production and wood degradation by a white-rot fungus *Daedalea flavida*. *Enzyme Microb Technol*, 1985, **7**: 405-408.

- [8] Tien M, Kirk TK. Lignin degrading enzymes from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 2280–2284.
- [9] Wariishi H, Valli K, Gold MH. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 23688–23695.
- [10] Marklund S, Marklund C. Involvement of superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 1974, **47**: 469–474.
- [11] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*, 1984, **105**: 121–124.
- [12] Rapoport R, Hanukoglu I, Sklan D. A fluorimetric assay for hydrogen peroxide, suitable for NAD (P)H-dependent superoxide generating redox systems. *Anal Biochem*, 1994, **218**: 309–313.
- [13] Malarczyk E. Transformation of phenolic acid by *Nocardia*. *Acta Microbiol Pol*, 1998, **38**(1): 45–53.
- [14] Paździoch-Czochra E, Malarczyk J, Siewiewsiuk J. Relationship of demethylation processes to veratric acid concentration and cell density in cultures of *Rhodococcus erythropolis*. *Cell Biol Int*, 2003, **27**: 325–336.
- [15] Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, *et al*. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*, 1993, **15**: 353–363.
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248–254.
- [17] Goldstein S, Samuni A, Arnovitch Y, *et al*. Kinetics of paraquat and copper reactions with nitroxides: the effects of nitroxides on the aerobic and anoxic toxicity of paraquat. *Chem Res Toxicol*, 2002, **15**: 686–691.
- [18] Farr S, Kogoma T. Oxidative stress response in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev*, 1976, 1991, **55**: 561–585.
- [19] Barbara CA, Dowds. The oxidative stress response in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **124**: 255–264.
- [20] Zhang XQ, Xue YF, Zhao AM. Purification and characterization of a monofunctional catalase from an *Alkaliphilic bacillus* sp. F26. *Chin J Biotech*, 2005, **21**(1): 71–77.
张心齐, 薛燕芬, 赵爱民. 嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. F26 过氧化氢酶的分离纯化及性质研究. *生物工程学报*, 2005, **21**(1): 71–77.
- [21] Arora DS, Chander, MGill PK. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolytic of wheat straw. *Int Biodeter Biodegr*, 2002, **50**: 115–120.
- [22] Gianfrieda F, Xu F, Bollag M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J*, 1999, **3**: 1–25.
- [23] Fink-Boots M, Malarczyk E, Leonowicz A. Increased enzymatic activities and levels of superoxide anion and phenolic compounds in cultures of basidiomycetes. *Acta Biotechnol*, 1999, **19**: 319–330.