

毛云芝菌利用糖蜜酒精废水产漆酶培养基优化

孙巍^{1,2,3,4} 许玫英^{1,2,3} 孙国萍^{1,2,3*}

- (1. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)
- (2. 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东 广州 510070)
- (3. 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)
- (4. 华南理工大学生物工程与科学学院 广东 广州 510006)

摘要: 为提高毛云芝菌的漆酶产量,降低生产成本,同时使糖蜜废水中的营养成分得到充分利用,变废为宝,以糖蜜废水作为碳源,对毛云芝菌发酵产漆酶进行研究。在单因素试验基础上,以不同浓度糖蜜废水、尿素含量为自变量,漆酶活力为因变量,采用 Box-Behnken 设计方法得到最佳的培养基配方为糖蜜废水浓度 47%,尿素添加量 0.5%,漆酶活力可达 1 810.0 U/mL,约为优化前的 6 倍。说明毛云芝菌利用糖蜜废水作为碳源生产漆酶是可行的,为糖蜜废水资源化利用高效生产有价值产品奠定了理论基础。

关键词: 毛云芝菌,漆酶,糖蜜废水,响应面法

Culture medium optimization for laccase production by *Coriolus hirsutus* using molasses distillery wastewater

SUN Wei^{1,2,3,4} XU Mei-Ying^{1,2,3} SUN Guo-Ping^{1,2,3*}

- (1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)
- (2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou, Guangdong 510070, China)
- (3. Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)
- (4. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: In order to enhance the production of laccase and reduce the cost of laccase production, the culture medium for the growth of *Coriolus hirsutus*, a laccase production strain, was studied using molasses distillery wastewater (MDW) as carbon source. The different concentrations of molasses distillery wastewater and proportion of urea were optimized consequently through Box-Behnken experiment design under the foundation of signal factor experiment. As the optimization result, the production of

基金项目: 粤港关键领域重点突破招标项目(No. 2009A030902003); 广东省自然科学基金研究团队项目(No. 9351007002000001); 广东省中国科学院全面战略合作项目(No. 2010B090301048); 佛山市院市合作项目(No. 2010YS023); 广州市开发区配套项目(No. 2010S-P067)

* 通讯作者: Tel/Fax: 86-20-37656331; ✉ guopingsun@163.com

收稿日期: 2010-12-31; 接受日期: 2011-02-17

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

laccase with the concentration of MDW 47% and proportion of urea 0.5% was six times higher than that from the original medium used previously. This indicates that the laccase production using MDW as carbon source is feasible. At the same time, the study makes the theoretical foundation for the exploitation and utilization of MDW to produce high value product.

Keywords: *Coriolus hirsutus*, Laccase, Molasses distillery wastewater, Response surface method

毛云芝菌能够分泌多种对有机污染物有降解作用的氧化酶, 漆酶就属于其中一种。漆酶能够氧化非酚类芳香化合物, 这使得漆酶广泛用于多种加工行业, 如纺织染料脱色、纸浆漂白、废水处理、生物传感器及生物修复等^[1]。目前, 液体和固体发酵产漆酶的研究均有, 固体发酵多采用农作物废弃物, 因此其生产成本比液体发酵低, 能够变废为宝, 但固体发酵周期长, 分泌的产物复杂, 分离纯化困难。为使漆酶更有效地应用于生物技术和环境领域, 需要大量的粗漆酶和纯化的漆酶, 深层液体发酵仍是大规模生产最有力的方法。

糖蜜酒精废水是高浓度有机物废水, COD 达 $1.0 \times 10^5 - 1.5 \times 10^5$ mg/L, BOD 达 $6 \times 10^4 - 9 \times 10^4$ mg/L^[2]; pH 3.5-4.5; 糖蜜酒精废水中含有 10%-12%的固形物, 其中 70%为有机质, 包括糖分、蛋白质、氨基酸、维生素等, 剩余 30%为灰分, 含有氮、磷、钾等无机盐, 重金属痕量, 无毒、无害, 这些都是动、植物营养元素, 是宝贵的资源^[3-5]。目前, 国外已有利用糖蜜废水产木聚糖酶^[6]、滤纸酶、 β -葡萄糖苷酶、内切- β -1,4-葡萄糖苷酶^[7]的报道, 因此糖蜜酒精废水的资源化, 生产高附加值产品得到了国内外研究者的高度重视。

由于培养基的成分对木质纤维素的产生有重要的调节作用, 因此培养基优化已经成为了实现漆酶生产的主要途径, 在任何发酵过程中, 作为最关键性营养成分的碳源和氮源, 对于提高或者刺激木质素酶类生产也是最有用的工具^[8]。而且, 培养基优化是降低生产成本重要和合适的选择。本文旨在利用糖蜜废水为碳源生产漆酶, 优化培养基配方, 提高漆酶产量, 降低生产成本, 同时使糖蜜废水中的营养成分得到利用, 降低废水的污染, 为废水的资源化利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

毛云芝菌(*Coriolus hirsutus*), 澳大利亚联邦科学工业研究组织食品科学研究所赠送, 本试验室保藏。

1.2 培养基

斜面种子培养基(W/V): 土豆 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 2%。

液体种子培养基(W/V): 土豆 20%, 葡萄糖 2%, 酵母膏 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, KH_2PO_4 0.3%。

1.3 菌种制备培养

1.3.1 菌种活化: 将保存的菌种接种于斜面培养基上, 28 °C 恒温培养 7-8 d, 置 4 °C 冰箱中保存备用。

1.3.2 液体种子培养: 用灭菌竹签将每支 PDA 斜面上的菌丝刮到含有玻璃珠的无菌水中, 将其打散, 适当稀释, 然后用无菌移液管吸取 7 mL 悬浮液, 接入装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 150 r/min、28 °C 振荡培养 4 d。

1.3.3 液体发酵培养: 以装量 30 mL 的 150 mL 三角瓶, 接种量为 10%, 28 °C 下振荡培养 6 d 进行单因素试验, 分别试验了不同浓度糖蜜废水(20%、40%、60%、80%、100%)、不同碳源(葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、果糖、淀粉)、不同氮源(无机氮源、有机氮源)对毛云芝菌生物量及所产的漆酶活性影响; 在单因素实验基础上, 按照 Box-Benken 实验设计确定最佳培养基配方, 每个处理设 3 个重复。

1.4 测定方法

1.4.1 粗酶液制备及生物量测定: 对各种样品整瓶取样, 发酵液经真空抽滤后, 所得液体即为粗酶液, 滤得菌丝体放入 60 °C 烘箱烘干至恒重, 并称取重量。

1.4.2 漆酶活力测定方法: 3 mL 反应总体积中, 含

0.1 mL 适当稀释的粗酶液, 2.7 mL 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 加入 0.2 mL 0.5 mmol/L ABTS 以启动反应, 室温条件下, 采用 UV-1700 紫外可见分光光度计测定 OD_{420} 下反应前 3 分钟内的吸光值变化^[9]。酶的活力单位(U)定义为: 每分钟催化 1 μmol 底物(ABTS)为 1 个酶活单位。

1.5 试验设计

响应面分析法(RSA)是一种用于优化试验条件的数学统计方法。Box-Benken 是一种常用的 RSA 法, 该方法对实验数据进行二次回归拟合, 能够得到带交互项和平方项的二次方程, 分析各因素的主效应和交互效应, 并可以求出各因素的最佳值。本研究在单因素的基础上, 以糖蜜废水浓度 X_1 、尿素 X_2 为试验因素, 进行响应面试验设计。各因素及水平的试验设计见表 1。

表 1 试验因素与水平		编码水平				
变量 Variable	符号 Signal	Coding level				
		-1.414	-1	0	+1	+1.414
糖蜜废水浓度 Concentration of MDW (%)	X_1	29	35	50	65	71
尿素浓度 Proportion of urea (%)	X_2	0.2	0.3	0.6	0.9	1.0

2 结果与分析

2.1 不同浓度糖蜜废水对毛云芝菌生物量及其产酶的影响

用纯净水将糖蜜废水稀释至不同浓度(20%、40%、60%、80%、100%), 比较不同浓度糖蜜废水对毛云芝菌生长及产漆酶的影响, 结果见图 1。

结果表明毛云芝菌在糖蜜废水浓度为 20%、40%、60%、80%条件下均能生长, 100%浓度下不生长, 其中糖蜜废水浓度为 40%时, 毛云芝菌生物量达到最大, 漆酶活力最高。糖蜜废水浓度 20%、40%、60%时, 均能测得漆酶的活力, 80%浓度没有测得漆酶。说明毛云芝菌能够利用糖蜜废水中复杂的有机碳源及其它养分生长, 并可分泌漆酶, 但若浓度太高(如超过 80%)抑制了毛云芝菌的生长和次级代谢产物漆酶的分泌, 因此确定用 40%糖蜜废水作进一步优化工艺提高生物量和漆酶活力的相关试验。

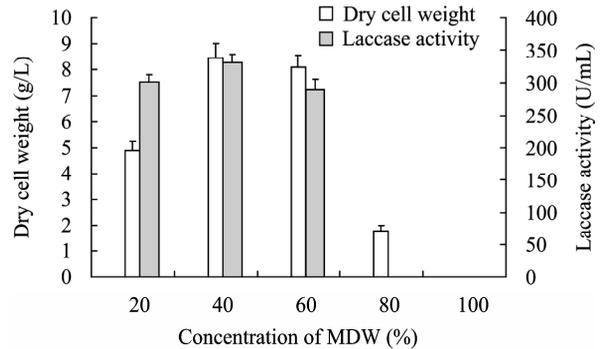


图 1 不同浓度糖蜜废水对毛云芝菌生物量及其产酶的影响

Fig. 1 The effect of molasses wastewater of different concentration on biomass and laccase production by *Coriolus hirsutus*

2.2 不同外加碳源对毛云芝菌生物量及其产酶的影响

以糖蜜废水浓度为 40%, 考察添加 1%葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、果糖、淀粉外加碳源对毛云芝菌生物量及其产酶的影响, 空白对照不添加任何附加外加碳源。结果见图 2。

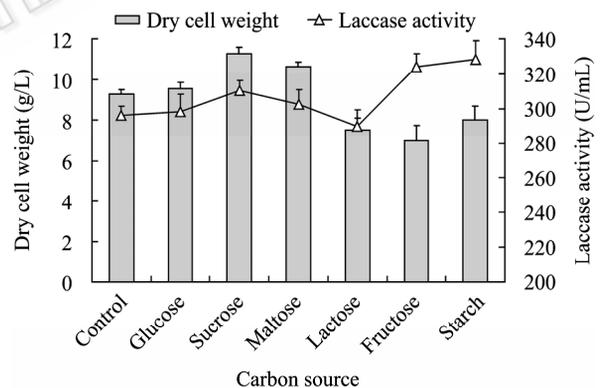


图 2 不同碳源对毛云芝菌生物量及其产酶的影响

Fig. 2 The effect of different carbon source on biomass and laccase production by *Coriolus hirsutus*

图 2 结果表明外加碳源对毛云芝菌生物量及其漆酶的分泌有一定影响, 添加葡萄糖、蔗糖和麦芽糖均对毛云芝菌的生长和漆酶酶活提高有一定的促进作用, 乳糖、果糖和淀粉对毛云芝的生长有一定抑制作用, 但果糖和淀粉对漆酶酶活有一定的促进作用。因为所添加的外加碳源都没有使漆酶活力显著提高, 糖蜜酒精废水中碳源可以满足毛云芝菌的生长和漆酶的分泌, 综合考虑废水中含高浓度 COD,

为节约生产成本, 可以不添加外加碳源。

2.3 不同外加氮源对毛云芝菌生物量及其产酶的影响

以糖蜜废水浓度为 40%, 考察添加量为 0.5% 的无机氮源[NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]和有机氮源(草酸铵、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、尿素)对毛云芝菌生物量及其产酶的影响, 空白对照不添加任何附加外加氮源。结果见图 3。

图 3 结果表明不同的无机氮源和有机氮源中, 草酸铵和尿素对毛云芝菌利用糖蜜废水产漆酶有明显的促进作用, 但草酸铵不利于菌丝体的生长, 其余几种有机氮源(蛋白胨、牛肉膏、酵母膏)都有利

于菌丝体生长, 却对于漆酶的分泌没有明显的促进作用; 无机氮源与对照相比, 对菌丝体的生长都有一定的抑制作用, 其中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 也不利于漆酶的产生。分析原因可能是由于无机氮源较容易利用, 在生长前期氮源含量过高可能不利于菌种生长, 抑制了漆酶的分泌, 而有机氮源成份复杂, 除了补充菌种后期生长的氮源外, 还含有无机盐和生长因子等营养元素刺激了漆酶的分泌。这组试验结果也可以看出菌体的生长量和分泌的酶活性没有表现出严格的相关性, 综合菌体的生长和代谢产物酶的分泌情况, 结合生产成本, 选用尿素为外加氮源添加到糖蜜废水中, 促进毛云芝菌产漆酶。

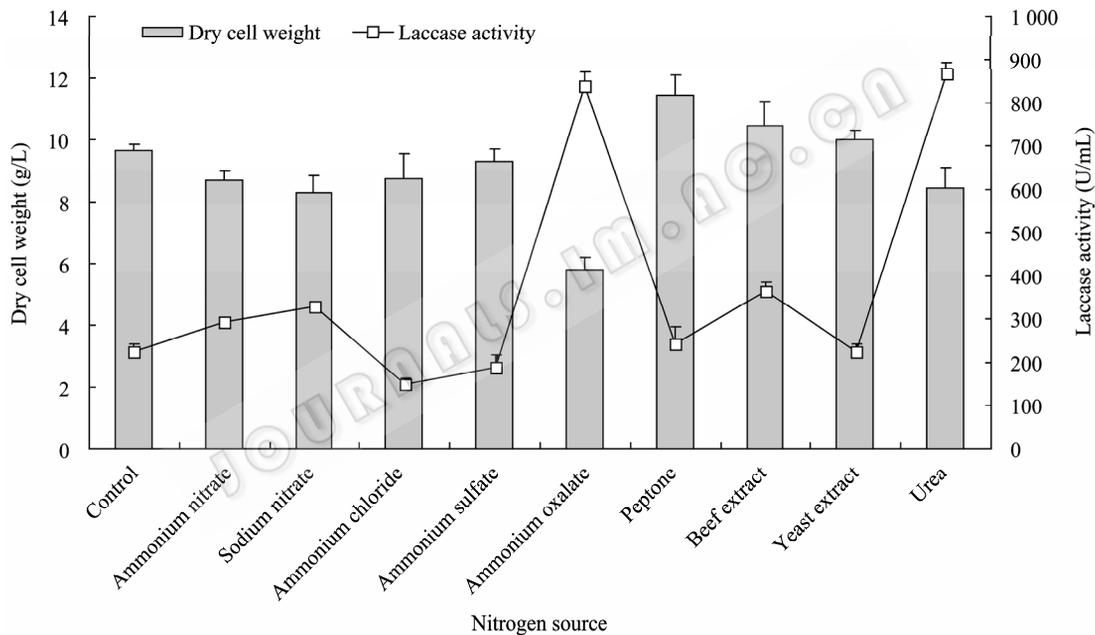


图 3 不同氮源对毛云芝菌生物量及其产酶的影响

Fig. 3 The effect of different nitrogen on biomass and laccase production by *Coriolus hirsutus*

2.4 Box-Behnken 实验和响应面分析培养基最优水平

根据上述单因素试验结果, 以糖蜜酒精废水浓度、尿素含量为试验因素, 按照 Box-Behnken 试验设计确定毛云芝菌利用糖蜜废水产漆酶的培养基试验方案, 具体试验方案和漆酶活力 Y 的测定结果如表 2 所示。

2.5 回归方程的拟合度检验

根据 Box-Behnken 的设计原理, 以糖蜜酒精废

水浓度、尿素含量这 2 个因素为自变量, 以漆酶活力为响应值设计 2 因素 3 水平共 13 个实验点的响应面分析试验, 实验所确定的重要因素的水平及实验设计和结果分别见表 3 和表 4。

对回归系数的显著性检验结果表明: b_1 、 b_2 、 b_{11} 、 b_{22} 高度显著, 而 b_{12} 不显著, 根据方差分析和 t 检验的结果将差异不显著的因子剔除后得到回归方程为:

$$Y = 1796.44 - 43.13717X_1 - 91.3607X_2 - 111.7326X_1^2 - 118.4076X_2^2$$

表2 响应面试验设计及结果
Table 2 Design and results of response surface experiment

试验序号 Experiment number	X_1	X_2	Y (U/mL)
1	-1	-1	1 713.0
2	-1	1	1 499.8
3	1	-1	1 590.8
4	1	1	1 493.7
5	-1.414	0	1 641.6
6	1.414	0	1 488.3
7	0	-1.414	1 700.3
8	0	1.414	1 402.9
9	0	0	1 775.8
10	0	0	1 796.2
11	0	0	1 771.0
12	0	0	1 826.7
13	0	0	1 812.5

从表3方差分析中可以看出模型 $\alpha=0.01$ 水平上回归显著;模型的一次项、二次项、对响应值有显著性影响。表4的模型可信度分析中,复相关系数的平方 $R^2=97.92\%$,说明模型可以解释97.92%实验所得漆酶酶活的变化,表明方程的拟合较好。 CV (Y 的变异系数)表示实验的精确度, CV 值越高,实验的可靠性越低,本设计实验中 $CV=1.66\%$,较低,说明实验操作可信。综上说明回归方程给毛云芝菌液体发酵产漆酶提供了一个合适的模型。

2.6 响应面分析

将糖蜜酒精废水、尿素含量2个参数固定,通过回归方程来绘制漆酶活力随其余2个参数变化趋势分析图,考察所拟合的相应曲面的形状,响应面立体分析图和相应等高线图见图4。

表3 响应面试验方差分析表
Table 3 Variance analysis on the result of response surface experiment

变异来源 Source	自由度 df	总偏差平方和 Sum of squares	平均偏差平方和 Mean square	F 值 F value	$Pr>F$
X_1	1	14 886.5	14 886.5	19.805 6	0.002 97
X_2	1	66 774.15	66 774.15	88.838 98	0.000 1
$X_1 \times X_1$	1	86 846.2	86 846.2	115.543 6	0.000 1
$X_1 \times X_2$	1	3 369.803	3 369.803	4.483 319	0.071 999
$X_2 \times X_2$	1	97 532.63	97 532.63	129.761 3	0.000 1
模型 Total model	5	248 176.7	49 635.34	66.036 82	0.000 1
一次项 Linear	2	81 661	40 830.5	54.32	<0.000 1
二次项 Quadratic	2	163 146	81 573	108.52	<0.000 1
交差乘积项 Intercept	1	3 369.802 5	3 369.802 5	4.48	0.072
误差项 Total error	7	5 261.418	751.631 2		
所有项 Total	12	253 438.1			

表4 模型的可信度分析
Table 4 Fit statistics for Y

Items	Results
平均值 Mean	1 654.815
R^2 R-square	97.92%
校正后的 R^2 Adj. R-square	96.44%
模型误差的平方根 Root mean square error	27.415 89
CV	1.656 734

从图4可知,糖蜜酒精废水浓度和尿素含量对漆酶活力影响显著,随着糖蜜废水浓度和尿素量的增加,漆酶活力呈现增加的趋势,当糖蜜废水浓度接近50%左右,尿素添加量接近0.5%后,漆酶活力不再增加,糖蜜废水浓度或尿素量继续增加,漆酶活力将不会显著提高。

2.7 最佳废水培养基配方的确定

结合图4及软件分析,回归方程存在稳定点,

稳定点是极大值点, 通过岭脊分析(Ridge analysis)得到极大值点所对应的各主要因素(X_1 , X_2)的编码值分别为(-0.213 016, -0.366 91), 即糖蜜酒精废水浓度约为 47%, 尿素添加量为 0.5%, 漆酶活力可达到 1 820.4 U/mL。

2.8 验证试验

为验证上述优化结果, 在确定的培养条件下, 糖蜜废水浓度约为 47%, 尿素添加量为 0.5%, 重复试验 3 次, 漆酶活力的实测平均值为 1 810.0 U/mL, 与模型的预测值较为接近, 进一步说明回归模型的拟合度较好。

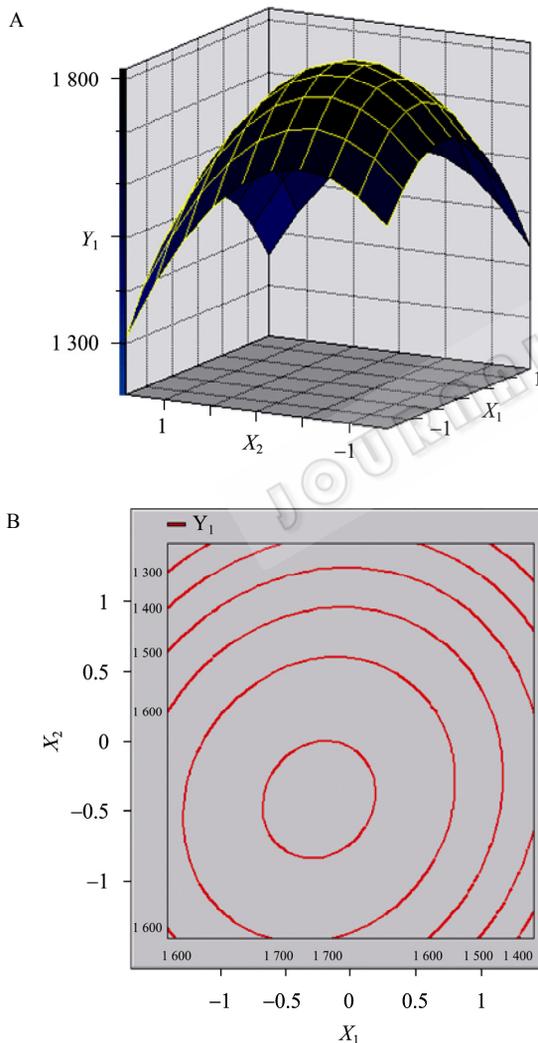


图 4 X_1 、 X_2 对酶活影响的响应面(A)和等高线(B)图
Fig. 4 Response surface plots (A) and contour plots (B) of X_1 and X_2 on laccase activity

3 小结与讨论

本实验所采用的糖蜜酒精发酵废水未经过复杂的预处理过程, 通过单因素实验可知, 糖蜜废水稀释度为 40%时, 毛云芝菌生物量和漆酶活力较高, 说明毛云芝菌能够较好地耐糖蜜废水的高碳环境, 能够利用其中的碳源生长并且分泌次级代谢产物。外加不同碳源并没有使漆酶活力显著提高, 说明糖蜜酒精废水中碳源可以满足毛云芝菌的生长和漆酶的分泌, 碳源含量过高反而对菌体生长有抑制作用。漆酶的分泌对于氮源的种类和浓度敏感^[10], 合适的氮源能够促进菌体代谢, 总体来说, 所选的氮源中, 有机氮源比无机氮源更有利于诱导毛云芝菌产漆酶, 其中尿素和草酸铵使漆酶的活力显著提高, 表明在糖蜜废水中氮源可能不足或不适合漆酶分泌, 补加合适的氮源是有必要的; 但菌体的生长和漆酶的分泌并未表现出明显的相关性, 综合考虑并结合生产成本, 选择尿素为进一步优化指标。

对于胞外漆酶或者过氧化物酶的分泌, 不仅碳氮源的种类和浓度是关键的影响因素, 而且 C/N (碳氮比) 及其交互作用对其影响也非常重要, 如 *Streptomyces albus*^[11]、*Botryosphaeria rhodina*^[10]、*Streptomyces* sp.^[12] 及 *Pleurotus* sp.^[13] 等。因此为进一步提高酶活, 确定碳氮源最优比例及其交互作用对漆酶活力的影响, 根据单因素实验结果, 选取糖蜜酒精废水浓度、尿素含量为自变量, 利用 Box-Benken 设计方法, 通过方差分析, 表明糖蜜废水浓度和尿素对漆酶分泌影响显著, 确定出预测模型的回归方程。借助 SAS V8.0 软件, 利用复相关系数确定模型的拟合度较好, 运用岭脊分析得到毛云芝菌利用糖蜜废水产漆酶的最优培养基为: 糖蜜酒精废水浓度约为 47%, 尿素添加量为 0.5%。验证试验, 结果显示回归模型的预测值与实验值非常接近, 并且与初始培养基(糖蜜废水稀释液)相比, 酶活提高了近 6 倍。说明回归方程能较真实地反映各筛选因素的影响, 建立的模型与实际情况拟合度较好, 利用响应面法优化毛云芝菌利用糖蜜废水发酵培养基是有效可行的。

微生物和酶类可用于消除环境污染而没有副作用,因而受到极大的关注,其中漆酶就是具有生物技术和环境应用潜力的氧化还原酶类中的一种。糖蜜酒精废水浓度高、处理成本高、难度大,但含有丰富碳源及微量元素,利用其生产微生物酶类具有广阔的应用前景。国外研究较多,如 Chapla 等^[6]研究 *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 利用 USAB 处理的糖蜜废水和麦麸用在固体发酵条件下产木聚糖酶,优化后活力达 8 450 U/g,并且粗酶适合于多种木质纤维素的糖化,在生物法制酒精方面具有潜力。Acharya B. K.等^[7]研究 *Aspergillus ellipticus* 利用麦秆固体发酵,添加厌氧处理后的糖蜜废水,优化条件后,滤纸酶活、 β -葡萄糖苷酶、内切- β -1,4-葡萄糖苷酶活性分别达 13.38、26.68、130.92 U/g。利用糖蜜废水产漆酶的报道较少,如 Singh A 等^[14]研究表明无论是否添加木质纤维素材料(稻草、麦秆、甘蔗渣),厌氧处理后的糖蜜废水与无机物培养基相比都更适合诱导 *Aspergillus heteromorphus* 漆酶的分泌,木质纤维素材料可提高漆酶产量,当 5%厌氧处理的糖蜜废水培养基中添加稻草时,漆酶活力最高,可达 6.6 IU/mL。

综上所述,利用糖蜜废水产酶的研究多添加农作物废弃物,大部分是固体发酵,所利用的糖蜜废水量小,与液体发酵相比,周期长,并且所利用的糖蜜酒精废水都是经过厌氧处理的,而本实验室所利用的糖蜜废水只是经过简单的稀释,未经过复杂的处理过程,所产漆酶活力较国外报道的高。这为进一步优化其工艺参数,促进漆酶的工业化生产,节约生产成本及其糖蜜酒精废水的资源化开拓了研究前景。

参 考 文 献

- [1] Couto SR, Toca-Herrera JL. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(6): 558-569.
- [2] 吴松平, 古国榜. 糖蜜废水的物化处理与资源化利用的进展[J]. *重庆环境科学*, 2001, 23(3): 56-60.
- [3] 蔡春林, 覃文庆, 邱冠周, 等. 甘蔗糖蜜酒精废水治理及展望[J]. *农业环境科学学报* 2006, 25(增刊): 831-834.
- [4] 朱国洪, 刘振华, 尹国, 等. 甘蔗糖蜜酒精工业废液治理[J]. *四川环境*, 2000, 19(2): 45-47.
- [5] Zeng YF, Liu ZL, Qin ZZ. Decolorization of molasses fermentation wastewater by SnO₂-catalyzed ozonation[J]. *Journal of Hazardous Materials* 2009, 162(2/3): 682-687.
- [6] Chapla D, Divecha J, Madamwar D, et al. Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 49(3): 361-369.
- [7] Acharya BK, Mohana S, Jog R, et al. Utilization of anaerobically treated distillery spentwash for production of cellulases under solid-state fermentation[J]. *Journal of Environmental Management*, 2010, 91(10): 2019-2027.
- [8] Jing DB. Improving the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces lavendulae* by medium optimization[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(19): 7592-7597.
- [9] 刘淑珍, 钱世钧. 担子菌漆酶的分离纯化及其性质研究[J]. *微生物学报*, 2003, 43(1): 73-78.
- [10] Dekker RFH, Barbosa AM, Giese EC, et al. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05[J]. *Int Microbiol*, 2007, 10(3): 177-185.
- [11] Antonopoulos VT, Rob A, Ball AS, et al. Dechlorination of chlorophenols using extracellular peroxidases produced by *Streptomyces albus* ATCC 3005[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 29(1): 62-69.
- [12] Tuncer M, Kuru A, Sahin N, et al. Production and partial characterization of extracellular peroxidase produced by *Streptomyces* sp. F6616 isolated in Turkey[J]. *Ann Microbiol*, 2009, 59 (2): 323-334.
- [13] Kurt S, Buyukalaca S. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(9), 3164-3169.
- [14] Singh A, Bajar S, Bishnoi NR, et al. Laccase production by *Aspergillus heteromorphus* using distillery spent wash and lignocellulosic biomass[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 176(1/3): 1079-1082.