

白腐真菌批式发酵动力学模型研究

熊小平, 文湘华*, 徐康宁, 边炳慧

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点实验室, 北京 100084)

摘要: 为了进一步认识白腐真菌发酵产酶机理并指导相关发酵工艺设计, 在一系列试验研究的基础上, 建立了描述黄孢原毛平革菌批式发酵过程的动力学模型, 并采用自由悬浮和固定化 2 种培养条件下的试验数据分别回归了模型各参数. 模拟计算结果表明, 生物量、葡萄糖、氨氮、木质素酶浓度的的计算值与实测值的偏差在 15% 以内. 对比 2 种培养条件下的模型参数发现, 二者得到的最大生物量浓度均为 1.78 g/L; 固定化培养菌体的比增长速率值($0.668\ 3\ d^{-1}$)大于自由悬浮培养值($0.514\ 4\ d^{-1}$); 自由悬浮培养中绝大部分葡萄糖消耗于非生长菌体代谢, 固定化培养中则部分葡萄糖用于菌体生长, 且氨氮消耗更快; 菌体的产酶过程与生长无关; 自由悬浮培养条件下, 菌丝小球可合成 MnP(231 U/L), 其 MnP 合成能力为 $115.8\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$, 且高峰后依然可以保持 $26.1\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$, 适合采用补料-分批发酵的模式提高 MnP 的产量及其发酵效率; 固定化培养条件下, 菌体可同时合成 MnP(410 U/L)和 LiP(721 U/L), 但其 LiP 和 MnP 合成能力在酶活高峰之后明显下降, 分别由 $248.9\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$ 和 $80.1\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$ 下降到 $0\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$ 和 $6.04\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$, 故而在考虑补料-分批发酵模式时, 补料时机应选择培养中期的 LiP 与 MnP 峰值之前.

关键词: 黄孢原毛平革菌; 木质素降解酶; 动力学模型; 批式发酵

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)02-0494-06

Kinetics Model for Batch Culture of White Rot Fungus

XIONG Xiao-ping, WEN Xiang-hua, XU Kang-ning, BIAN Bing-hui

(State Key Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: In order to understand ligninolytic enzymes production process during culture of white rot fungus, accordingly to direct the design of fermentation process, a kinetics model was built for the batch culture of *Phanerochaete chrysosporium*. The parameters in the model were calibrated based on the experimental data from free and immobilized culture separately. The difference between each variable's values calculated based on kinetics model and experimental data is within 15%. Comparing parameters for the free and the immobilized culture, it is found that maximum biomass concentrations are both 1.78 g/L; growth rate ratio of immobilized culture ($0.668\ 3\ d^{-1}$) is larger than that of free culture ($0.514\ 4\ d^{-1}$); very little glucose is consumed for biomass growth in free culture while in immobilized culture much glucose is used and ammonium nitrogen is consumed at a greater rate. ligninolytic enzymes production process is non-growth related; fungal pellets can produce MnP (231 U/L) in free culture with a production rate of $115.8\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$ before peak and $26.1\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$ after peak, thus fed-batch is a possible mode to improve MnP production and fermentation efficiency. MnP (410 U/L) and LiP (721 U/L) can be produced in immobilized culture, but MnP and LiP production rate decrease from $80.1\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$ and $248.9\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$ to $6.04\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$ and $0\ U \cdot (g \cdot d)^{-1}$, respectively, indicating a proper feed moment is before the enzymes peak during fed-batch culture.

Key words: *Phanerochaete chrysosporium*; ligninolytic enzymes; kinetics model; batch culture

白腐真菌在培养过程中, 由营养限制可以启动其木质素降解酶系的合成, 该酶系主要包括木质素过氧化物酶(LiP)和锰过氧化物酶(MnP)^[1,2]. 众多研究表明木质素酶可以催化降解环境中各种难降解有机物, 因而在环境污染治理领域表现出强大的应用潜力^[3,4]. 木质素酶实际应用的瓶颈问题之一是其发酵产量较低^[5]. 从上世纪 80 年代至今鲜见大规模发酵报道, 且其产酶机理也没有完整的结论.

建立发酵动力学模型对培养过程中生物量、基质浓度以及代谢产物浓度随时间变化进行跟踪模拟, 一方面有助于进一步优化发酵条件提高产酶量, 另一方面有助于更深入地认识发酵产酶过程机理,

对推进发酵工艺的相关研究具有重要意义. 目前关于白腐真菌发酵产酶动力学模型的研究报道很少. Zheng 等^[6]根据 Monod-Jacob 操纵子学说建立了一个简单结构模型, 用于描述黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)自由悬浮培养过程中, 间歇通纯氧后木质素降解酶合成情况, 其中只模拟了木质素酶上升阶段的变化; Tavares 等^[7]根据不同条件下 *Trametes versicolor* 菌合成漆酶(Laccase)的情

收稿日期: 2007-03-19; 修订日期: 2007-05-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(20677033)

作者简介: 熊小平(1980~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: xxp02@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: xhwen@tsinghua.edu.cn

况,建立了相关漆酶合成模型.这些模型或针对其他菌种以及其产酶过程,或只研究了单一培养条件,而且均忽略了培养过程中木质素降解酶活性下降的问题,为此有必要对发酵动力学模型做进一步研究.本研究在分析 *Phanerochaete chrysosporium* 产酶特点的基础上,构建发酵动力学模型.并结合 *Phanerochaete chrysosporium* 好氧的特点,在摇瓶内采用低液量条件分别进行了固定化和自由悬浮培养,其过程数据用于模型的校正与检验.进一步分析了培养条件对模型参数的影响,旨在为提高发酵水平,实现酶在反应器中的规模发酵奠定基础.

1 材料与方法

1.1 菌株

试验中采用的白腐真菌菌株为本实验室保存的 *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767.

1.2 培养基

固体培养基(PDA 培养基):马铃薯浸出液 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L.

液体培养基:参照文献[8]的基础培养基进行配置,其中采用醋酸-醋酸钠缓冲液.

1.3 载体

固定化载体为聚氨酯泡沫块(0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm).载体在沸水中煮 20 min 后用去离子水清洗 3 遍,干燥后灭菌备用.

1.4 培养条件

将保存的菌种接种到 PDA 固体培养基上,在 37℃ 进行放大培养 7~8 d 后,用接种针剥取适量孢子于无菌水中制成孢子悬浊液.而后等量接入一系列含有液体培养基 250 mL 锥形瓶内,接种终浓度(以孢子计)为 1×10^5 个/mL.接种后置于 37℃ 恒温摇床内培养,摇床转速为 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$.

自由悬浮培养时锥形瓶内只含有 50 mL 培养基,而固定化培养时锥形瓶内含有 50 mL 培养基与 0.9 g 载体.

各培养条件下每天分别补充适量灭菌去离子水以消除蒸发带来的影响.

1.5 测定方法

培养过程中培养液内葡萄糖浓度采用 DNS 法测定[9],氨氮浓度采用苯酚-次氯酸钠法测定[10];以藜芦醇为底物测定 LiP 活性[8],以 Mn^{2+} 为底物测定 MnP 活性[11];自由悬浮培养中直接用定量滤纸过滤菌丝小球,并于 80℃ 烘箱内烘干 2~3 d 至恒重后,用天平称量,计算菌丝干重;固定化培养中,计算菌

丝干重需要再减去培养前载体重量[6].

测定时每次取 3 个样品平行测定,结果取其平均值.

2 结果与分析

2.1 培养过程中的测定结果

2.1.1 自由悬浮培养

在自由悬浮培养条件下,木质素降解酶合成状况见图 1.培养过程中发酵液内一直未检测到 LiP,而在培养第 3 d 开始可以检测到 MnP,第 4 d 迅速增加并达到其峰值 230.75 U/L,此后迅速下降,到第 5 d 残余 MnP 活力仅为 62.76 U/L.

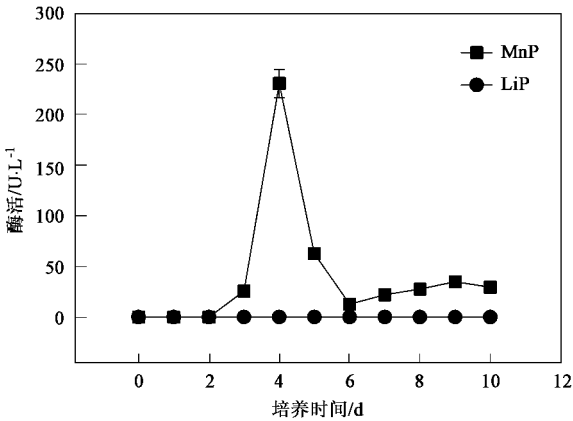


图 1 自由悬浮培养条件下木质素降解酶合成情况
Fig.1 Ligninolytic enzymes production during free culture

此条件下生物量增长、葡萄糖和氨氮消耗状况见图 2.生物量的增长速率在培养前 4 d 相对较快,培养第 6 d 后生物量浓度基本稳定;葡萄糖的消耗速率则在培养前 4 d 相对缓慢,此后相对有所增加;

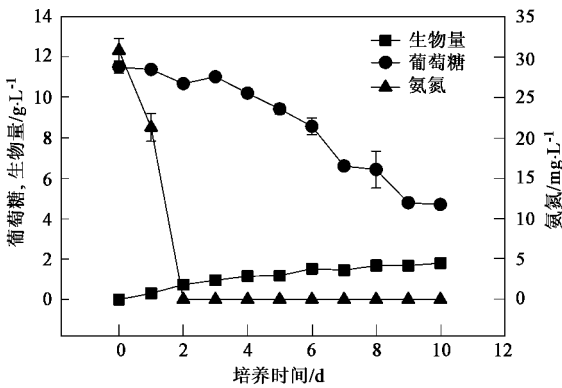


图 2 自由悬浮培养条件下生物量、葡萄糖以及氨氮浓度-时间曲线

Fig.2 Time course curve of biomass, glucose and ammonium nitrogen concentration during free culture

由于采用的培养基属于限氮培养基,其中氨氮消耗较快,在培养第 2 d 全部耗尽.

2.1.2 固定化培养

在固定化培养条件下,木质素降解酶合成情况见图 3. MnP 出现较早,在培养第 2 d 就开始检测到. LiP 和 MnP 在培养第 5 d 同时达到其峰值,分别为 721.4 U/L 和 409.8 U/L. 同样地,二者在发酵过程中很不稳定,达到高峰后迅速下降.

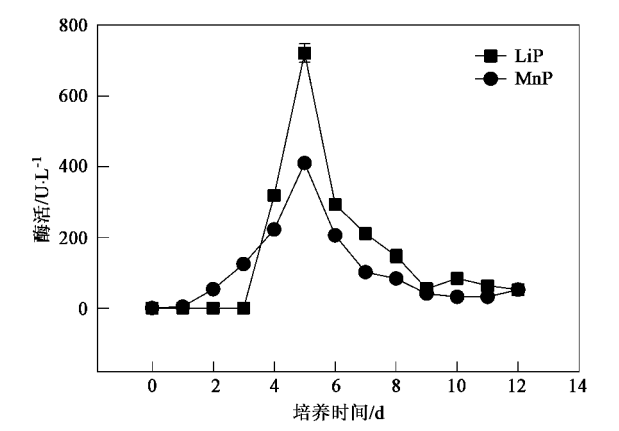


图 3 固定化培养条件下木质素降解酶合成情况
Fig.3 Ligninolytic enzymes production during immobilized culture

此条件下对应生物量、葡萄糖、氨氮浓度变化曲线见图 4. 生物量的增长主要集中于培养前 5 d, 并且其稳定值与自由悬浮培养条件下接近; 葡萄糖和氨氮的消耗速率相对于自由悬浮培养则大大增加, 培养 1 d 后氨氮基本耗尽, 葡萄糖则在培养第 7 d 基本耗尽.

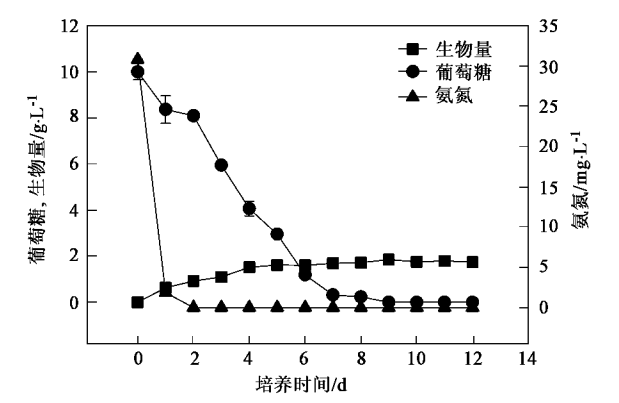


图 4 固定化培养条件下生物量、葡萄糖以及氨氮浓度-时间曲线
Fig.4 Time course curve of biomass, glucose and ammonium concentration during immobilized culture

2.2 发酵动力学模型

2.2.1 模型建立

为建立模型,对发酵过程做如下 5 个假设:①整个培养体系内各成分混合均匀;②浅层培养条件下氧传质不是限制性因素;③木质素降解酶高峰后下降一部分是由其自身代谢产物引起,且此类自身代谢产物的产生与葡萄糖消耗成正比;④木质素降解酶高峰前不发生失活现象;⑤发酵过程中 pH 值保持恒定.

(1)生物量 众多研究结果均表明在批式培养中, *Phanerochaete chrysosporium* 生长符合 Logistic 模型^[6, 12~14],即生长速率符合方程(1).

$$\frac{dX}{dt} = k_1(1 - k_2X)X \quad (1)$$

式中, k_1 为菌体比生长速率(d^{-1}); k_2 为环境限制因子($L \cdot g^{-1}$); X 为生物量($g \cdot L^{-1}$).

(2)葡萄糖 培养过程中葡萄糖消耗包括 3 部分:菌体生长消耗、菌体维持生命活动消耗、菌体合成代谢产物消耗.由于菌体代谢可以得到各种产物,且各种产物对应的葡萄糖得率常数也不相等.从简化模型角度考虑,菌体代谢得到各种产物皆可看作是现有菌体对葡萄糖的利用,从而葡萄糖消耗可以视为 2 部分,一为由于新菌体生长消耗,二为已有菌体代谢消耗.得到简化方程为:

$$\frac{dS}{dt} = -k_3 \frac{dX}{dt} - k_4X \quad (2)$$

式中, k_3 为菌体生长对应葡萄糖消耗系数($g \cdot g^{-1}$); k_4 为菌体代谢对应葡萄糖消耗系数(d^{-1}); S 为葡萄糖浓度($g \cdot L^{-1}$).

(3)氨氮 氨氮作为氮源在限氮培养基中含量较少,通常在生长阶段(2~3 d 之内)就已经全部消耗.所以在生长阶段是一种限制性底物.假设其浓度变化符合方程(3).

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/N}} \frac{\mu_{\max} N}{k_N + N}X \quad (3)$$

可以进一步简化为:

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{k_5 N}{k_N + N}X \quad (4)$$

式中, $k_5 = \mu_{\max} \frac{1}{Y_{X/N}}$ 为培养过程中氨氮消耗常数 [$mg \cdot (g \cdot d)^{-1}$]; k_N 为氨氮消耗半饱和常数 ($mg \cdot L^{-1}$); N 为氨氮浓度 ($mg \cdot L^{-1}$); $\mu_{\max}$ 为最大比增长速率 (d^{-1}); $Y_{X/N}$ 为氨氮消耗菌体产率 ($g \cdot mg^{-1}$).

(4)木质素降解酶 对于 LiP 和 MnP,其对应峰值前采用由 Luedeking 等^[15]提出的模型来描述木质素降解酶形成规律,即方程(5).

$$\frac{dE}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \tag{5}$$

式中, α 为与菌体生长率相关的产物合成效率常数($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$); β 是与现有非生长菌体相关的产物合成效率常数 [$\text{U} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$]; E 为木质素酶浓度, 包括 LiP 和 MnP ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$).

峰值之后生物量基本达到稳定, 同时考虑酶自身不稳定性以及由于其他代谢产物导致其不稳定, 将峰值后酶活变化规律描述为:

$$\frac{dE}{dt} = \gamma X + k_s \frac{dS}{dt} - k_E E \tag{6}$$

式中, γ 为菌体产物合成效率常数 [$\text{U} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$]; k_s 为因其他过氧化氢与蛋白酶等其他代谢物 (substance) 导致木质素酶失活的效率常数 ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$); k_E 为酶 (enzyme) 自身不稳定性导致的失活效率常数 (d^{-1}).

2.2.2 模型参数回归

联立方程(1)~(6), 采用 Matlab 6.5 软件进行非线性规划计算, 所用的算法为全局性收敛的高斯-牛顿法, 以误差平方和最小为目标函数, 获得拟合参数.

$$\begin{aligned} \text{Min} \phi = & \sum (X_e - X_c)^2 + \sum (S_e - S_c)^2 + \\ & \sum (N_e - N_c)^2 + \sum (E_e - E_c)^2 \end{aligned} \tag{7}$$

式中, X 、 S 、 N 、 E 分别代表生物量、葡萄糖、氨氮和酶活浓度, e 代表实验值, c 代表计算值.

基于以上自由悬浮培养与固定化培养试验数据可以得到模型参数回归结果分别见表 1 和表 2.

表 1 自由悬浮分批培养动力学模型参数估计结果

Table 1 Estimation value of kinetics model parameter of free batch fermentation

参数	估计值	参数(MnP)	估计值
k_1	0.514 4	α	0
k_2	0.561 6	β	115.801 8
k_3	0	γ	26.064 4
k_4	0.612 6	k_s	0.239 2
k_5	32.527 4	k_E	1.616 1
k_N	0.245 0		

表 2 固定化分批培养动力学模型参数估计结果

Table 2 Estimation value of kinetics model parameter of immobilized batch fermentation

参数	估计值	参数(LiP)	估计值	参数(MnP)	估计值
k_1	0.668 3	α	0	α	0
k_2	0.561 5	β	248.938 0	β	80.115 5
k_3	5.432 3	γ	0.000 5	γ	6.042 7
k_4	0.177 3	k_s	225.430 3	k_s	3.267 2
k_5	64.840 9	k_E	1.159 3	k_E	0.659 3
k_N	1.173 5				

2.2.3 试验值与计算值比较

将通过模型计算得到的生物量、葡萄糖、氨氮以及木质素降解酶浓度的计算值和相同培养条件下另一组试验值进行比较可以发现, 模型较好地模拟了自由悬浮培养以及固定化培养条件下发酵体系内各个变量随时间的变化情况, 如图 5、6 所示. 计算值与实测值相对偏差在 15% 以内.

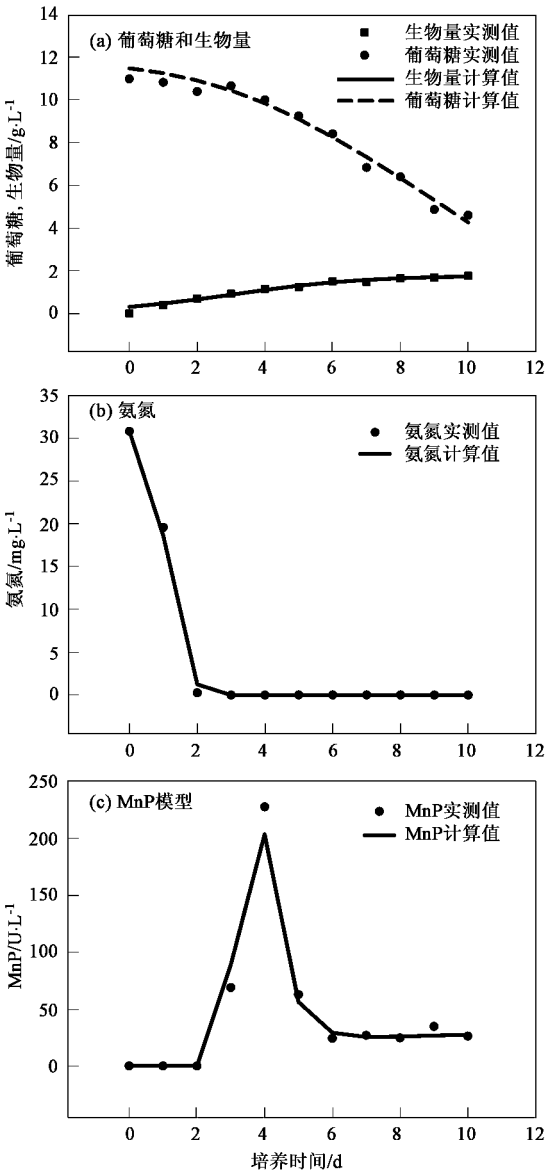


图 5 自由悬浮培养条件下葡萄糖和生物量、氨氮和 MnP 模型计算值与实测值对比

Fig.5 Fitting curve figure of glucose and biomass, ammonium nitrogen and MnP model for free culture

3 讨论

在描述生物量增长的逻辑斯蒂模型中, k_1 代表

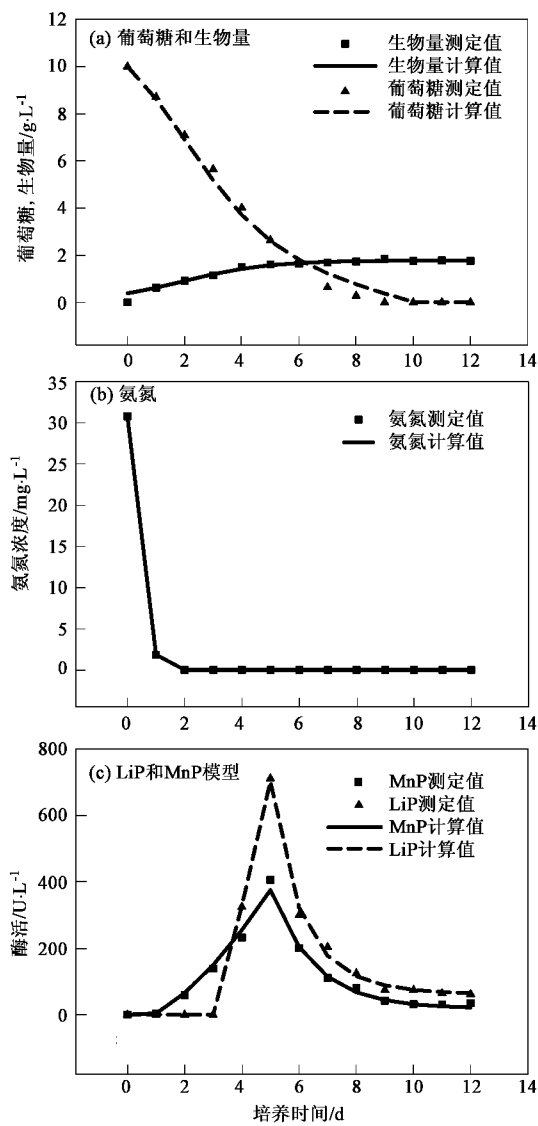


图6 固定化培养条件下葡萄糖和生物量、氨氮、LiP 和 MnP 模型计算值与实测值对比

Fig.6 Fitting curve figure of glucose and biomass, ammonium nitrogen, LiP model and MnP model for immobilized culture

生物比增长速率, k_2 为最大可能生物量的倒数. 对比自由悬浮培养和固定化培养中得到的 2 个参数结果可以发现: ①固定化培养时菌体比增长速率更快, 而 2 种培养条件下初始接种量是相同的, 说明固定化培养后黄孢原毛平革菌菌体生长速率更快; ②培养条件对 k_2 几乎没有影响, 表明 2 种培养体系内能够达到的最大理论生物量是相等的, 即在 50 mL 限氮培养基内可以得到的最大生物量浓度为 1.78 g/L.

葡萄糖和氨氮消耗情况随培养条件的变化有较大的差异. 自由悬浮培养全过程中, 由于黄孢原毛平革菌自身生长消耗的葡萄糖相对于由于菌体自身代

谢消耗的葡萄糖非常少, 模型拟合的结果表明大量葡萄糖都用于非生长的菌体代谢. 固定化培养过程中则有一部分葡萄糖消耗用于菌体量的增加. 氨氮的消耗则由于 2 种培养条件导致的菌体生长速度的差异而呈现出速率的差异, 在模型参数表现为固定化培养中 k_5 、 k_N 均大于自由悬浮培养. 在 2 种培养体系内的底物消耗的巨大差异说明培养条件的不同可能对代谢过程有严重影响, 有可能改变菌体的某些代谢途径.

在产酶模型中可以发现 2 种条件下对应各种木质素降解酶的方程中 α 值均为零, 说明 LiP 和 MnP 的产生与生长无关, 即木质素酶的产生过程是非生长耦联的. 同时对比高峰前后 β 值也可发现, 产酶高峰后菌丝体产酶能力很快衰退, 此时一方面需要保持培养液内的木质素酶的稳定性, 另一方面需要改变培养环境以重新激活菌丝体的产酶能力.

模型拟合的结果表明, 在自由悬浮培养条件下, *Phanerochaete chrysosporium* 以菌丝小球形式存在时, 其 MnP 合成能力较强, 但在 MnP 达到高峰附近其菌丝体生长并不充分, 所以在摇瓶内得到的 MnP 总量相对较低. 在此培养条件下, 通过对培养基组分的调整, 促使菌丝体在产酶峰前充分生长, 可以大大提高 MnP 产量. Jimenez 等^[16, 17] 在此培养基内增加成分酵母浸膏, 大大提高了菌体在自由悬浮培养过程中的生长速率, 同时通过加入较高浓度 Mn^{2+} 对 MnP 表达进行诱导, 获得了较高的 MnP 产量. 林刚等^[18] 发现在培养过程中添加玉米芯浸出液等可以提高摇瓶培养体系内黄孢原毛平革菌生物量, 进一步试验发现浸出液的加入同样可以进一步提高菌体的 MnP 产酶量. 张晶^[19] 尝试不同种类以及采集点的木材制作木材浸出液, 添加后也发现白腐真菌 F2 的 MnP 产酶量的增加. 另外在自由悬浮培养条件下, 菌体在产酶高峰后, 依旧具备一定的 MnP 合成能力, 适宜考虑补料分批发酵形式以提高产酶效率.

在固定化培养中, *Phanerochaete chrysosporium* 具有较强的合成 LiP 的能力, 而且菌体生长较快, 其 LiP 产量和 MnP 产量都较高. 但是在此条件下, 木质素酶达到高峰后, 菌体的木质素酶合成能力大大下降, 所以在考虑补料分批形式发酵时, 补料点应设置在其峰值之前, 这样才能充分利用菌体木质素降解酶合成能力, 更大程度地提高产酶量.

4 结论

(1) 针对黄孢原毛平革菌批式发酵过程建立了

发酵动力学模型,该模型较好地模拟了自由悬浮培养和固定化培养过程中生物量、葡萄糖、氨氮和木质素酶浓度的变化,各变量的模型计算值相对于实测值的偏差均在 15% 以内.对比自由悬浮培养和固定化培养 2 种条件下的拟合获得的模型参数发现,2 种培养形式得到的最大生物量浓度相近,为 $1.78 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;固定化培养菌体的比增长速率值(0.6683 d^{-1})大于自由悬浮培养值(0.5144 d^{-1}).对应于生长状况不同,2 种培养条件下葡萄糖和氨氮消耗呈现较大差异,自由悬浮培养中绝大部分葡萄糖消耗于非生长菌体代谢,固定化培养中则部分葡萄糖用于菌体生长,且氨氮消耗更快.

(2)黄孢原毛平革菌的木质素酶合成与生长无关.不同培养条件导致了发酵产生的木质素酶种类的差异,且在各木质素酶高峰前后,菌体产酶能力有差异.在自由悬浮培养条件下,菌丝小球 MnP 合成能力为 $115.8 \text{ U} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$,且高峰后依然可以保持 $26.1 \text{ U} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$,适合采用补料-分批发酵的模式提高 MnP 的产量及其发酵效率,通过培养基调控等方式提高菌体的生长速率是在批式发酵中提高 MnP 产量的关键之一.在固定化培养条件下,菌体在合成 MnP 同时可以合成大量 LiP($721 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$),但是其单位浓度菌体 LiP 和 MnP 合成能力在酶活高峰之后明显下降,分别由 $248.9 \text{ U} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ 和 $80.1 \text{ U} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ 下降到 $0 \text{ U} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ 和 $6.04 \text{ U} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$,故而在考虑补料-分批发酵模式时,补料时机应选择培养中期 LiP 与 MnP 峰值之前.

致谢:感谢倪天佳博士在求解模型中的帮助.

参考文献:

- [1] Tien M, Kirk T K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Science, 1983, **221**: 661-663.
- [2] Glenn J K, Morgan M A, Mayfield M B, et al. An extracellular H_2O_2 -requiring enzyme preparation involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1983, **114**: 1077-1083.
- [3] Barr D P, Aust S D. Pollutant degradation by white-rot fungi [J]. Rev Environ Contam T, 1994, **138**: 49-72.
- [4] Cameron M D, Timofeevski S, Aust S D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, **54**: 751-758.
- [5] Cabaleiro D R, Rodriguez-Couto S, Sanroman A. Comparison between the protease production ability of ligninolytic fungi cultivated in solid state media [J]. Process Biochem, 2002, **37**: 1017-1023.
- [6] Zheng Z M, Foo Y D, Jeffery P O, et al. A simple structure model for enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2003, **11**(4): 414-419.
- [7] Tavares A P M, Coelho M A Z, Coutinho J A P, et al. Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modeling [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005, **80**: 669-676.
- [8] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Method Enzymol, 1988, **161**: 238-249.
- [9] Ghose T K. Measurement of cellulose activities [J]. Pure Applied Chemistry, 1987, **59**: 257-268.
- [10] Weatherburn M W. Phenol-Hypochlorite reaction or determination of ammonia [J]. Anal Chem, 1967, **39**: 971-974.
- [11] Paszczynski A, Crawford R L, Huynh V B. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification [J]. Method Enzymol, 1988, **161**: 264-270.
- [12] Barclay C D, Legge R L, Farquhar G F. Modelling the growth kinetics of *Phanerochaete chrysosporium* in submerged static culture [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, **59**(6): 1887-1892.
- [13] Yetis U, Doleka A, Dilek F B, et al. The removal of Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Water Res, 2000, **34**: 4090-4100.
- [14] Ntwampe S K O, Sheldon M S. Quantifying grown kinetics of *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on a vertically orientated polysulphone capillary membrane: Biofilm development and substrate consumption [J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, **30**: 147-151.
- [15] Luedeking R, Piret E L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH [J]. Biotechnol Bioengin, 2000, **67**: 393-401.
- [16] Jimenez-Tobon G, Kurzatowski W, Rozbicka B, et al. In situ localization of manganese peroxidase production in mycelial pellets of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Microbiology, 2003, **149**: 3121-3127.
- [17] Chung E, Oh J, Hwang S, et al. Enhanced production of manganese peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium* due to the increased autolysis of chlamydospore-like cells [J]. Biotechnology letters, 2005, **27**(7): 477-481.
- [18] 林刚,文湘华,钱易.液体培养基中添加天然成分对白腐真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 生长的促进作用[J].环境科学, 2003, **24**(4): 41-47.
- [19] 张晶.白腐真菌木质素降解酶分离纯化及性质研究[D].北京:清华大学,2005.