

白蚁菌圃中产纤维素酶菌株的鉴定与酶活研究

韦张其, 王洁慧, 刘国庆*, 何程实, 李春辉, 孙苗苗, 吴健鑫 (合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230601)

摘要 [目的]提高生物质秸秆降解速度,能够更加充分地利用微生物资源。[方法]以黑翅土白蚁菌圃为菌源,采用平板稀释法初筛分离得到降解纤维素的目标菌株,再复筛得到最优菌株 FUN-ce4,然后对其进行 ITS 序列分析鉴定以及酶稳定性研究。[结果]菌株 FUN-4 归属于栓孔菌属(*Trametes*)。经对酶活性研究,菌株 FUN-4 在温度为 60 ℃、pH 为 4、发酵时间为 6 d 时酶活相对较高;而温度为 40 ℃、最适 pH 为 5 时酶活相对较稳定。[结论]白蚁菌圃中存在活性较高的纤维素降解菌株,可以成为高活性木质纤维素降解酶的重要来源。
关键词 白蚁菌圃;纤维素酶;分离;鉴定;酶活
中图分类号 Q939 **文献标识码** A
文章编号 0517-6611(2021)06-0001-04
doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.06.001



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Identification of Strain with Cellulase Activity in Termite Combsare and Study on Enzymatic Activity
WEI Zhang-qi, WANG Jie-hui, LIU Guo-qing et al (School of Food and Bioengineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230601)

Abstract [Objective] To improve the degradation rate of biomass straw and make full use of microbial resources. [Method] The target strains degrading cellulose from termite combsare was isolated by plate dilution method, and then the optimal strain FN-4 was rescreened from the target strains, and ITS sequence analysis was conducted combining with the research of the enzymatic activity. [Result] The strain FN-4 was identified as *Trametes*. The enzymatic activity research experiment showed that the enzymatic activity of strain FUN-4 was relatively high when the temperature was 60 ℃, the pH was 4, and the fermentation time was 6 days. When the temperature was 40 ℃ and the pH was 5, the enzyme activity was relatively stable. [Conclusion] There are high activity cellulose degrading strains in termites fungus gardens, which can be an important source of high activity lignocellulosic degrading enzymes.
Key words Termite combsare; Cellulase; Screening; Identification; Enzymatic activity

白蚁生物系统显示了高效生物转化木质纤维素的能力^[1]。白蚁之所以能食木是因为它能靠其体内的微生物群将木材中纤维素和半纤维素消化成能够被机体吸收的物质^[2]。在白蚁的蚁巢中存在“菌圃”这一特殊的结构,其主要组成成分是被完全消化的植物,白蚁和菌圃真菌之间较好的协同作用能够高效利用木质纤维素^[3]。

目前,关于白蚁共生微生物降解木质纤维素研究主要集中在白蚁肠道菌功能,并分离出其中的产酶基因进行基因组分析^[4-8],而关于菌圃真菌降解纤维素的研究较少。该研究以黑翅土白蚁菌圃为研究对象,筛选出高产纤维素酶真菌并研究其纤维素酶活性及稳定性,从而发掘具有应用价值的纤维素降解真菌。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株。黑翅土白蚁及其菌圃,购于江西省白蚁活体实验室。

1.1.2 培养基。①羧甲基纤维素-刚果红培养基:CMC-Na 2.0 g, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 1.0 g, NaCl 0.5 g, 刚果红 0.4 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。②PDA 培养基:200 g 马铃薯, 葡萄糖 2 g, 琼脂 2 g。③发酵产酶培养基:秸秆粉 5.0 g, 蛋白胨 2.0 g, KH₂PO₄ 2.0 g, FeSO₄·7H₂O 0.4 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。各培养基按配方配制后,加热搅匀,分装至锥形瓶中,加塞、包

扎, 121 ℃ 灭菌 20 min 左右后取出锥形瓶摇匀,冷却后贮存备用。

1.1.3 主要试剂及设备。试剂:刚果红染色液、氯化钠脱色液、柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液、DNS 试剂等。

主要设备:分析天平、高速离心机、立式压力蒸汽灭菌锅、紫外可见分光光度计、电热恒温培养箱等。

1.2 方法

1.2.1 菌圃中降解纤维素的菌株筛选。取 0.5 g 菌圃碾碎,放入 50 mL 无菌离心管中,加入适量无菌水,于 8 000 r/min 的转速下离心 15 min。取 1 mL 静置后的上清液分别稀释至 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 和 10⁻⁵ 倍,涂抹至羧甲基纤维素-刚果红培养基平板上,30 ℃ 培养 7 d。选取生长良好且透明水解圈较大的菌株接种于 PDA 培养基上 28 ℃ 培养 5 d,至在每个平板上都看到单一形态的菌落。选取单菌落打孔接种于羧甲基纤维素培养基中,30 ℃ 培养 3 d 后,量取 1 mg/mL 的刚果红染色液 15 mL 染色 15 min,用 1 mol/L NaCl 溶液脱色后,根据透明圈的大小,选出酶活最大的菌株(暂命名为 FUN-4)进行分子鉴定和酶活性分析。

1.2.2 菌圃中降解纤维素的菌株鉴定。

1.2.2.1 形体观察。将纯化菌株用黏片法,粘取菌丝于载玻片上,用显微镜和电镜观察其形态特征,鉴定参照文献[9-10]提供的方法进行。

1.2.2.2 ITS 序列分析鉴定^[11]。FUN-ce4 菌株基因组 DNA 采用 E.Z.N.A.® Stool DNA Kit 试剂盒提取。

以基因组 DNA 为模板,ITS2 为目标区域进行扩增,其引物序列如下:

ITS7 GTGARTCATCGAATCTTTG; ITS4 TCCTCCGCT-

基金项目 国家重点研发项目(2018YFD0502105)。
作者简介 韦张其(1993—),女,安徽安庆人,硕士研究生,研究方向:生物质。*通信作者,教授,博士,硕士生导师,从事生物质研究。
收稿日期 2020-01-03;修回日期 2020-05-13

TATTGATATGC。

PCR 反应体系:Phusion® Hot Start Flex 2× Master Mix-art Version 12.5 μL、Forward Primer(1 μmol/L)2.5 μL、Reverse Primer(1 μmol/L)2.5 μL、模板 DNA 50 μL、加 ddH₂O 25 μL。

PCR 反应程序:预变性 98 ℃ 30 s;变性 98 ℃ 10 s,退火 54 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 45 s,35 个循环;最后延伸 72 ℃ 10 min;保持 4 ℃。

PCR 扩增产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并对目标片段进行回收,回收采用 AMPure XT beads 回收试剂盒。将 PCR 产物送至杭州联川生物测序。将测序结果提交 Gen-Bank 数据库进行 Blast,从 GenBank 数据库中搜索相关菌株的 ITS 相应序列,采用 MEGA 5.0 邻接法建进化树,进行分离菌株菌种的鉴定。

1.2.3 菌株纤维素酶活研究。

1.2.3.1 粗酶液的制备。将 FUN-4 菌株接种于液体 PDA 培养基中,30 ℃摇床 180 r/min 培养 3 d。按 10%接种量接入装有 100 mL 发酵产酶培养基的 250 mL 三角瓶中,30 ℃摇床 180 r/min 培养。分别在 2、3、4、5、6、7 d 取粗酶液测定纤维素酶活。纤维素酶是一组酶的总称,是一种复合酶,主要由外切 β-葡聚糖酶、内切 β-葡聚糖酶和 β-葡萄糖苷酶等组成^[12-13],因此纤维素酶活分别由微晶纤维素酶活、羧甲基纤维素酶活和滤纸条酶活反映。

1.2.3.2 纤维素酶活的测定。

(1)羧甲基纤维素酶活力^[14]。取 100 μL 粗酶液加入 1% CMC 溶液(溶于 pH 为 4.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液),50 ℃条件下反应 30 min(以 100 ℃条件下反应 30 min 的酶液作为灭活对照组),然后加入 1 mL DNS 试剂充分摇匀

并沸水煮 5 min,冷水冷却后在 OD₅₄₀下测定吸光度。

(2)滤纸酶活力^[15]。取 500 μL 粗酶液加入 1 500 μL 缓冲液和 1 cm×6 cm 的滤纸(需卷成),在恒温水浴锅中预热 5 min,50 ℃条件下反应 60 min(以 100 ℃条件下反应 60 min 的酶液作为灭活对照组),然后加入 2 mL DNS 试剂充分摇匀并沸水煮 5 min,冷水冷却后在 OD₅₄₀下测定吸光度。

(3)微晶纤维素酶(Avicel)活力。取 100 μL 粗酶液加入 400 μL 缓冲液和 1%微晶纤维素在恒温水浴锅中预热 5 min,50 ℃条件下反应 60 min(以 100 ℃条件下反应 60 min 的酶液作为灭活对照组),然后加入 1 mL DNS 试剂,充分摇匀并沸水煮 5 min,冷水冷却后在 OD₅₄₀下测定吸光度。

酶活力单位定义^[16]:50 ℃恒温条件下,以水解反应中 1 min 催化底物水解形成 1 μmol 还原糖的酶量为 1 个酶活单位(U)。

酶降解生成还原糖的含量 $C = \text{活性组还原糖含量} - \text{灭活组还原糖含量}$

酶活力 $H = 1\,000 \times DC / (tMV)$

式中, H 为酶活 (U/mL); D 为稀释倍数; C 为酶降解生成还原糖的含量; t 为反应时间; M 为分子量; V 为酶液体积。

1.2.4 FUN-ce4 菌株产纤维素酶稳定性研究。在不同 pH 缓冲液体系和不同温度下测定酶活力和残余活力,分析其对酶促反应和酶稳定性的影响,以达到最佳产酶条件。

2 结果与分析

2.1 菌圃中降解纤维素的菌株筛选

2.1.1 纯化。从 5 个梯度的羧甲基纤维素-刚果红培养基中选取 6 个生长良好且具有较大透明圈的菌株进行纯化,得到 4 株菌株,分别暂命名为 FUN-1、FUN-2、FUN-3、FUN-4 (图 1)。

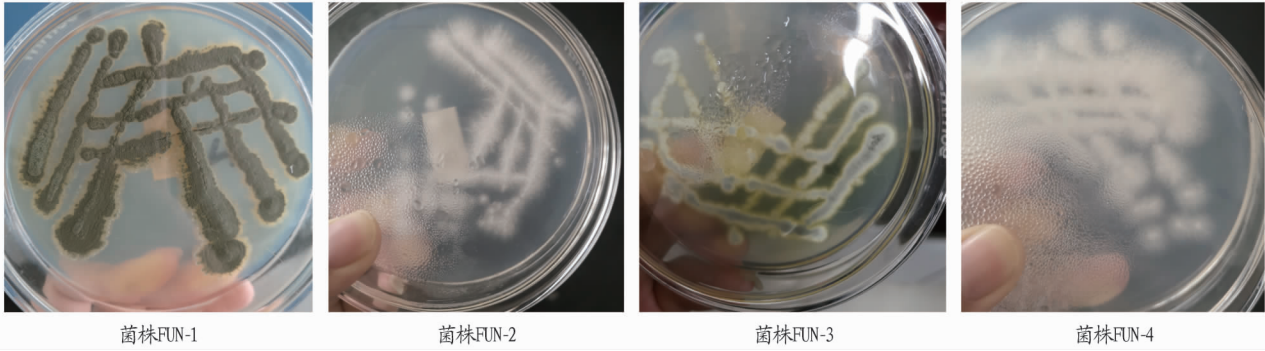


图 1 菌株在培养基上形成的菌落
Fig.1 Colonies cultured on the medium

观察到这些菌落均生长较快且菌落较大,质地疏松,呈棉絮状和绒毛状,不透明,颜色有纯白、乳白、黄色、绿色。菌落与培养基连接比较紧密,不易挑取。

2.1.2 复筛。挑取纯化后的菌株单菌落接种于羧甲基纤维素培养基,经刚果红染液染色后 NaCl 溶液脱色,得到 FUN-1、FUN-2、FUN-3、FUN-4 各菌株的刚果红水解圈(图 2)。

测量各菌株的菌落直径和透明圈直径,比较菌株活性(表 1)。通过分离纯化筛选最终得到酶活较强的菌种 FUN-ce4,并进行分子学鉴定和酶稳定性分析。

表 1 产纤维素酶菌株酶活比较

Table 1 Comparison of enzyme activity of cellulase producing strains

菌落 Colony	透明圈直径 D Diameter of transparent circle//cm	菌落直径 d Colony diameter cm	D/d	CMC 酶活 CMC enzyme activity U/mL
FUN-1	14.36	9.82	1.46	0
FUN-2	31.59	17.95	1.76	0.786
FUN-3	15.25	9.65	1.58	0.261
FUN-4	35.25	18.07	1.95	0.857

2.2 菌种的分类鉴定

2.2.1 菌株形态鉴定。镜检图中可以看到有比较粗壮的菌

丝,许多偏透明的孢子,长长的分生孢子梗头部有一个顶囊(图3),菌落形态和镜检结果可以初步确定为霉菌。

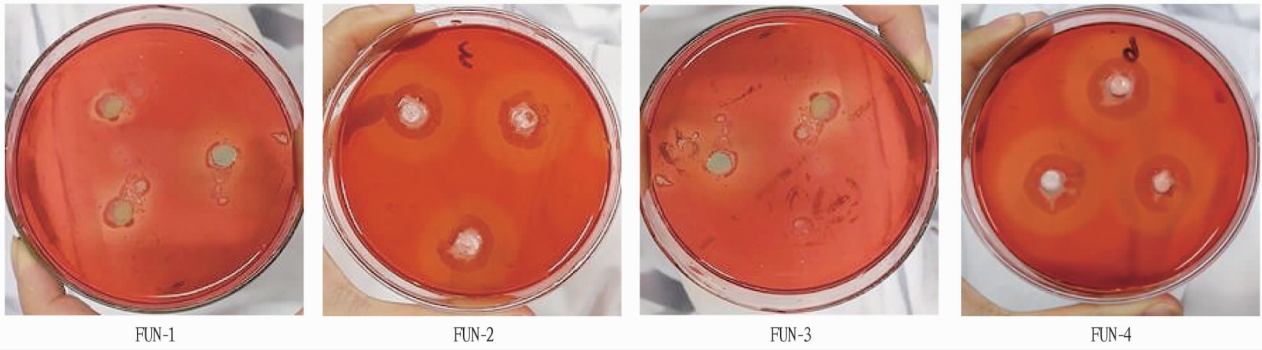


图 2 刚果红水解圈
Fig.2 Hydrolyzed circle of Congo-red by strains

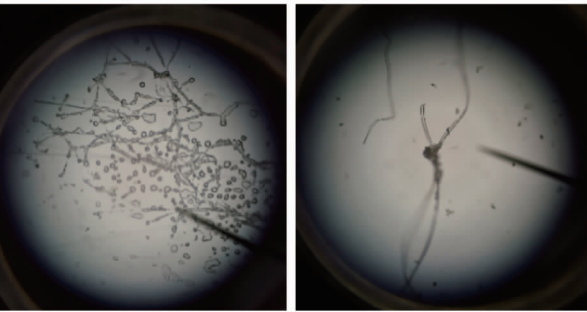


图 3 菌株的形态特征
Fig.3 Morphological characteristics of the strain

2.2.2 ITS 分子鉴定。将扩增后的 ITS 进行凝胶电泳检测。由图 4 可知,序列 2 为所挑选菌株目的条带片段。由 PCR 扩增得到的目的片段长度约 353 bp。在 GenBank 的 Blast 中对该序列进行同源性比较(图 5),结果显示 FUN-4 菌株 ITS 基因序列与毛栓菌(*Trametes hirsuta*)同源性为 96%,初步鉴定为栓菌属。

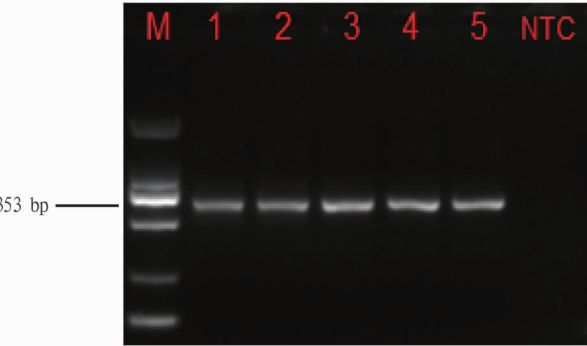


图 4 FUN_ ce4 的 ITS 区的 PCR 结果
Fig.4 PCR product of ITS sequence of the FUN_ ce4

2.3 菌株纤维素酶活的测定及纤维素酶稳定性研究

2.3.1 葡萄糖标准曲线制作。该葡萄糖标准曲线的 $R^2 = 0.9996$,拟合程度较好,得到的回归方程为 $y = 4.8154x - 0.0248$ (图 6)。可用该方程计算对应的葡萄糖含量,代入方程中计算酶活。

2.3.2 发酵时间对酶活力的影响。羧甲基纤维素酶活随着

时间延长逐渐增大,但在第 6 天之后酶活升高不明显(图 7),考虑到时间成本,选择第 6 天为最优发酵时间;滤纸条酶活和微晶纤维素酶活较低,两者相差较小,且在第 6 天达到最大值,可能是由于羧甲基纤维素酶抑制了两者的活性。因此,选择第 6 天为发酵时长。

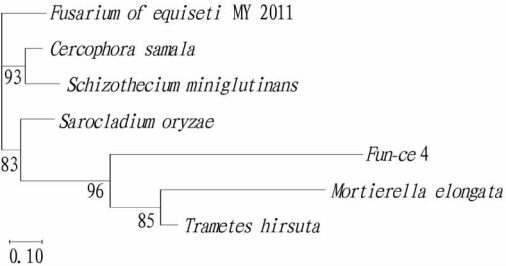


图 5 FUN-ce4 的 ITS 系统发育树
Fig.5 Phylogenetic tree of the FUN-ce4 based on the ITS sequence

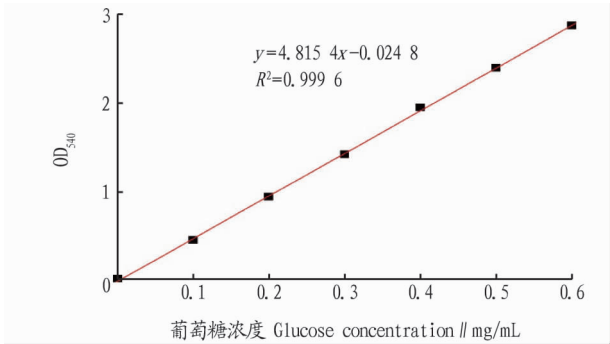


图 6 葡萄糖标准曲线
Fig.6 Standard curve of glucose

2.3.3 温度和 pH 对酶活力的影响。羧甲基纤维素酶、滤纸条酶、微晶纤维素酶的酶活均在 60 ℃时达到峰值,分别为 1.020、0.094 和 0.246 U/mL。在 30~50 ℃,滤纸条酶几乎不显示活性,80 ℃时微晶纤维素酶活有超过羧甲基纤维素酶活的趋势(图 8)。羧甲基纤维素酶、滤纸条酶、微晶纤维素酶的酶活随缓冲液 pH 升高均先增大后减小,在 pH 为 4 时达到最高值,分别为 0.755、0.067、0.153 U/mL,但滤纸条酶活随缓冲液 pH 升高变化不明显(图 9)。

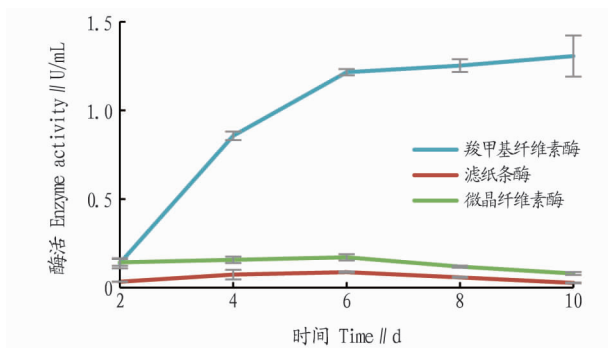


图7 发酵时间对纤维素酶活力的影响

Fig.7 Effect of fermentation time on enzyme activity

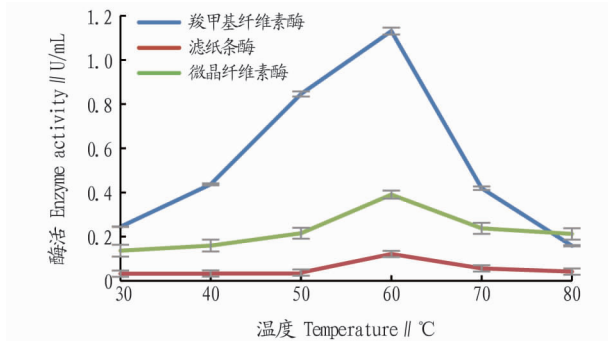


图8 温度对酶活力的影响

Fig.8 Effect of temperature on enzyme activity

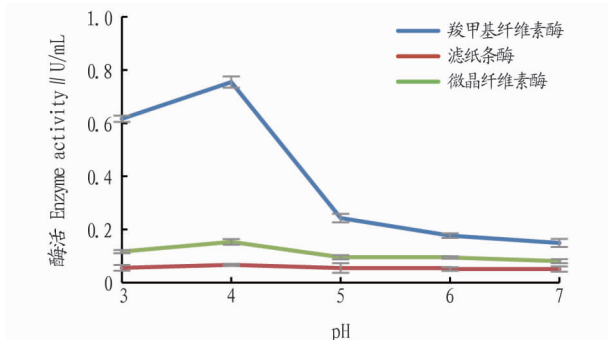


图9 pH对酶活力的影响

Fig.9 Effect of pH on enzyme activity

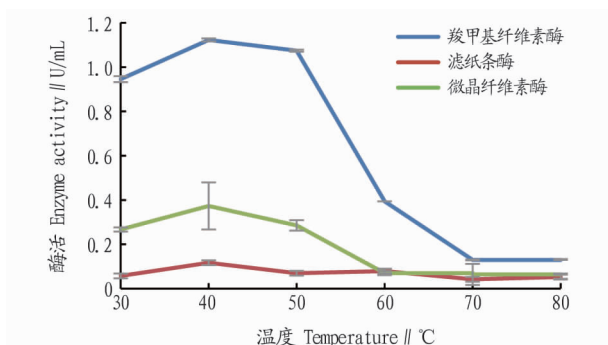


图10 温度对酶稳定性的影响

Fig.10 Effect of temperature on enzyme stability

2.3.4 温度和 pH 对酶活稳定性的影响。从图 10 可见,保存在较低温度下的酶稳定性较好,在 40 °C 时酶活最稳定,羧甲基纤维素酶、滤纸条酶、微晶纤维素酶的酶活分别为 1.123、0.117、0.373 U/mL,相对酶活力分别为 93.89%、96.38% 和

95.64%。羧甲基纤维素酶稳定性随温度升高变化最大,超过 50 °C 后酶活骤降。滤纸条酶活较低,但稳定性好。从图 11 可见,羧甲基纤维素酶、滤纸条酶、微晶纤维素酶的酶活 pH 为 5 时酶活最稳定,分别为 0.660、0.060、0.148 U/mL,相对酶活力分别为 87.4%、86.4%、96.7%。羧甲基纤维素酶对 pH 较为敏感,滤纸条酶活和微晶纤维素酶活均较低,但稳定性好,在不同 pH 缓冲液下保存酶活变化较小,pH 为 3~7 时均能保持 60% 以上活性。

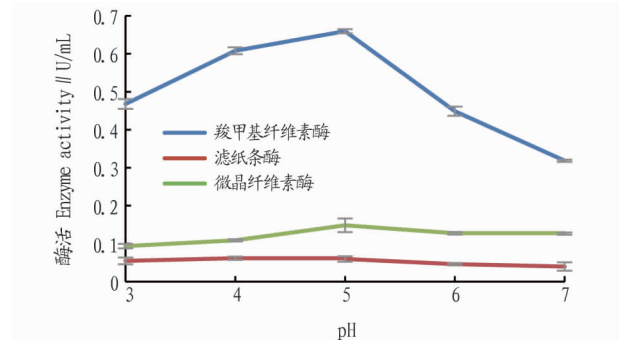


图11 pH对酶稳定性的影响

Fig.11 Effect of pH on enzyme stability

3 小结

该研究以白蚁菌圃为菌源,相比主流研究将菌源聚集在土壤、白蚁肠道、腐烂木材等更具有创新性。试验从菌圃中提取筛选出 1 株高产纤维素酶真菌,为后续白蚁菌圃混合菌群分离纯化提供参考。通过分子学初步鉴定其高产纤维素酶菌株为栓孔菌属,栓孔菌属隶属于担子菌门、伞菌亚门、伞菌纲、多孔菌目、多孔菌科,属于白腐菌的一大类,担子门白腐真菌近年来作为产漆酶的重要优质菌源而被广泛研究^[17-20],从而为生物降解提供了重要途径与方法。后续可对所产纤维素酶的酶活及稳定性进行初步探索,以期为其开发利用提供理论依据。

参考文献

- [1] 谢蓉蓉,孙建中,耿阿蕾,等.自然生物系统在生物质高效转化利用中的科学价值与应用前景[J].生物产业技术,2015(2):32-40.
- [2] 李栋,田伟金,黎明,等.谈谈白蚁与人类的密切关系[J].昆虫知识,2004,41(5):487-494.
- [3] 龙雁华.高等培菌白蚁高效利用木质纤维素的机理研究[D].合肥:安徽农业大学,2009.
- [4] WARNECKE F, LUGINBÜHL P, IVANOVA N, et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite [J]. Nature, 2007, 450(7169):560-565.
- [5] NIMCHUA T, THONGARAM T, UENGWETWANIT T, et al. Metagenomic analysis of novel lignocellulose-degrading enzymes from higher termite guts inhabiting microbes [J]. J Microbiol Biotechnol, 2012, 22(4):462-469.
- [6] LIU N, YAN X, ZHANG M L, et al. Microbiome of fungus-growing termites: A new reservoir for lignocellulase genes [J]. Applied and environmental microbiology, 2011, 77(1):48-56.
- [7] LIU N, ZHANG L, ZHOU H K, et al. Metagenomic insights into metabolic capacities of the gut microbiota in a fungus-cultivating termite (*Odontotermes yunnanensis*) [J]. PLoS One, 2013, 8(7):1-10.
- [8] POULSEN M, HU H F, LI C, et al. Complementary symbiont contributions to plant decomposition in a fungus-farming termite [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2014, 111(40):14500-14505.
- [9] 戴芳澜.真菌的形态和分类[M].北京:科学出版社,1987.
- [10] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.

(下转第 9 页)

- [4] 李晋玲. 茶花氨基酸和蛋白质含量测定及研究[J]. 茶业通报, 2003, 25(2): 61.
- [5] 许金伟, 张星海, 赵粼, 等. 茶树花中功能性成分的提取与分析研究[J]. 广州化工, 2014, 42(3): 65-67.
- [6] 杨普香, 刘小仙, 李文金. 茶树花主要生化成分分析[J]. 中国茶叶, 2009, 31(7): 24-25.
- [7] 黄阿根, 董瑞建, 韦红. 茶树花活性成分的分析与鉴定[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 400-403.
- [8] 白婷婷, 孙威江, 黄伙水. 茶树花的特性与利用研究进展[J]. 福建茶叶, 2010, 32(21): 7-11.
- [9] 刘丹, 周跃斌, 周宇. 不同品种茶树花内含成分分析[J]. 茶叶通讯, 2019, 46(1): 17-23.
- [10] 饶耿慧, 叶乃兴, 段慧, 等. 茶树花不同花期主要生化成分的变化[J]. 福建茶叶, 2008, 30(1): 21-23.
- [11] 徐人杰, 王琳, 汪名春, 等. HPLC 法测定茶树花中可溶性糖、儿茶素和游离氨基酸[J]. 食品科学, 2012, 33(10): 246-250.
- [12] 田国政, 王东辉, 周光来, 等. 茶树花营养成分的分析与评价[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2004, 22(2): 26-28.
- [13] 鄯颖霞, 陈启文, 白蕊, 等. 茶树花苹果酒的发酵工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(16): 207-211.
- [14] 杨清平, 胡楠. 茶花保健酒的研制[J]. 武汉工程大学学报, 2014, 36(1): 22-25.
- [15] 于健, 张玲, 麻汉林. 茶树花酸奶的研制[J]. 食品工业, 2008, 29(4): 42-44.
- [16] 赵旭, 顾亚萍, 钱和. 茶树花冰茶的研制[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(7): 2924-2925.
- [17] 张文杰, 刘聪, 林珊, 等. 茶树花软糖的制作工艺[J]. 食品安全导刊, 2016(27): 146-148.
- [18] 杨宇华, 张静, 郑宝东, 等. 武夷岩茶茶树花黄酒酿制工艺研究[J]. 武夷学院学报, 2018, 37(3): 18-22.
- [19] 张丹. 茶树花洗手液的研发[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [20] 庞式, 凌彩金. 茶树花开发利用的思路及其效益[J]. 广东茶业, 2002(21): 39-40.
- [21] 曾亮, 傅丽亚, 罗理勇, 等. 不同品种和花期茶树花挥发性物质的主成分和聚类分析[J]. 食品科学, 2015, 36(16): 88-93.
- [22] 陈小萍, 张卫明, 史劲松, 等. 茶树花利用价值和产品的综合开发[J]. 现代农业科技, 2007(3): 97-98.
- [23] 韩景璐, 王强, 张耀化, 等. 以茶树花膏为介质的膏摩法治疗第3腰椎横突综合征效果观察[J]. 山东医药, 2018, 58(18): 88-90.
- [24] 吴国火, 崔林, 王梦馨, 等. 茶树花香气及茶叶气味对中华蜜蜂的引诱效应[J]. 生态学报, 2020, 40(12): 4024-4031.
- [25] 张峰, 操晓亮, 伊勇涛, 等. 茶树花纯露的制备及其在卷烟中的应用[J]. 中国烟草学报, 2020, 26(5): 18-24.
- [26] 钟蓉, 董启庆, 庄晚芳. 茶树花粉固体培养基法监测环境污染物的初步研究[J]. 农业环境科学学报, 1993, 12(6): 263-266, 280.
- [27] 胡利娟. 茶树花获批新资源产品[J]. 农产品加工, 2013(4): 73.
- [28] 陈小萍, 张卫明, 史劲松, 等. 茶树花利用价值和产品的综合开发[J]. 现代农业科技, 2007(3): 97-98.
- [29] 周苏, 成玉梁, 姚卫荣, 等. 茶树花提取物及对茶叶籽油抗氧化作用的研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(9): 98-102.
- [30] 曹伟, 尉亚辉, 郭斌, 等. 用荧光探针法研究茶叶花粉黄酮对氧自由基诱导红细胞膜氧化损伤的保护作用[J]. 光子学报, 2002, 31(4): 394-397.
- [31] YANG Z Y, XU Y, JIE G L, et al. Study on the antioxidant activity of tea flowers (*Camellia sinensis*) [J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2007, 16(S1): 148-152.
- [32] 于健. 茶树花抗氧化特性的初步研究[J]. 化学工程与装备, 2015(12): 17-19.
- [33] 王梦馨, 吴国火, 崔林, 等. 茶树花 Cu/Zn-SOD 酶活性及其基因表达分析[J]. 热带作物学报, 2020, 41(6): 1167-1173.
- [34] 陈丹, 丁宇, 陈贵杰, 等. 茶树花茶汤对小鼠肠道稳态的影响[C]//中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会第十六届年会暨第十届中国食品业高层论坛论文集摘要集. 北京: 中国食品科学技术学会, 2019.
- [35] 陈丹, 陈贵杰, 万鹏, 等. 茶树花多糖体外消化与酵解特性研究及其对人体肠道菌群的作用[C]//中国食品科学技术学会, 美国食品科学技术学会. 2017 中国食品科学技术学会第十四届年会暨第九届中美食品业高层论坛论文集摘要集. 北京: 中国食品科学技术学会, 2017.
- [36] 凌泽杰, 熊昌云, 韩铨, 等. 茶树花对大鼠肥胖病和高血脂症预防作用研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(7): 50-54.
- [37] 凌泽杰. 茶树花减肥降脂作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [38] 许兰, 张丹, 全团团, 等. 茶树花提取物的抑菌和美白功效评价[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(8): 1287-1293.
- [39] 卢雯静. 茶树花中茶皂素和茶多酚的综合提取、分离纯化及抑菌性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- [40] 任莹. 茶树花皂苷 Chakasaponin I、IV 对人卵巢癌细胞增殖抑制及其分子机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- [41] 韩铨, 凌泽杰, 何普明, 等. 茶树花多糖免疫调节与抗肿瘤活性的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(6): 646-653.
- [42] 向明钧, 周卫华, 石发宽, 等. 茶树花黄酮类物质抗肿瘤作用研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(12): 157-160.
- [43] 陈秋冰. 茶树花衍生纳米囊泡在乳腺癌治疗中的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [44] 喻云春, 胡华健. 贵州茶树“花资源”开发及其产业化初探[J]. 贵州茶叶, 2007, 35(1): 11-13.
- [45] 刁梦瑶, 申琳, 生吉萍. 茶树花资源研究利用现状与展望[J]. 中国食物与营养, 2017, 23(12): 24-28.
- [46] 伍群群, 王华建, 邵宗清, 等. 浅谈淳安茶产业发展中茶树花的开发利用[J]. 中国茶叶, 2017, 39(8): 38-39.

+++++

(上接第4页)

- [11] 燕勇, 李卫平, 高雯洁, 等. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 1958-1961.
- [12] 陈燕勤, 毛培宏, 曾宪贤. 细菌纤维素酶结构和功能的研究[J]. 化学与生物工程, 2004, 21(6): 4-6.
- [13] 吴显荣, 穆小民. 纤维素酶分子生物学研究进展及趋向[J]. 生物工程进展, 1994(4): 25-27.
- [14] HARDIN M T, MITCHELL D A, HOWES T. Approach to designing rotating drum bioreactors for solid-state fermentation on the basis of dimensionless design factors [J]. Biotechnology and bioengineering, 2000, 67(3): 274-282.
- [15] 魏姣, 万学瑞, 吴润, 等. 产纤维素酶真菌菌株的分离筛选及产酶条件优化[J]. 甘肃农业大学学报, 2016, 51(2): 8-15.
- [16] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities [J]. Pure and applied chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [17] 关怡, 尹娣, 杜茜, 等. 产纤维素酶菌株 *Trametes* sp. LYW-1 的分离鉴定及产酶条件分析[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(10): 96-102.
- [18] 曾盛泉. *Trametes versicolor* 产漆酶及其在有机污染物降解中的应用基础研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [19] 张小青, 袁璟, 邵亚中, 等. 基于 ITS 序列的栓菌属部分种的分子分类初步研究(英文)[J]. 菌物学报, 2006, 25(1): 23-30.
- [20] SAVINOVA O S, MOISEENKO K V, VAVILOVA E A, et al. Evolutionary relationships between the Laccase Genes of Polyporales: Orthology-based classification of laccase isozymes and functional insight from *Trametes hirsuta* [J]. Frontiers in microbiology, 2019, 10: 1-14.