

青岛农业大学

毕业论文(设计)

题目: 漆酶多样性及其在生物修复中的应用研
究现状

姓名: 张文龙

学院: 生命科学学院

专业: 生物技术(食用菌)

班级: 2016级01班

学号: 20165192

指导教师: 于浩

2020年6月1日

青岛农业大学

毕业论文诚信声明

本人郑重声明：所提交的本科毕业论文（设计）是本人在指导老师的指导下，进行研究工作所取得的成果，成果不存在知识产权争议。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体在文中均作了明确的说明并表示了谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

毕业论文（设计）作者签名：

年 月 日

目 录

摘要	I
Abstract	I
前 言	1
一、土壤分解的生态学意义	3
二、土壤中的主要难降解聚合物木质素	4
三、漆酶的酶学特性及难降解化合物的生物降解	5
四、漆酶在难降解植物化合物分解中的作用	6
五、土壤真菌漆酶基因在生态学研究 and 初步调查中的应用	7
六、土壤真菌漆酶基因的空间分布和转录谱	7
七、土壤真菌漆酶基因的时间分布及表达谱	8
八、非真菌微生物对土壤漆酶活性的影响	8
九、环境对土壤漆酶活性及相关微生物的影响	9
结论和观点	10
参考文献	12
致 谢	14

漆酶多样性及其在生物修复中的应用研究现状

生物技术（食用菌） 张文龙

指导老师 于浩

摘要：降解难降解多酚类物质残留木质素是陆地生态系统元素转化的瓶颈。因此，考虑到土壤作为二氧化碳地下来源的生态作用，人们对理解其潜在机制和动力学有很大兴趣。本文综述了在不同环境条件下漆酶产生的土壤微生物和漆酶活性对难降解残基降解的生态重要性。我们综合并讨论了以往经典的生态学、酶生态学和分子生态学研究的结果，指出基因检测、酶活性和底物降解性之间的差异。我们指出了当前研究的主要障碍，并概述了在土壤生态系统中真菌漆酶活性的研究进展。

关键词：木质素；漆酶；土壤微生物；难降解物质

Laccases diversity and its application in bioremediation

Student majoring in Biotechnology (edible fungi) Zhang Wen Long

Tutor Yu Hao

Abstract: The degradation of Lignin, which is difficult to degrade, is the bottleneck of element transformation in terrestrial ecosystem. Therefore, there is considerable interest in understanding the potential mechanisms and dynamics of soil as a sink or source of carbon dioxide, taking into account its possible ecological role. In this paper, the ecological importance of soil microorganism and laccase activity to degradation of refractory residues under different environmental conditions was reviewed. We synthesize and discuss the results of past classical ecology, enzyme ecology, and Molecular Ecology Studies, pointing out the differences between gene detection, enzyme activity, and substrate degradation. We point out the major barriers to current research and outline the advances in understanding the laccase activity of fungi in soil ecosystems.

Key words: lignin; laccase; soil microorganism; refractory substance

前 言

土壤植物生态学的一个重要中心研究问题也就是将土壤生物资源多样性与研究控制土壤生态系统基本功能的土壤生物学和地球化学研究过程紧密联系在一起。植物源性质和有机化合物的化学分解过程是一个真正并且具有它的全球性和重要性的化学过程^[1]。异养是指土壤中的微生物对有机营养物质中所有富含营养元素的生态循环作用是地球陆地土壤生态系统中的养分能量转化和生物能量转移的重要结构组成的一部分。这也直接性地关系着受到大气土壤和上层大气之间的气体二氧化碳(CO₂)相互交换和大气土壤中的腐殖质主要组分的组合形成。最初的分子生物学和地球化学降解研究主要侧重于特定降解步骤,如发现白腐真菌可以降解种植木材,主要领域研究的是可用于培养各种微生物的各种相关降解酶。生物化学、生理学、尤其在像是生物分子和微生物学等的技术现在已经能够在生物原位上的评估和深度比较诸如森林等复杂的生态系统内部和之间分析土壤中的微生物体和群落的物种多样性、组成、功能、生态和对环境干扰的化学反应^[2]。

难降解的落叶植物有机化合物例如有机芳香烃家族和类聚合物等也是导致枯枝叶和落叶植物分解的主要瓶颈。在难以被降解的天然有机聚合物中,木质素含量是人类植物细胞凋落物中元素含量第二丰富的重要成分^[3]。在这些种类植物残体的再生降解代谢过程中都会涉及使用到大量的胞外酶,其中包括木质素除了分解外还有酶,即分解木质素和磷酸锰过程的氧化物分解酶以及磷酸漆质素酶,到目前为止都一直是主要的科学研究工作对象。由于产生木质素活性分解过渡氧化物降解酶本身具有相当高的分子氧化率和还原优先电位,可直接主动攻击产生木质素活性分子的多个芳香(其中优先电位是酚)分子结构,因此木质素过渡氧化物降解酶被广泛认为可以是几乎所有产生木质素的定植和树木凋落物改性降解担子菌都能产生的最常见木生物质素分子改性降解酶^[4]。相比之下,漆酸溶酶虽然具有较低的通过氧化介质还原反应潜能和低的直接通过木质素氧化分解反应效率,但它们的氧化潜能仍然可以直接通过氧化介质不断增加,漆酸溶酶主要是由多种溶于土壤中的微生物,特别多的是它和真菌结合产生的^[5]。

在所有木质素分解外酶中,漆酶是最适合进行深远的土壤分子生态学研究的酶。除了在土微生物中频繁出现外,漆酶编码基因序列能够设计出与广泛类群相兼容的引物。因此,近年来,漆酶编码基因被用作分子标记用于在研究在生态或环境变量的影响下,土壤真菌的结构和功能多样性与凋落物降解和土壤有机质(SOM)循环的关系。本文回顾了这些研究,以找出遇到的困难并概述一些观点。本文的总体思路是,土壤中真菌漆酶基

因和转录本的多样性在空间和时间上具有高度的变异性，很难与外酶活性和植物凋落物分解有关。分子生物学工具朝着更彻底的方向发展，只能部分地帮助克服困难。适当的策略,尤其是在试图扩大和连接微生物过程到景观和区域层面上时，是谨慎地选择正确的微生物指标，即使它们只代表整个群落的一部分。

一、土壤分解的生态学意义

结合机械矿化和植物土壤细胞有机质结构形成的具体过程, Satchell 将“分解”明确定义矿化为将各种植物土壤细胞膜的结构经过分解转化为各种构成酶的元素, 并机械矿化分解后成为植物腐殖质素的阶段。因此, 分解过程是构成一组复杂的固体生物和非生物结合过程, 构成生物养分也是返回水和土壤的主要转化途径。这对促进植物的持续生产力发展是至关重要的, 引物每年能够进入植物生态系统的各种必需品和营养物质的数量通常来说是有限的。植物营养物质的氧化降解过程受多种化学因素的直接影响, 包括主要的物理化学因素土壤条件(例如确定土壤质地、pH 氧化值或土壤氧化率的还原率和电位)、气候(土壤温度、降水量和土壤湿度)、进入土壤凋落物的细胞数量和生化反应性质以及生物群落酶和土壤外复合酶的化学组成、相互作用和氧化产生^[6]。

植物生物量结构是复杂的, 通常被人们认为它是由不稳定(例如葡萄糖、淀粉、半活性纤维素和弹性纤维素)和难以被降解(例如草酸木质素、亚木酸角质素和植物角质)的多种混合物共同组成的^[7]。死亡后, 植物营养物质为异常培养基和微生物生长提供初级营养能源, 为一个 SOM 的细胞形成过程提供初级营养基质。植物合成材料的主要化学成分以及不稳定和难快速降解有机化合物的相对含量比例在快速分解植物过程中发生变化(见图 1), 这与一系列中性微生物中的群落变化有关: r-战略家(其他同义词: 具有机会或非致病性, 发酵性, 或共结合营养的中性微生物)在早期研究占据了主导地位, 后来被 K-战略科学家(其他同义词: 持久性、本土性或寡头共营养的中性微生物)逐渐取代^[8]。在早期生长阶段, 容易人体获得的各种代谢物(即例如葡萄糖、淀粉、蛋白质、脂质和植物纤维素)被迅速分解, 木质素的被分解会使微生物的正常生长功能受到很大限制。因此, 剩余材料中的难降解化合物(如木质素)的比例增加, 这往往会限制分解速度^[9]。虽然已经证明某些真菌比其他凋落物更快地攻击木质素, 但这种方案在野外最为常见。在第一个微生物分解阶段和土壤大和中型动物对植物材料的机械破碎(导致接触面增加)之后, 第二类土壤微生物(指具有广泛生理特性的土壤真菌和细菌)有可能攻击顽固的残留物。

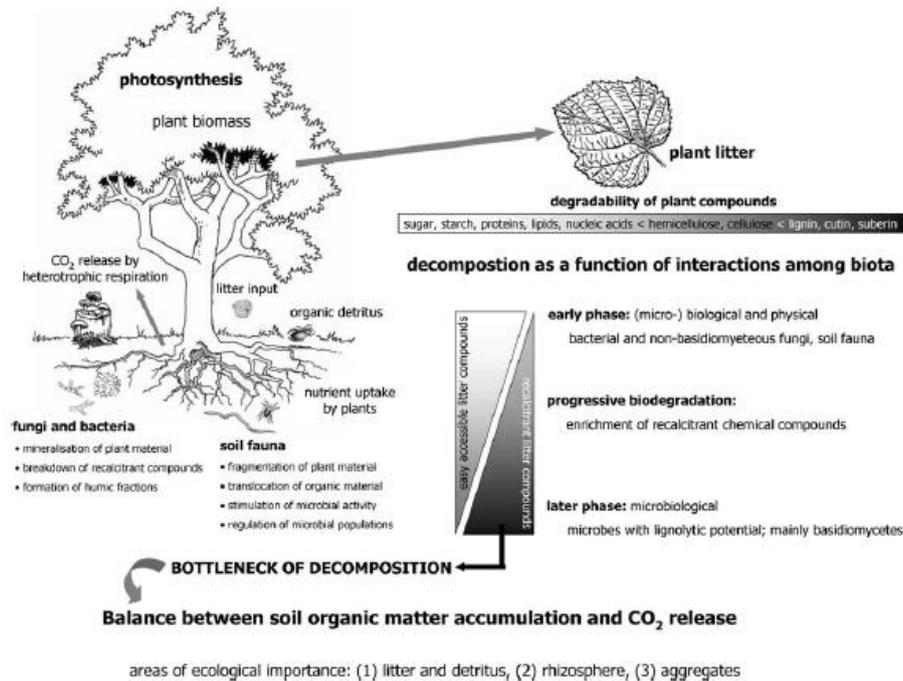


Fig. 1 Degradation of organic material, the underlying mechanisms including the chemical changes during the turnover with special emphasis of the decomposition of recalcitrant plant compounds as the bottleneck in relation to the involved organisms and the influence on the balance between soils as sink or source of carbon dioxide (used clip arts from <http://etc.usf.edu/clipart/>)

图1 有机物的降解，基本机制包括在转化过程中的化学变化，特别强调难降解的植物化合物的分解是与所涉及的有机体有关的瓶颈，以及作为二氧化碳汇或源的土壤对平衡的影响。

二、土壤中的主要难降解聚合物木质素

木质素是它是人类自然界中各种芳香和油族烃类聚合物的主要化学来源。它在水生维管花科植物、蕨类植物和水生球茎蕨类苔藓的基质细胞壁中快速聚合，与半纤维纤维素紧密地结合散布在一起，从而直接形成一个包围着半纤维素微粒半纤维的细胞基质^[10]。在分子生物化学上，木质素分子是一种具有高分子量的三维大晶体分子，主要由丁香芳基醚和甘油- β -芳香苯基醚在双键之间连接的四个苯基丙烷合成单元(主要成分是苯基香兰醇、丁香基和苯基肉桂醇)直接合成。三个甲基苯丙烷合成单元之间的质量比例在木质裸子藻类植物和木质被子藻类植物的酸性木质和非酸性木质（叶和两个针）的线组织以及非木质维管藻类植物的针组织之间发生变化^[11]。

木质素矿化涉及两个连续过程：(a)芳香族聚合物的主要侵蚀和分解为低聚物或单体；(b)这些产物完全降解为二氧化碳、水和矿物^[12]。由于其复杂的交联结构，木质素具有很高的难降解性和抗化学和生物降解性。在初次攻击后，它会逐渐氧化降解或在腐殖质化合物中重新聚合。特别是在土壤真菌中，担子菌参与木质素分解，因为它们具有酶降解或修饰木质素的能力。虽然褐腐菌和软腐菌通

常被认为只是修饰木质素聚合物（褐腐菌除外），但木质素分解菌能够将木质素完全分解为二氧化碳^[13]，因为它们是木质素分解酶尤其是漆酶的高效生产者。

三、漆酶的酶学特性及难降解化合物的生物降解

真菌体的基因组通常包含可以编码几种胞外酶的分子基因，这些胞外酶可以通过氧化破坏苯基乙醚内酯交联酶的氧化酶而裂解生成苯基丙烷分子单元。因此，甲氧基被迅速脱甲基成酚，醛被迅速氧化甲基成酸，木质素酚在结构过程中的芳香烃循环被迅速裂解^[14]。木质素进行降解/再生改性的主要四种酶分别是磷酸木质素过渡二氧化物酶(LiP; EC 1.11.1.14)、锰过渡二氧化物酶(MnP; EC 1.11.1.13)、多功能树木过氧化物酶(VP; EC 1.11.1.16)和木油漆酶(EC 1.10.3.2)。木质素电位分解酶的过氧化物还原酶的电位催化化学性能主要表现为分解过氧化氢(H₂O₂) 电位活化天然还原酶和电位氧化高的过氧化氢的还原酶和电位低的芳香族化合物。LiP 可以降解非酚类(高达 90%的酚类聚合物)，而它的 MnP 可以作用于各种苯多酚类或非苯多酚木蛋白质素合成单元及其生成物如 Mn³⁺。第三类木聚过氧化物酶 VP 结合了 LiP 和 MnP 的催化性能。它能够将氧化 Mn²⁺为 Mn³⁺以及酚类和非酚类化合物^[15]。

除了三种作为木质素酶分解有机过氧化物时的酶外，漆质素酶也是目前研究最多的用于分解难植物降解酶和植物有机化合物的一种酶。漆酶最早是被发现于日本漆树^[16]，不久之后在许多真菌中又被发现，同时在大多数的微生物（包括植物、真菌、细菌和其他昆虫）中也已经发现了抑制漆菌的酶，漆酶在其中发挥着各种功能。许多作者报道真菌是漆酶产生菌中最重要的一类，并强调真菌漆酶对植物木质素的改性能力。除了对脱木素的影响外，真菌漆酶还参与了各种过程，包括竞争性相互作用、发病机制、子实体形成、无性发育过程中色素形成，其他 SOM 化合物的降解以及腐殖质部分的形成^[17]。

生物化学上,漆二酚酶（苯二醇/2 环氧二酚氧化还原酶）严格学术意义上说是属于直接作用于二苯多酚和相关化学物质的二酚氧化还原酶（根据 NC-IUBMB;根据国际分子生物化学和分子生物学联合会命名委员会）。由于它们的循环催化反应性能与四个环的铜（镍或铜）金属原子相互结合而得到活性剂的位点时间有关,漆酶属于多酶的铜甲基氧化酶羧酸家族^[18]。它们通过催化剂将分子中的氧(O₂) 通过还原氧化为分子水(H₂O)，同时生成氧化底物（即例如单、二、多酚类化学物质、氨基酚、甲氧基酚或其他芳香胺），从而反应形成二甲苯

氧自由基，并通过自由基偶联、芳香烃在环上的裂解或聚合破坏环和 C-C 在双键上的聚合进一步生成反应。考虑作用到它的漆酸酯酶与在酚木质素中被分解生成过氧化物的漆酶之间相比较它具有较低的分子氧化速度还原率和电位，它们可以作用于完成酚木和树质素合成单元的初始物质氧化/活性裂解，酚木质素单元通常不到总聚合物的 10%^[19]。

四、漆酶在难降解植物化合物分解中的作用

对漆酶功能的初步研究是在白腐真菌及其木材腐朽能力的研究框架内进行的，证明漆酶的参与是严格的。在过去的几年里，研究的重点转移到了漆酶在土壤生态系统不同区域的发生和功能，如植物凋落物、森林地面和矿物土壤。一些研究集中在使用垃圾袋法降解单个或混合植物凋落物上，这有助于更好地了解影响植物凋落物腐烂的机理和因素。一般来说，在分解后期，酚氧化酶(漆酶)活性增加，表现为 SOM 中顽固性化合物的富集和真菌生物量的增加^[20]。然而，针叶和落叶凋落物类型分解能力的比较不仅揭示了木质素含量与分解速率之间的负相关关系，而且还揭示了植物材料中氮浓度的影响。例如，樟子松 (*Pinus sylvestris*) 的针叶和颤杨 (*Populus tremuloides*) 或开花山茱萸 (*Cornus florida*) 的叶子具有木质素和氮含量低的特点，它们构成了快速降解的凋落物类型，质量损失率高，所需的酶活性低，尤其是酚氧化酶的分解活性低于具有较高木质素和 N 含量的银冷杉针 (*Abies alba*) 和普通山毛榉 (*Fagus sylvatica*)、红枫 (*Acer rubrum*) 或红橡 (*Quercus borealis*) 叶。

在不同森林类型的森林地面(有机层)和矿质土壤中进行的研究中也进行了类似的观察，与枫椴树林 (*Acer saccharum and Tilia americana*) 相比，橡树林 (*Quercus velutina and Quercus rubra*) 的酚氧化酶活性明显更高。这表明有机物的种类影响土壤微生物降解木质素和酚类化合物的酶活性，进而影响凋落物碳(C)的储存、SOM 的形成和养分的释放。

一些近期研究结果表明，无论土壤凋落物质的类型如何其在土壤有机物质层(例如森林中或地面)土壤中的氨基酚氧化酶活性显著性远高于富含矿物质的土壤^[21]。酶活性的时间深度变化梯度与体内微生物(包括真菌)及其群落的生物量、丰度、组成和细胞分布的时间变化程度有关。从生态学的角度来看，这强调了将生态系统过程与生物特别是微生物多样性及其酶活性联系起来的重要性。

五、土壤真菌漆酶基因在生态学研究 and 初步调查中的应用

主要由真菌产生的漆酶在改良土壤中植物源性难降解物质中的作用,在土壤碳循环的分子生态学研究中越来越重要。迄今为止,担子菌和子囊菌的许多基因和蛋白质序列已被鉴定,显示真菌漆酶编码基因经常作为多个拷贝出现在基因组中。例如,腐生真菌 *Coprinus cinereus* 总共含有 17 种漆酶基因以及外生菌根真菌 *Laccaria bicolor* 含有 11 漆种酶基因。

保守的研究铜分子结合物和氨基酸分子序列(1 个含铜半胱氨酸和 10 个半胱氨酸残基)及其在人类蛋白质核酸序列分布中的变化分布,使得能够设计退化寡核苷酸引物,通过聚合酶链反应(PCR)研究环境样品中含漆酶的真菌。

通过测定了栎山毛榉混交林土壤剖面中腐生和菌根担子菌的多样性和空间分布。一般来说,发现产漆酶的真菌优先在有大量的 SOM 上层土壤中定植,还发现在深层土壤中腐生真菌的分布不如菌根真菌。证实,在松林中,根据其营养途径,腐生真菌仅限于新鲜和部分分解的地表凋落物,而菌根真菌则主要存在于降解良好的凋落物和腐殖质层。菌根真菌更广泛的垂直发生依赖于它们不仅能利用寄主植物的光同化物,而且能通过产生胞外酶从 SOM 中获得能量和营养,从而促进土壤碳循环的不同部分,尤其是菌根真菌对环境中土壤碳输入和流失的影响^[22]。尽管对菌根真菌的腐解能力存在一些疑问,但人们认为它们在从有机质中动员氮化合物方面发挥了重要作用,特别是在土壤剖面的更深部分。

六、土壤真菌漆酶基因的空间分布和转录谱

一般来说,真菌漆酶基因的多样性(丰富度、均匀度和组成)随着土壤深度的变化而显著变化。沿着土壤剖面,均匀度(单个基因序列对检测基因总数的相对贡献)与 SOM 数量(含量)和质量(化学成分)的相关性最好。由于这些变异也与漆酶的活性同时发生,因此人们倾向于将基因垂直分布的变化解释为有机能源相对可用性的功能指标。然而,由于真菌漆酶基因的空间分布研究强调了土壤生态系统的复杂性,这一解释的系统有效性受到了挑战。在栎山毛榉林分中,沿三向样带研究担子菌漆酶编码基因,结果表明,在 30 厘米的距离上采集的土壤核心之间差异很大(67%),而且土壤核心可以被视为其基因群体的独立样本,其核心距离可达几米。这种基因分布的多尺度异质性反映了真菌菌丝体的分形生长模式与物理化学性质和生物土壤特性(如微生物群落组成)的高度小尺度异质

性的结合。

在基因水平上工作并不足以分析空间变异，因为基因在给定时间的存在并不能提供相关的活动。为了避免这种偏见，用半定量 RT-PCR 方法研究了森林土壤 Oh 层不同样品中漆酶基因表达的差异。与漆酶基因水平相比，发现漆酶转录物的多样性较低，其中与菌根真菌有关的比例较高。此外，在具有表明根际土壤分区的树根的本体中发现了明显的高多样性转录物^[23]。

七、土壤真菌漆酶基因的时间分布及表达谱

气候（如温度和湿度）和资源可利用性（凋落物输入制度）的季节变化预计会影响温带森林土壤中的微生物群落及其酶活性。分析山毛榉林有机土层（包括凋落物层）中真菌漆酶基因的存在、表达和酚氧化酶（漆酶）活性。发现在基因和转录多样性方面存在明显的差异，并且新鲜凋落物的季节性输入（子囊菌的早期定殖，随后是腐生菌和菌根真菌）的影响很大，这与植物凋落物降解过程中微生物演替的研究相一致^[24]。

真菌基因组通常包含漆酶基因的多个拷贝，其数量因物种而异，所以真菌群落的变化并不是由漆酶基因序列类型多样性的比例变化反映出来的。此外，一些漆酶基因不编码与凋落物分解有关的氧化外酶，但可能与其他功能有关，如组织相互作用和发育过程。例如，在不同的环境条件下，*Trametes sp.C30* 菌株漆酶同工酶的生化特性（氧化还原电位）或 *Trametes villosa* 菌株漆酶同工酶的酶特性（pI 值和 pH 值）的差异表明了生理作用或催化活性的差异。此外，由于漆酶基因在不同生长水平上的诱导或抑制，有迹象表明漆酶同工酶在真菌有机体（例如，朱砂绿脓杆菌和 *Trametes sp.I-62*（CECT 20197）生命周期中起到各种作用。来自占据不同生态位的真菌的漆酶序列相似性可能基于独立于生态相关性的共享功能（例如，发育过程）（枯枝落叶分解菌：双孢蘑菇和灰霉病；木材分解菌：平菇和白灵菇；植物病原菌：丝核菌）。进一步指出，环境样品中的酶分析可能反映的是潜在的而不是实际的原位活性。最后，在田间检测到的总酚氧化酶（漆酶）活性可能部分是由于土壤中存在真菌以外的微生物群。

八、非真菌微生物对土壤漆酶活性的影响

在原核生物中也有漆酶或漆酶样多铜氧化酶（LMCOs）。它们有氧化天然漆

酶底物 2,6-二甲氧基苯酚的潜力^[25]，调查了两种不同生态系统（森林和草地）中细菌 LMCO 编码基因的多样性和分布。在森林生态系统中，细菌 LMCO 基因的多样性远远高于同一地区担子菌的基因多样性。检测草地土壤高酚氧化酶活性，没有发现真菌漆酶编码基因，进一步证实了原核 LMCOs 在 SOM 循环中的作用。这些结果表明，土壤中的代谢过程可以由几个微生物群进行，表明微生物的作用是互补的。只有对整个土壤微生物群落的全面调查才有可能解释生态系统的功能性。

九、环境对土壤漆酶活性及相关微生物的影响

工业化、化石燃料燃烧、森林砍伐、城市化和农业促进了大气中二氧化碳的浓度和氮的沉积，进而提高了陆地生态系统的生产力、土壤有机质的转化率和土壤养分的输送速率。这些环境变化可能会影响森林土壤作为二氧化碳地下来源的功能。

在研究过去的十年中，分析了美国森林土壤中的易溶氮分解修正对难溶氮降解物和植物有机化合物的氮分解、微生物个体群落和氧化酶活性的重要影响。土壤科学理化技术条件、养分供应、微生物群落组成以及凋落物和土壤中难降解物质的含量等因素都会产生不同的反应^[26]。一般来说，与凋落物(山毛榉和橡树)较难分解的生态系统相比，凋落物分解速度相对较快的生态系统(山茱萸、枫树和椴树)对氮沉积量增加的反应是氮沉积量增加，腐烂速度加快，酶活性增加。然而，最近的一项研究表明，在植被和凋落物化学相似的遥远地点之间比在不同植被覆盖的邻近地点之间，酶活性对氮添加的响应不同，这表明土壤生态环境的显著影响。研究还发现凋落物分解与酶活性之间缺乏普遍的相关性。这些发现表明，土壤条件和/或土壤栖息群落似乎有足够的差异，导致在酶活性方面对氮添加产生相反的反应^[27]。在这种情况下，将含有特定产酶基因(如漆酶)的微生物群落的组成与其酶活性(如酚氧化酶活性)联系起来的相关性很小。在有机土壤层(Oi、Oe 和 Oa)中，生态系统类型和基质顽拗性水平、氮沉积增加、或生态系统林分与人工氮沉积之间的相互作用都会显著影响漆酶编码基因的丰度^[28]。研究还表明，漆酶编码基因的丰度及其与生态系统类型的相互作用显著影响实际的酚氧化酶活性，酚氧化酶活性又会受到氮沉积相互作用的生态系统的影响。在凋落物木质素含量较高的生态系统中，酚氧化酶活性随着氮沉积量的增加而降低。微生物介导的土壤过程对氮修正的反应似乎导致了不一致的模式。这可能可以通过凋落物化学和微

生物之间的相互作用来解释，因为物种有能力开发不同的资源生态位。根本机制仍然没有得到充分理解，也没有得到充分解决。在系统对氮变化反应的背景下进行进一步的研究，对于在具有木质素分解(漆酶)基因的生物体的丰度、相关酶活性和分解过程本身之间建立联系至关重要。

结论和观点

通过对介导养分循环的异养微生物群落的生物多样性进行调查，可以建立与陆地生态系统功能性相关的基于过程的联系（见图 2）。利用功能标记基因（如漆酶）鉴定土壤微生物，充其量只能提供间接的功能指示，但不能得出生态系统中实际活性功能的结论。

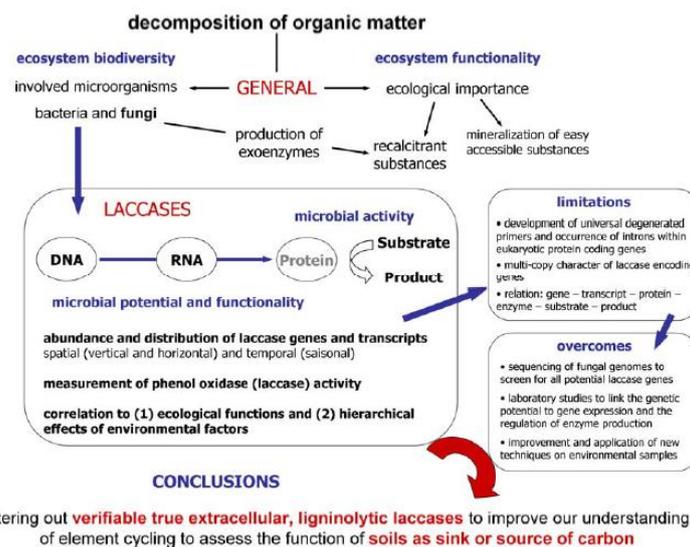


Fig. 2 Decomposition of organic matter as a process-based link between ecosystem biodiversity and ecosystem functionality emphasizing the importance of the laccase approach. Suitability of commonly used molecular biological and enzymological techniques for tracing the microbial diversity (genetic potential and functionality) and the activity in natural environments

图 2 有机物分解作为生态系统生物多样性和生态系统功能之间基于过程的联系，强调了漆酶方法的重要性。常用分子生物学和酶学技术追踪微生物多样性（遗传潜能和功能）和自然环境中活性的适用性

一些研究描述了含有漆酶或 LMCO 基因的土壤微生物群落的多样性、分布和组成，并将它们与生态功能和环境因素的层次效应联系起来。在一些出版物中，对一般方法的局限性，包括核酸提取的质量和数量以及 PCR 效率的波动进行了全面的讨论。然而，关于漆酶的两个主要的障碍可能阻碍了最近的研究：首先，很难为定义的分类群设计有效的引物，特别是对于包含内含子的真核蛋白质编码序列，所以可能不会检测到所有漆酶。此外，真菌漆酶缺乏完整的 ORF 序列，使检测能分泌细胞外木质素分解酶序列的引物设计更加复杂。将一个序列放大得太短最终可能会导致错误的结论，也许是由于基于不可靠的特征同源性数据集的系统发育推断的局限性。漆酶或 LMCOs 与许多细胞内和细胞外功能有关，我们

可能不确定所有检测到的序列是否真的编码细胞外木质素分解酶。

目前的挑战是怎样通过多种方法扩大检测到可证实的正确的胞外漆酶的比例，以便追踪和量化陆地生态系统中特别是真菌的活动。因此，在未来，必须考虑两点：（1）真菌基因组的完整序列有望成为筛选所有潜在漆酶的生态相关真菌的基础（2）迫切需要将产生细胞外酶的遗传潜能联系起来，并在（a）实验室和（b）自然条件下研究它们的表达。这些研究有望导致设计额外的引物从凋落物和土壤微生物联合体中收集更大的漆酶片段。此外在真菌实际面对木质素模型基质或在实验室和环境条件下，需要验证外酶本身。因此，需要一个非常全面反复过程。当然，这也会提高我们对其他真菌酶的理解，这些酶也可能存在于这些培养实验中。最后，我们可能会发现，到目前为止的研究中，我们可能已经收集到了自然条件下漆酶活动的有价值的信息，而且考虑到“组学”方法的迅速改进，我们有希望可以减轻一些疑虑并且扩展我们的知识。直接存在于亚基因组文库中的漆酶基因仍然要提高我们正确地处理它们作为细胞外活跃的木质素分解漆酶的能力。在这些情况下，我们能够做的越多，我们就越能最终提取出真正相关的基因，并估计它们对环境条件的反应，例如，通过使用专门设计的微阵列，这应该是走向高通量的最终踏脚石，跨景观分析相关的理解元素循环。

参考文献

- [1] Paul EA, Clark FE (1996) Soil microbiology and biochemistry. Academic, San Diego
- [2] Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Meth* 58:169–188. doi:10.1016/j.mimet.2004.04.006
- [3] 路瑶, 魏贤勇, 等. 木质素的结构研究与应用. *化学进展*, 2013, 025 (5) :838-858
- [4] Martínez ÁT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC (2005) Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8:195–204
- [5] Baldrian P (2006) Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30:215–242. doi:10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x
- [6] 吴坤, 张世敏, 朱显峰, 等. 木质素生物降解研究进展[J]. *河南农业大学学报*, 2000 (4): 46-45
- [7] Aneja MK, Sharma S, Fleischmann F, Stich S, Heller W, Bahnweg G, Munch JC, Schloter M (2006) Microbial colonization of beech and spruce litter—influence of decomposition site and plant litter species on the diversity of microbial communities. *Microb Ecol* 52:127–135. doi:10.1007/s00248-006-9006-3
- [8] Blagodatskaya E, Kuzyakov Y (2008) Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biol Fertil Soils* 45:115–131. doi:10.1007/s00374-008-0334-y
- [9] 魏建华, 宋艳茹. 木质素生物合成途径及调控的研究进展[J]. *植物学报:英文版*, 2001
- [10] Kirk TK, Farrell RL (1987) Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Ann Rev Microbiol* 41:465–505. doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.002341
- [11] Hedges JI, Mann DC (1979) The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochim Cosmochim Acta* 43:1803–1807. doi:10.1016/0016-7073(79)1101-1803\$02.00/0
- [12] 吴坤, 张世敏, 朱显峰, 等. 木质素生物降解研究进展[J]. *河南农业大学学报*, 2000 (4): 46-45
- [13] 魏建华, 宋艳茹. 木质素生物合成途径及调控的研究进展[J]. *植物学报:英文版*, 2001
- [14] Kirk TK, Farrell RL (1987) Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin.

- Ann Rev Microbiol 41:465–505. doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.002341
- [15] Martínez ÁT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC (2005) Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8:195–204
- [16] Yoshida H (1883) Chemistry of lacquer (urushi). *J Chem Soc Tokyo* 43:472–486
- [17] Burk RM, Cairney JWG (2002) Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 12:105–116. doi:10.1007/s00572-002-0162-0
- [18] 李琦, 赵东霞, 等. 不同来源重组漆酶的酶学特性[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2014 (38) :97
- [19] Martínez ÁT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC (2005) Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8:195–204
- [20] Di Nardo C, Cinquegrana A, Papa S, Fuggi A, Fioretto A (2004) Laccase and peroxidase isoenzymes during leaf litter decomposition of *Quercus ilex* in a Mediterranean ecosystem. *Soil Biol Biochem* 36:1539–1544. doi:10.1016/j.soilbio.2004.07.013
- [21] Finzi AC, Sinsabaugh RL, Long TM, Osgood MP (2006) Microbial community responses to atmospheric carbon dioxide enrichment in a warm-temperate forest. *Ecosystems* 9:215–226. doi:10.1007/s10021-005-0078-6
- [22] Cullings K, Ishkhanova G, Henson J (2008) Defoliation effects on enzyme activities of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus* in a *Pinus contorta* (lodgepole pine) stand in Yellowstone National Park. *Oecologia* 158:77–83. doi:10.1007/s00442-008-1119-6
- [23] 左斌, 王海斌, 等. 真菌漆酶的研究进展. *微生物学免疫学进展*, 2009 (1): 74-78
- [24] Koide K, Osono T, Takeda H (2005) Fungal succession and decomposition of *Camellia japonica* leaf litter. *Ecol Res* 20:599–609. doi:10.1007/s11284-005-0077-2
- [25] Kellner H, Luis P, Zimdars B, Kiesel B, Buscot F (2008) Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland Cambisol soil samples. *Soil Biol Biochem* 40:638–648. doi:10.1016/j.soilbio.2007.09.013
- [26] Carreiro MM, Sinsabaugh RL, Repert DA, Parkhurst DF (2000) Microbial enzyme shifts explain litter decay response to simulated nitrogen deposition. *Ecology* 81:2359–2365. doi:10.1890/0012-9658(2000)081[2359:MESELD]2.0.CO;2

[27] Keeler BL, Hobbie SE, Kellohh LE (2009) Effects of long-term nitrogen addition on microbial enzyme activity in eight forested and grassland sites: Implications for litter and soil organic matter decomposition. *Ecosystems* 12:1–15. doi:10.1007/s10021-008-9199-z

[28] Blackwood CB, Waldrop MP, Zak DR, Sinsabaugh RL (2007) Molecular analysis of fungal communities and laccase gene in decomposing litter reveals differences among forest types but no impact of nitrogen deposition. *Environ Microbiol* 9:1306–1316. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01250.x

致 谢

首先感谢于浩老师和王菲师姐对于本次实验研究的细心指导，在于老师和师姐的指导下本文才得以顺利完成。于老师对于本次课题研究的辛勤付出让我看到了一个科研工作者应有的态度，使我受益匪浅。在今后的学习研究工作中努力做到像于老师一样态度严谨，认真踏实，追求客观真实。

同时感谢学校我这次实验课题研究提供的实验室与仪器设备，感谢同一实验室的老师和同学的帮助，还要感谢各仪器实验室的老师对于实验后期数据测试提供的帮助。感谢老师和同学在此次实验中对我的帮助，感谢与我一同进行实验的同学。最后再一次向一直对我进行指导的于老师表达诚挚深切的感谢。

青岛农业大学

毕业论文(设计)任务书

学生姓名	张文龙	学号	20165192
专业年级及班级	生技(食用菌)1601	指导教师及职称	于浩(副教授)
毕业论文(设计)题目	漆酶多样性及其在生物修复中的应用研究现状		
选题来源	<input type="checkbox"/> 结合科研课题 课题名称: _____ <input type="checkbox"/> 生产实际或社会实际 <input checked="" type="checkbox"/> 其他		
选题性质	<input type="checkbox"/> 基础研究 <input type="checkbox"/> 应用研究 <input checked="" type="checkbox"/> 其他		
<p>主要内容和要求(明确设计具体任务、主要技术指标;明确对学生试验数据、试验手段和技术水平等的要求)</p> <p>资料、数据、技术水平等方面的要求:</p> <p>本次实验是研究在不同环境条件下漆酶产生的土壤微生物和漆酶活性对难降解残基降解的生态重要性,漆酶具有较低的氧化还原潜能和低的直接木质素分解效率,但它们的潜能可以通过介质增加,在所有木质素分解外酶中,漆酶是最适合进行深远的土壤分子生态学研究的酶,真菌基因组包含编码几种胞外酶的基因,这些酶通过破坏乙醚交联氧化裂解苯基丙烷单元。因此,甲氧基被脱甲基成酚,醛被氧化成酸,木质素结构中的芳香环被裂解。木质素降解/改性的主要酶是木质素过氧化物酶(LiP; EC 1.11.1.14)、锰过氧化物酶(MnP; EC 1.11.1.13)、多功能过氧化物酶(VP; EC 1.11.1.16)和漆酶(EC 1.10.3.2)。</p> <p>资料、数据、技术水平等方面的要求:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1、能够开展一般微生物学研究,具有一定的分析问题、解决问题能力。对得到的数据能够进行科学的统计,正确分析实验结果。 2、能够利用中国知网、万方、维普等资源,并能够进行熟练操作,对数据库的报纸期刊、学术论文、中文文献、外文文献等加以检索和利用。 3、检索并阅读相关文献 15 篇以上,其中外文文献 5 篇以上; 4、独立完成实验设计、开题报告; 5、论文的撰写应符合学院要求,数据真实可靠,层次清楚,结构合理,条理清晰,文字通顺;并能够进行深入分析。论文字数不少于 4000 字。 			

主要中文参考资料与外文资料（在确定了毕业论文（设计）题目和明确了要求后，指导教师应给学生提供一些相关资料和相关信息，或划定参考资料的范围，指导学生收集反映当前研究进展的近1—3年参考资料和文献。外文资料是指导老师根据选题情况明确学生需要阅读或翻译成中文的外文文献。）

[1] Mushroom as a product and their role in mycoremediation Shweta Kulshreshtha^{1*}, Nupur Mathur² and Pradeep Bhatnagar

[2] Mushrooms: from nutrition to mycoremediation Soumya Chatterjee¹ & Mukul K. Sarma¹ & Utsab Deb¹ & Georg Steinhauser² & Clemens Walther² & Dharmendra K. Gupta²

[3]食用菌漆酶及其对农药残留降解作用的研究进展 刘绍雄,李建英,刘春丽,王明月,罗孝坤,张微思 食药用菌,2018,26(04):218-221.

[4]Adler T (1977) Lignin chemistry—past, present and future. Wood Sci Technol 11:169–218. doi:10.1007/BF00365615

[5]Allison SD, Gartner T, Holland K, Weintraub M, Sinsabaugh RL(2007) Soil enzymes: linking proteomics and ecosystem process.In: Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL, Lipson DA, Mills AL,Stetzenbach LD (eds) Manual of environmental microbiology,3rd edn. ASM, Washington, pp 704–711

[6] Allison SD, LeBauer DS, Rosario Ofrecio M, Reyes R, Ta A-M, Tran TM(2009) Low levels of nitrogen addition stimulate decomposition by boreal forest fungi. Soil Biol Biochem 41:293–302. doi:10.1016/j.soilbio.2008.10.032

[7] Anderson IC, Cairney JWG (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. Environ Microbiol 6:769–779. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x

要求完成日期：2020年5月31日 指导教师签名：

接受任务日期：2020年3月20日 学生本人签名：

青岛农业大学

毕业论文(设计)开题报告

学生姓名	张文龙	学号	20165192
专业年级及班级	生技(食用菌)1601	指导教师及职称	于浩(副教授)
毕业论文(设计)题目	漆酶多样性及其在生物修复中的应用研究现状		
<p>文献综述(选题研究意义、国内外研究现状、主要参考文献等,不少于1000字)</p> <p>真菌基因组包含编码几种胞外酶的基因,这些酶通过破坏乙醚交联氧化裂解苯基丙烷单元。因此,甲氧基被脱甲基成酚,醛被氧化成酸,木质素结构中的芳香环被裂解。木质素降解/改性的主要酶是木质素过氧化物酶(LiP; EC 1.11.1.14)、锰过氧化物酶(MnP; EC 1.11.1.13)、多功能过氧化物酶(VP; EC 1.11.1.16)和漆酶(EC 1.10.3.2)。木质素分解过氧化物酶的催化性能表现为过氧化氢(H₂O₂)活化天然酶和氧化高氧化还原电位芳香族化合物。LiP降解非酚类(高达90%的聚合物),而MnP作用于各种酚类或非酚木质素单元生成Mn³⁺。第三类木聚过氧化物酶VP结合了LiP和MnP的催化性能。它能够将氧化Mn²⁺为Mn³⁺以及酚类和非酚类化合物。除了三种木质素分解过氧化物酶外,漆酶是研究最多的分解难降解植物化合物的酶。漆酶最早发现于日本漆树漆树,不久之后在真菌中发现,同时在大多数生物(植物、真菌、细菌和昆虫)中也发现了漆酶,漆酶在其中发挥着各种功能。许多作者报道真菌是漆酶产生菌中最重要的一类,并强调真菌漆酶对植物木质素的改性能力。除了对脱木素的影响外,真菌漆酶还参与了各种过程,包括竞争性相互作用、发病机制、子实体形成、无性发育过程中色素形成,其他SOM化合物的降解以及腐殖质部分的形成。生物化学上,漆酶(苯二酚/氧氧化还原酶)严格意义上属于作用于二酚和相关物质的氧化还原酶(根据NC-IUBMB;国际生物化学和分子生物学联合会命名委员会)。由于它们的催化性能与四个铜(铜)原子结合到活性位点有关,漆酶属于多铜氧化酶家族。它们催化分子氧(O₂)还原为水(H₂O),同时氧化底物(如单、二、多酚类物质、氨基酚、甲氧基酚或芳香胺),从而形成苯氧自由基,并通过自由基偶联、芳香环裂解或破坏C-C键聚合进一步反应。考虑到漆酶与木质素分解过氧化物酶相比具有较低的氧化还原电位,它们作用于酚木质素单元的初始氧化/裂解,酚木质素单元通常不到总聚合物的10%。漆酶必须与底物分子直接接触才能发挥作用,而木质素的植物细胞壁的紧密结构和酶的大小会阻碍漆酶的活性。然</p>			

而，大量的低分子量化合物被漆酶氧化为稳定的自由基，而稳定的自由基又是底物氧化的氧化还原介质。这些介体可以来自氧化木质素单元（外部）或直接来自真菌代谢（内部），并且能够从真菌菌丝体迁移到漆酶本身无法接近的紧密木质纤维素复合物中。

参考文献

- [1]Adler T (1977) Lignin chemistry—past, present and future. *Wood Sci Technol* 11:169–218. doi:10.1007/BF00365615
- [2]Allison SD, Gartner T, Holland K, Weintraub M, Sinsabaugh RL(2007) Soil enzymes: linking proteomics and ecosystem process. In: Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL, Lipson DA, Mills AL, Stetzenbach LD (eds) *Manual of environmental microbiology*, 3rd edn. ASM, Washington, pp 704–711
- [3]Allison SD, LeBauer DS, Rosario Ofrecio M, Reyes R, Ta A-M, Tran TM(2009) Low levels of nitrogen addition stimulate decomposition by boreal forest fungi. *Soil Biol Biochem* 41:293–302. doi:10.1016/j.soilbio.2008.10.032
- [4]Anderson IC, Cairney JWG (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ Microbiol* 6:769–779. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x
- [5]Aneja MK, Sharma S, Fleischmann F, Stich S, Heller W, Bahnweg G, Munch JC, Schloter M (2006) Microbial colonization of beech and spruce litter—influence of decomposition site and plant litter species on the diversity of microbial communities. *Microb Ecol* 52:127–135. doi:10.1007/s00248-006-9006-3
- [6]Bakken LR, Frostegard A (2006) Nucleic acid extraction from soil. In: Nannipieri P, Smalla K (eds) *Soil biology. Nucleic acids and proteins in soil*, vol 8. Springer, Heidelberg, pp 49–73

研究方案（研究目的、内容、方法、预期成果、条件保障等）

1.研究内容

综述了在不同环境条件下漆酶产生的土壤微生物和漆酶活性对难降解残基降解的生态重要性。难降解的植物化合物如芳香族聚合物是枯枝落叶分解的瓶颈。在难降解的天然聚合物中，木质素是植物凋落物中含量第二丰富的成分。在这些植物残体的降解过程中涉及到大量的胞外酶，其中木质素分解外酶，即木质素和锰过氧化物酶以及漆酶，到目前为止都是主要的研究对象。在所有木质素分解外酶中，漆酶是最适合进行深远的土壤分子生态研究的酶。除了在土壤微生物中频繁出现外，漆酶编码基因序列能够设计出与广泛类群相兼容的引物。

2.研究方法：

利用知网、万方等数据库平台下载相关文献仔细阅读并进行总结

3.预期成果

完成毕业设计（论文）

4.条件保障

能够利用中国知网、万方、维普等资源，并能够进行熟练操作，对数据库的报纸期刊、学术论文、中文文献、外文文献等加以检索和利用。检索并阅读相关文献 15 篇以上，其中外文文献 5 篇以上；

进程计划（各研究环节的时间安排、实施进度、完成程度等）

2020.3.11-5.15：查阅并阅读相关文献

2020.5.16-5.25：撰写毕业论文

2020.5.26-6.2：准备 PPT、准备答辩

指导教师意见

指导教师签字：

毕业论文（设计）工作组意见

毕业论文（设计）工作组
成员签名

论证地点:生科院资料室 C305

论证日期:2020 年 3 月 20 日

青岛农业大学

毕业论文(设计) 成绩评定表

学生姓名	张文龙	学 号	20165192
专业年级及班级	生技(食用菌)1601	指导教师及职称	于浩(副教授)
毕业论文(设计)题目	漆酶多样性及其在生物修复中的应用研究现状		
<p>毕业论文(设计)摘要: 降解难降解多酚类物质残留木质素是陆地生态系统元素转化的瓶颈。因此,考虑到土壤作为二氧化碳地下来源的生态作用,人们对理解其潜在机制和动力学有很大兴趣。本文综述了在不同环境条件下漆酶产生的土壤微生物和漆酶活性对难降解残基降解的生态重要性。我们综合并讨论了以往经典的生态学、酶生态学和分子生态学研究的结果,指出基因检测、酶活性和底物降解性之间的差异。我们指出了当前研究的主要障碍,并概述了在土壤生态系统中真菌漆酶活性的研究进展。</p>			
关键词: 木质素 漆酶 土壤微生物 难降解物质			
成 绩	指导教师成绩 ()	答辩成绩 ()	总评分 ()
签 字	指导老师:	答辩小组成员:	计分人:

注: 指导教师成绩: 答辩成绩=2: 8