

响应面法优化单酶复配酶解辐照玉米秸秆的研究

滕彦洪¹, 胡秋龙^{2,3}, 苏小军^{2,3}, 李会东⁴, 金元昌^{1,5*} (1. 湖南科技大学生命科学学院, 湖南湘潭 411201; 2. 湖南农业大学生物质醇类燃料湖南省工程实验室, 湖南长沙 410128; 3. 湖南农业大学湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 湖南长沙 410128; 4. 内蒙古工业大学, 内蒙古呼和浩特市 010051; 5. 重金属污染土壤生态修复与安全利用湖南省高校重点实验室, 湖南湘潭 411201)

摘要 [目的] 优化单酶复配酶解纤维素的条件。[方法] 以经 1 200 kGy ⁶⁰Co γ -射线辐照处理过的玉米秸秆为原料, 采用响应面分析法, 对外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶等酶进行优化。[结果] 4 个因素对酶解产还原糖的影响主次顺序依次为木聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶。得到最优酶添加量为外切葡聚糖酶 1.07 U/g、内切葡聚糖酶 31.53 U/g、 β -葡萄糖苷酶 20.81 U/g 和木聚糖酶 81.96 U/g。在上述条件下, 试验验证还原糖产量 372.624 mg/g 与预测值能够很好地吻合。[结论] 该中心组合设计响应面优化单酶复配酶解辐照玉米秸秆的方法可靠, 可为单酶复配提供参考。

关键词 γ -射线辐照; 响应面法; 酶解; 葡萄糖
中图分类号 S216 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)10-0001-04

Optimization of Enzyme Complex Formulation of Irradiation Corn Straw by Response Surface Method
TENG Yan-qi¹, HU Qiu-long^{2,3}, SU Xiao-jun^{2,3}, JIN Yuan-chang^{1,5*} et al (1. College of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan, Hunan 411201; 2. Hunan Engineering Laboratory for Alcohol Fuels from Biomass, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128; 3. Hunan Collaborative Innovation for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128; 5. Key Laboratory of Ecological Remediation and Safe Utilization of Heavy Metal-polluted Soils, College of Hunan Province, Xiangtan, Hunan 411201)

Abstract [Objective] To study the optimal ratio of enzyme complex formulation. [Method] 1 200 kGy ⁶⁰Co γ -ray irradiation corn straw as raw material, the response surface methodology was applied for analyzing the cellobiohydrolase, the endoglucanase, the β -glucanase and the xylanase. [Result] The reducing sugar content was extremely significantly by xylanase dosage but not significantly impacted by cellobiohydrolase, β -glucanase and endoglucanase. The optimum conditions for supplemental levels were found to be hydrolysis at cellobiohydrolase ratio of 1.07 U/g, endoglucanase ratio of 31.53 U/g, β -glucanase ratio of 20.81 U/g and xylanase ratio of 81.96 U/g. The reducing sugar content under these conditions was 372.624 mg/g than before optimization and basically according with the model prediction value. [Conclusion] The optimization of enzyme complex formulation of irradiation corn straw by central composite design and response surface method is reliable, and it can provide reference for the complex of single enzyme.

Key words γ -ray irradiation; Response surface method; Hydrolysis; Glucose

乙醇是生物液体能源的主要形式, 清洁可再生, 是化石燃料的理想替代品^[1-2]。在木质纤维素通过生物化学技术转化为乙醇及丁醇等燃料和高附加值的化学品的过程, 一般包括预处理、水解、发酵、产物分离等操作部分, 其中纤维素水解为可发酵糖起着关键性的作用^[3-4]。纤维素的水解主要有化学法和酶法, 从环保的角度出发, 纤维素酶解作用是一条木质纤维素被彻底降解而不会对环境造成污染的有效途径, 并且酶解反应有着糖损耗低、副产物少、条件温和等特点, 因此备受关注^[5]。

纤维素结构的复杂性决定了任何一种单一的酶都难以高效地水解它, 能水解天然纤维素的纤维素酶是一个复杂的多酶体系。纤维素酶是生物降解纤维素生成葡萄糖一组酶的总称^[6], 由内切葡聚糖酶(也称 Cx 酶)、外切葡聚糖酶(也称 C1 酶)、 β -葡萄糖苷酶(也称 CB 酶)3 个主要成分组成的诱导型复合酶系。当 3 个主要成分的活性比例适当时, 就能完成对纤维素的降解^[7-8]。木聚糖酶是一类木聚糖降解酶系, 属于水解酶, 主要用来降解含量仅次于纤维素的半纤

维素^[9]。不同的单酶之间都存在着协同作用, 研究它们之间的协同作用, 有效地添加提高酶解率的酶, 减少抑制酶解的酶, 可提高酶解效率^[10-12]。 γ -射线辐照预处理是一种物理处理法, 不需要高温高压等极端条件, 副产物少, 污染少, 能够有效提高酶解效率^[13]。有研究报道, γ -射线辐照预处理稻草、稻壳、麦秆、玉米秆、木屑等原料可有效提高酶的可及度, 从而提高酶解产糖率^[14]。

响应面分析法是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法, 通过局部试验回归拟合因素与结果间的全局函数关系而得到准确有效的结论, 能在整个考察区域上确定各因素的最佳组合及最优响应值^[15]。响应面分析法主要包括全因素设计、部分因素设计、中心组合设计和拉丁超立方设计等, 最常用的是中心组合试验设计(CCD)和 Box-Behnken 试验设计(BBD)^[16]。CCD 是多因素 5 水平的试验设计, 因素水平适用广泛, BBD 一般适用于 3 水平试验设计。笔者在纤维素辐照的基础上, 通过单因素试验和响应面试验系统地研究了外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶复配对酶解辐照玉米秸秆的影响, 探讨了最优添加量, 以期降低纤维素酶成本, 优化酶系结构和纤维素的有效酶解提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料。玉米秸秆由湖南农业大学教学科研基地

基金项目 湖南省科技重大专项(2015NK1001-4); 湖南省教育厅重点项目(15A067); 生物工程专业省级校企合作人才培养示范基地项目(G145813)。

作者简介 滕彦洪(1991—), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 研究方向: 生物质能源。* 通讯作者, 硕士生导师, 从事微生物资源与利用研究。

收稿日期 2017-01-13

提供。

1.1.2 试剂。冰醋酸、醋酸钠、3,5-二硝基水杨酸、氢氧化钠、无水亚硫酸钠、四水合酒石酸钾钠、苯酚均为国药集团化学试剂有限公司产品,所有试剂均为分析纯。内切葡聚糖酶、木聚糖酶、β-葡萄糖苷酶、外切葡聚糖酶均由 Sigma 试剂有限公司提供,酶活分别为 2.00、2.50、6.85、0.13 U/mg。

1.1.3 仪器。Fz102 微型植物粉碎机,天津市泰娇特仪器有限公司;ZHWHY-2012C 恒温培养振荡器,上海天域分析仪器制造有限公司;R0704135 可见分光光度计,上海尤尼克试验仪器有限公司。LD5-2A 低速离心机,上海精密实验设备有限公司。

1.2 试验方法 收集田间干玉米秸秆晒干后,剪成 3 cm 左右小段,在室温下用⁶⁰Co γ-射线进行辐照预处理,辐照剂量率为 2 kGy/h,处理计量为 1 200 kGy/h。经辐照后粉碎过 20 目筛,放入密封袋内保存。经辐照处理后,玉米秸秆中的纤维素、半纤维素、木质素分别由 40.80%、30.85%、15.70% 变为 30.93%、17.26%、15.32%。辐照对玉米秸秆的纤维素和

半纤维具有降解作用,对木质素降解影响不大。称取 1 g 辐照预处理玉米秸秆置于 50 mL 锥形瓶中,加入适量酶和 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 4.8),使其固液比为 1:20,充分摇匀,将上述三角瓶放入恒温培养箱中,在转速 130 r/min、温度 50 ℃、pH 4.8、反应时间 72 h 的条件下进行一系列试验。反应结束后,沸水浴终止反应,离心取上清液,上清液经适当稀释后用 DNS 法测定还原糖浓度,用离子色谱法测定葡萄糖浓度。

1.2.1 不同酶酶解的单因素试验。研究不同单酶酶解辐照玉米秸秆对还原糖浓度的影响。分别用不同浓度的外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶、β-葡萄糖苷酶、木聚糖酶在相同条件下对辐照玉米秸秆进行酶解,用 DNS 法测定还原糖含量。

1.2.2 响应面试验^[17]。在单因素试验的基础上,应用中心组合试验设计,以外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶、β-葡萄糖苷酶、木聚糖酶的酶添加量为因素,选用中心组合模型 CCD,以葡萄糖含量为响应值,设计 4 因素 5 水平共 30 个响应面分析试验,试验因素与水平见表 1。

表 1 中心组合响应面法试验因素与水平
Table 1 Factors and levels of central composite design

因素 Factors	名称 Name	水平 Level				
		-2	-1	0	1	2
A	内切葡聚糖酶	16.00	24.00	32.00	40.00	48.00
B	β-葡萄糖苷酶	6.85	13.70	20.55	27.40	34.25
C	外切葡聚糖酶	0.39	0.78	1.17	1.56	1.95
D	木聚糖酶	65.00	75.00	85.00	95.00	105.00

1.2.3 还原糖测定。采用 3,5-二硝基水杨酸法^[18]。

2 结果与分析

2.1 不同酶解的单因素试验结果

2.1.1 外切葡聚糖酶单独酶解辐照玉米秸秆。由图 1 可知,外切葡聚糖酶添加量在 1.17 U/g 之前,随着外切葡聚糖酶添加量的增加,还原糖含量随之增加,之后趋于缓慢,且外切葡聚糖酶添加量对酶解的还原糖含量影响不大。

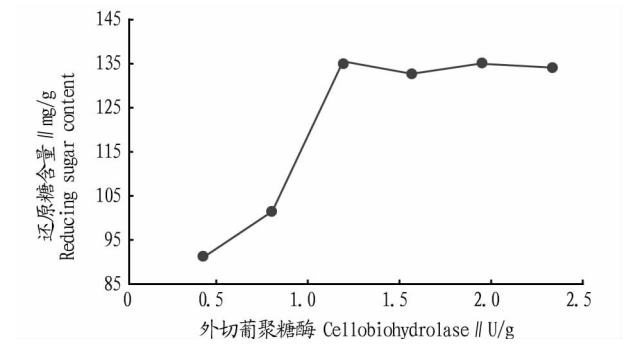


图 1 外切葡聚糖酶对酶解效果的影响

Fig.1 Influence of the cellobiohydrolase on the hydrolysis

2.1.2 内切葡聚糖酶单独酶解辐照玉米秸秆。由图 2 可知,当内切葡聚糖酶添加量在 16.00~32.00 U/g 时,随着添加量的增加还原糖含量也增加,内切葡聚糖酶添加量达 32.00 U/g 时还原糖含量最高,内切葡聚糖酶添加量为 40.00 U/g 时还原糖含量比内切葡聚糖酶为 32.00 U/g 时相对减

少,继续增加内切葡聚糖酶添加量,还原糖含量反而有下降的趋势。

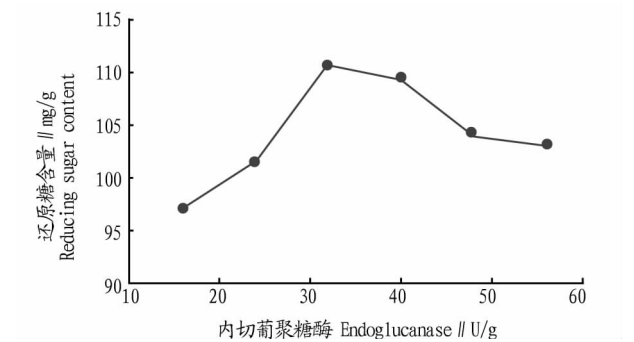


图 2 内切葡聚糖酶对酶解效果的影响

Fig.2 Influence of the endoglucanase on the hydrolysis

2.1.3 β-葡萄糖苷酶单独酶解辐照玉米秸秆。由图 3 可知,当 β-葡萄糖苷酶添加量为 27.40 U/g 时,还原糖含量达到最大;此后,继续增加 β-葡萄糖苷酶量,还原糖含量趋于平缓。根据分子络合学说,由于底物与酶分子反应过程中存在某个平衡点,当酶量较低时,酶分子与底物可以充分结合;当继续增加酶量,底物结合酶的程度会增大,当反应达到饱和后,酶活性趋于稳定。因此,并不是酶量越大越利于酶解效果的发挥,对于一定的底物来说,存在一个最佳酶用量^[19]。

2.1.4 木聚糖酶单独酶解辐照玉米秸秆。由图 4 可知,当木聚糖酶添加量在 65.00~95.00 U/g 时,随着添加量的增加

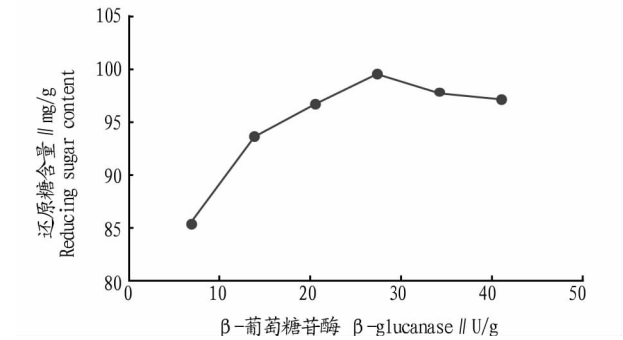


图3 β-葡萄糖苷酶对酶解效果的影响

Fig.3 Influence of the β-glucanase on the hydrolysis
还原糖含量也增加,木聚糖酶添加量达 95.00 U/g 时还原糖含量最高,木聚糖酶添加量为 105.00 U/g 时还原糖含量比木聚糖酶添加量为 95.00 U/g 时相对减少,继续增加木聚糖酶量,还原糖含量反而有下降的趋势。

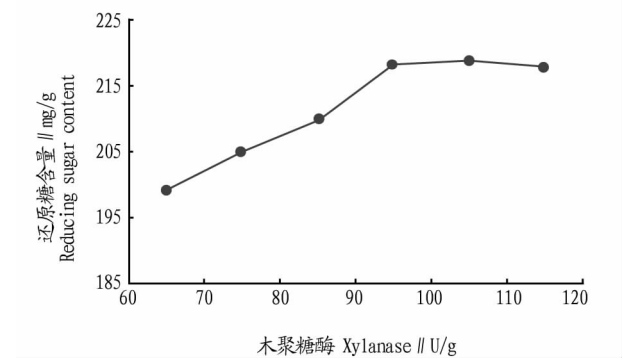


图4 木聚糖酶对酶解效果的影响

Fig.4 Influence of the xylanase on the hydrolysis
2.2 响应面试验结果
2.2.1 响应面试验结果与模型分析。响应面试验结果见表 2。对试验结果二次拟合,得出还原糖含量与各因素关系方程:
 $y = 367.19 - 1.22A - 2.29B - 3.03C - 3.45D - 6.28AB - 0.082AC - 1.55AD - 5.19BC - 3.55BD + 3.29CD - 8.32A^2 - 6.25B^2 - 8.35C^2 - 7.10D^2$ 。回归方程中各变量对响应值影响的显著性用 F 检验判断, P 值越小,则响应面变量的显著程度越高, $P < 0.01$ 时影响极显著, $P < 0.05$ 时影响显著。

$P > F$, P 值越小说明相应因素显著性越好,酶解还原糖含量的预测值与实际值拟合情况见图 5,显示预测值和实际值拟合良好。该模型回归 $P < 0.001$,说明模型回归显著性可靠。失拟项 $P(0.4622) > 0.05$ 为不显著项,失拟项有统计学意义,且该模型决定系数(R^2)为 0.9595,校正系数(R^2_{Adj})为 0.9217,说明该模型拟合良好,自变量与响应值之间线性关系显著,试验误差较小。方差分析显示,4 个因素的 F 值的大小顺序为 D、C、B、A,得到影响响应值的酶大小次序为木聚糖酶、外切葡聚糖酶、β-葡萄糖苷酶、内切葡聚糖酶。

2.2.2 因素间的交互影响。采用 DX8 软件分析响应面数据,直观地给出了在 2 个因素的水平固定在中心点的情况下其余 2 个因素交互效应的响应面的 3D 分析图。内切葡聚糖酶与 β-葡萄糖苷酶添加量对酶解还原糖含量的交互影响

如图 6 所示。当固定外切葡聚糖酶和木聚糖酶添加量时,在 β-葡萄糖苷酶和内切酶添加量较低时,还原糖含量随 2 种酶添加量的增加而增加,可能是玉米秸秆中的半纤维素被木聚糖酶降解,其对纤维素的包覆作用减弱,纤维素酶和纤维素液固异相反应的空间位阻降低,更多的纤维素被暴露出来,加快了内切酶和 β-葡萄糖苷酶与底物的吸附、扩散速度和酶解速度,进而提高了酶解率。当添加量达到一定值时,随酶添加量的增加,酶解还原糖含量缓慢降低,可能是 2 种酶吸附在纤维素表面,形成竞争位点,阻碍了酶的水解程度。当内切葡聚糖酶添加量在 30.00 ~ 32.00 U/g、β-葡萄糖苷酶添加量在 18.00 ~ 21.00 U/g 时,酶解还原糖含量逐渐增加并达到极大值。

表2 中心组合设计试验结果

Table 2 Program and experimental results of central composite design

试验号 Test No.	因素 Factors				还原糖含量 Reducing sugar content // mg/g
	A	B	C	D	
1	-1	-1	-1	-1	339.200
2	1	-1	-1	-1	345.728
3	-1	-1	-1	1	355.456
4	1	1	-1	-1	346.880
5	-1	-1	1	-1	333.312
6	1	-1	1	-1	347.136
7	-1	1	1	-1	337.152
8	1	1	1	-1	323.328
9	-1	-1	-1	1	330.240
10	1	-1	-1	1	338.688
11	-1	1	-1	1	341.120
12	1	1	-1	1	320.954
13	-1	-1	1	1	343.936
14	1	-1	1	1	350.992
15	-1	1	1	1	332.288
16	1	1	1	1	305.152
17	-2	0	0	0	333.824
18	2	0	0	0	333.568
19	0	-2	0	0	340.224
20	0	2	0	0	343.680
21	0	0	-2	0	341.760
22	0	0	2	0	325.376
23	0	0	0	-2	344.320
24	0	0	0	2	332.800
25	0	0	0	0	263.264
26	0	0	0	0	371.328
27	0	0	0	0	364.160
28	0	0	0	0	363.136
29	0	0	0	0	371.584
30	0	0	0	0	369.664

外切葡聚糖酶和 β-葡萄糖苷酶对还原糖含量的交互影响如图 7 所示。当固定内切葡聚糖酶和木聚糖酶的添加量,逐渐增大外切葡聚糖酶和 β-葡萄糖苷酶的添加量时,酶解还原糖含量会随之增大,但当这 2 个因素的添加量增加到一定程度时,酶解还原糖含量开始缓慢下降。外切葡聚糖酶与 β-葡萄糖苷酶存在协同作用。当外切葡聚糖酶添加量在 1.00 ~ 1.17 U/g、β-葡萄糖苷酶添加量在 18.00 ~ 21.00 U/g 时,酶解还原糖含量逐渐增大并达到最大值。

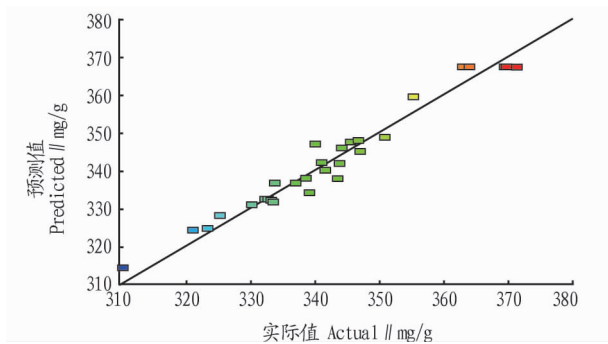


图5 还原糖含量的预测值和实际值的对应关系

Fig.5 Plot of model-predicted values against experimental values of the total reducing sugar

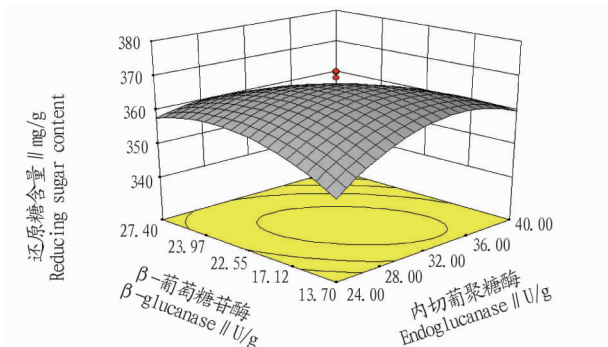


图6 内切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶对还原糖含量的交互影响

Fig.6 Response surface of the effect of endoglucanase and β -glucanase on total glucose

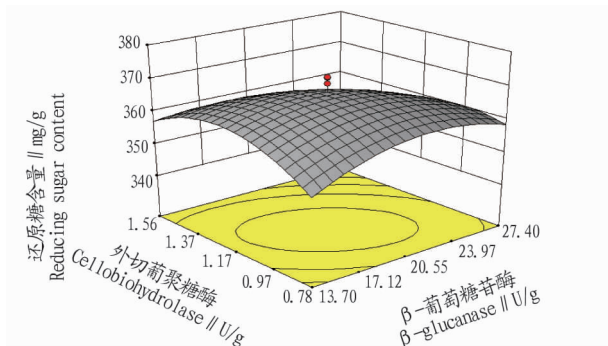


图7 外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶对还原糖含量的交互影响

Fig.7 Response surface of the effect of cellobiohydrolase and β -glucanase on total glucose

2.3 最优条件预测及模型验证 根据响应面试验结果和回归方程,利用 Design-Expert 软件预测的最优条件,酶解还原糖最高值为 368.092 mg/g,此时 4 个因素的取值如下:外切葡聚糖酶添加量为 1.07 U/g,内切葡聚糖酶添加量为 31.53 U/g, β -葡萄糖苷酶添加量为 20.81 U/g,木聚糖酶添加量为 81.96 U/g。

为了验证模型预测的准确性,在最佳酶添加量的条件下对辐照后的玉米秸秆粉末进行 3 次水平试验,实际酶解还原糖含量为 372.624 mg/g,与模型预测值相近。

3 结论与讨论

利用响应面进行优化,各因素对酶解产还原糖的影响从大到小依次为木聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、内

切葡聚糖酶。得到最佳酶解添加量如下:外切葡聚糖酶添加量为 1.07 U/g,内切葡聚糖酶添加量为 31.53 U/g, β -葡萄糖苷酶添加量为 20.81 U/g,木聚糖酶添加量为 81.96 U/g。试验验证的实际值与模型预测值基本吻合,说明该模型真实可靠。研究结果表明,该中心组合试验设计响应面优化单酶复配酶解辐照玉米秸秆的方法可为单酶复配提供参考。

纤维素酶是由多种组分组成的复合酶系,各组间如何发挥作用,目前普遍认可的酶解机理是协同作用模型。在协同降解过程中首先由 Cx 酶在纤维素的内部起作用,在纤维素的非结晶部位进行切割产生新的末端,然后由 C1 酶以纤维素二糖为单位从末端进行水解,再由 CB 酶将纤维素二糖水解为葡萄糖^[20-21]。纤维素酶各组间的比例及彼此相互协同作用对整个酶解过程影响较大,纤维素多组分协同作用比单一组分的水解效果要显著。

纤维素乙醇生产过程中酶法糖化工段的关键是降低纤维素酶的生产成本、投加量和提高酶解效率。多酶复配技术的目的是优化不同酶添加量及酶系相互协调作用来调控酶系的比例,使酶解更加充分进而减少酶用量并降低成本。该研究通过单因素试验和响应面试验,系统地研究了外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶进行复配对酶解的影响,得出最优添加量,指导实际生产应用。不同酶复配是增加生物质酶解效率的重要方法,经过复配酶间的相互协调作用明显增强。

参考文献

- [1] CEOTTO E. Grasslands for bioenergy production: A review[J]. Agron Sustain Dev, 2008, 28(1): 47-55.
- [2] LYND L R, WEIMER P J, VAN ZYL W H, et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2002, 66(3): 506-577.
- [3] ZHANG L, WANG X Q, RUAN Z H, et al. Fungal cellulase/xylanase production and corresponding hydrolysis using pretreated corn stover as substrates[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(2): 1045-1054.
- [4] LYND L R, LASER M S, BRANDSBY D, et al. How biotech can transform biofuels[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(2): 169-172.
- [5] 曹长海, 张全, 关浩, 等. 提高木质纤维素酶解糖化效率的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(8): 126-136.
- [6] KING K W, VESSAL M L. Enzymes of the cellulase complex[J]. Advan Chem Ser, 1969, 25(2): 7-25.
- [7] HE R L, CAI P L, WU G H, et al. Mutagenesis and evaluation of cellulase properties and cellulose hydrolysis of *Talaromyces piceus*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2015, 31(11): 1811-1819.
- [8] BAGEWADI Z K, MULLA S I, SHOUCHE Y, et al. Xylanase production from *Penicillium citrinum* isolate HZN13 using response surface methodology and characterization of immobilized xylanase on glutaraldehyde-activated calcium-alginate beads[J]. 3 Biotech, 2016, 6(2): 4-18.
- [9] GAO D H, CHUNDAWATS P S, KRISHNAN C, et al. Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover[J]. Bioresource technology, 2010, 101(8): 2770-2781.
- [10] QING Q, WYMAN C E. Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover[J]. Biotechnology for biofuels, 2011, 4: 18.
- [11] 王奇, 王林凤, 闫德冉, 等. 玉米秸秆酶水解过程中的酶复配条件优化[J]. 生物技术通报, 2016, 32(3): 171-177.
- [12] KHAN F, AHMAD S R, KRONFLI E. Gamma-radiation induced changes in the physical and chemical properties of lignocellulose[J]. Biomacromolecules, 2006, 7(8): 2303-2309.
- [13] KUMAKURA M, KAETSU I. Radiation-induced decomposition and enzymatic hydrolysis of cellulose[J]. Biotechnology and bioengineering, 1978, 20(8): 1309-1315.

(下转第 47 页)

缺乏统筹性,对于同一品种在几个典型地理位置、气候条件下栽种的效果进行研究^[31],可以为引种工作提供指导;③对栽培品种和野生草莓的研究相对独立,不但需要把栽培品种和野生草莓并列在一起研究^[22],而且需要利用野生草莓与栽培品种进行种间回交,对筛选的后代进行性状鉴定^[32];④分子标记应用研究不足,国外已经开发高通量芯片以服务于草莓分子标记辅助育种^[33],而我国的分子标记研究多为亲缘关系鉴定和多样性分析,在农艺性状、果实经济性状的分子标记研究方面相对落后,可借鉴栽培草莓的日中性遗传图谱构建^[34]、黄萎病相关 QTL 定位等研究^[35]。

综上所述,我国草莓的育种研究需要在传统育种手段上结合诱变育种、生物技术育种等手段,加速选育草莓品种的进程。与此同时,对草莓种质资源的深层鉴定需要加强,开发有效便捷的分子标记进行亲缘关系、品种起源、演化过程的研究,构建草莓农艺性状、果实经济性状等相关质量性状、数量性状基因的分子标记图,为选育优质、高产、早熟、大果、抗病草莓品种的研究工作提供理论依据,便于针对性地运用野生草莓种质资源改造草莓的遗传性。

参考文献

[1] 陈洁,刘田田,徐雪平,等.草莓品种资源和遗传育种研究进展[J].福建农业,2014(9):31-33.

[2] 朱薇,杨明挚.中国野生草莓资源研究及利用进展[J].中国南方果树,2012,41(4):50-52.

[3] 李先文,马世民,袁正仿.中国草莓的种质资源和良种培育[J].信阳农业高等专科学校学报,2011,21(4):112-114.

[4] 邹盼红.草莓种质资源研究进展[J].中国园艺文摘,2016,32(5):29-31.

[5] 和秀云,和加卫,苏泽春,等.灰色关联度对草莓品种的综合评估[J].中国农学通报,2015,31(21):259-263.

[6] 胡佳羽,史文景,罗友进,等.10个草莓品种在重庆城郊大棚栽培的比较研究[J].安徽农业科学,2015,43(29):100-102.

[7] 李洪雯,刘建军,陈克玲,等.11个意大利草莓品种(系)在四川的表现[J].中国果树,2010(3):35-38.

[8] 郑小华,郑晓琴,罗丹,等.双流地区草莓新品种“坎东嘎”和“叙利亚”引种研究[J].资源开发与市场,2016,32(4):473-477.

[9] 糜林,陈秀娟,李金凤,等.4个草莓品种在江苏句容大棚栽培比较试验[J].中国果树,2011(6):35-38.

[10] 李红伟,于泳泽,张乐,等.5个草莓品种的引种表现[J].落叶果树,2012(4):34-36.

[11] 张慧敏,张林,黄书琴.华南地区适用型草莓品种的筛选[C]//草莓研究进展(三).北京:中国农业出版社,2009:53-60.

[12] 董静,张运涛,王桂霞,等.日光温室条件下4份森林草莓(*Fragaria vesca*)种质资源主要植株、果实性状比较[C]//草莓研究进展(IV).北京:中国农业出版社,2015.

[13] 杨爽,李海鹏,杨培鑑,等.不同草莓品种对白粉病的抗性调查[J].北方园艺,2014(10):104-106.

[14] 曾蓉,张繁琴,高清华,等.草莓抗炭疽病的新种质资源筛选[J].上

海交通大学学报(农业科学版),2011,29(4):28-31.

[15] 黄金凤.野生草莓种质资源对胶孢炭疽菌的抗性研究[D].南京:南京农业大学,2012.

[16] 王静,赵密珍,于红梅,等.25种草莓种质耐低温弱光性研究[J].江苏农业科学,2013,41(12):164-166.

[17] 杨凤翔.不同草莓品种抗寒性的综合评价[D].兰州:甘肃农业大学,2010.

[18] 罗娅,唐勇,冯珊,等.6个草莓品种营养品质与抗氧化能力研究[J].食品科学,2011,32(7):52-56.

[19] 冀芦沙,肖庆振,于守超,等.山东境内11个草莓品种的品质及遗传特性分析[J].甘肃农业大学学报,2012,47(2):39-44.

[20] 沙春艳.5个草莓品种果实品质的比较研究[J].中国林副特产,2012(2):37-39.

[21] 李莉,杨雷,杨莉,等.应用灰色关联分析法综合评价草莓种质资源[J].河北农业科学,2008,12(4):18-19.

[22] 金亮,阮松林,忻雅,等.森林草莓与栽培草莓体外抗氧化能力比较[J].核农学报,2015,29(1):79-86.

[23] 张运涛,王桂霞,董静,等.33个欧美草莓品种果实挥发性物质的分析[J].果树学报,2011(3):438-442.

[24] 王建辉,李洪雯,刘建军.利用野生种质进行草莓香味改良研究进展[J].中国农学通报,2016,32(22):189-193.

[25] 陈琼娥,钟凤林,潘东明,等.草莓分子标记技术研究进展[J].亚热带农业研究,2011,7(1):64-67.

[26] 王静,赵密珍,于红梅,等.草莓 EST-SSR 标记的开发与应用[J].果树学报,2011,28(4):721-726.

[27] 韩柏明,赵密珍,王静,等.基于 SSR 标记的草莓品种亲缘关系分析[J].植物遗传资源学报,2013,14(3):428-433.

[28] MENG F J, LIU L, PENG M, et al. Genetic diversity and population structure analysis wild strawberry (*Fragaria nubicola* L.) from Motuo in Tibet Plateau based on simple sequence repeats (SSRs)[J]. Biochemical systematics & ecology, 2015,63(2):113-118.

[29] 花秀凤,钟凤林,林义章,等.草莓种质资源遗传多样性 ISSR 分析[J].福建农业学报,2013,28(3):232-236.

[30] WEI L L, ZHU S D, JIA Q M, et al. Optimization of SRAP reaction system and selection of primers for strawberry[J]. Chinese agricultural science bulletin, 2014,30(25):159-165.

[31] COCCO C, MAGNANI S, MALTONI M L, et al. Effects of site and genotype on strawberry fruits quality traits and bioactive compounds[J]. Journal of berry research, 2015,5(3):145-155.

[32] DIAMANTI J, MAZZONI L, BALDUCCI F, et al. Use of wild genotypes in breeding program increases strawberry fruit sensorial and nutritional quality[J]. Journal of agricultural & food chemistry, 2014,62(18):3944-3953.

[33] BASSIL N V, DAVIS T M, ZHANG H, et al. Development and preliminary evaluation of a 90 K Axiom® SNP array for the allo-octoploid cultivated strawberry *Fragaria × ananassa*[J]. BMC genomics, 2015,16(1):1-30.

[34] CASTRO P, BUSHAKRA J M, STEWART P, et al. Genetic mapping of day-neutrality in cultivated strawberry[J]. Molecular breeding, 2015,35(2):1-16.

[35] ANTANAVICIUTE L, ŠURBANOVSKI N, HARRISON N, et al. Mapping QTL associated with *Verticillium dahliae* resistance in the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*)[J]. Horticulture research, 2015(2):1-8.

(上接第4页)

[14] 宁欣强,王远亮,曾国明.响应面法优化水/醇处理后汽爆玉米秸秆酶解[J].精细化工,2011,28(6):539-543.

[15] 张艳,李永哲.响应面法及其在药学领域中的应用[J].吉林化工学院学报,2012,29(7):20-26.

[16] ZHAO W Z, YU Z P, LIU J B, et al. Optimized extraction of polysaccharides from corn silk by pulsed electric field and response surface quadratic design[J]. J Sci Food Agric, 2011,91(12):2201-2209.

[17] 范玲,同建庆,郑春霞,等.3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法在分析棉

花纤维还原糖含量中的应用研究[J].棉花学报,1996,8(3):151-154.

[18] 石亚中,方娇龙,钱时权,等.响应曲面法优化纤维素酶酶解提取工艺[J].食品科学,2013,34(40):75-79.

[19] 王超,章超桦.酶解纤维素类物质生产燃料酒精的研究进展[J].纤维素科学与技术,2003,11(4):52-59.

[20] 张森翔,伊小燕,龚志伟,等.纤维素酶降解秸秆特性及其基因工程研究进展[J].生物技术通报,2015,31(5):20-26.