

# 两株野生木霉的鉴定及其产漆酶和纤维素酶研究

李春冬<sup>1,2</sup>, 徐伟良<sup>1,2</sup>, 多拉娜<sup>1,2</sup>, 鲁铁<sup>3</sup>, 郭梁<sup>1,2\*</sup>

(1. 锡林郭勒职业学院生物工程研究院, 内蒙古 锡林浩特 026000; 2. 锡林郭勒盟食品科学与检测实验中心/锡林郭勒盟农畜产品检验检测中心, 内蒙古 锡林浩特 026000; 3. 河南城建学院生命科学与工程学院, 河南 平顶山 467036)

**摘要:** 利用微生物产生的活性酶系来降解纤维素、木质素等多聚物是资源绿色节能利用的主要趋势。该研究以在锡林郭勒地区分离的两株木霉菌 XLGL201709099 和 XLGL201709112 为研究对象, 通过 ITS 序列分析对其进行鉴定, 采用四种不同固体培养基, 以菌丝的生长能力和最终生物量为评价指标, 进行最优固体培养基的筛选; 分别测定两株木霉菌株的总抗氧化能力 (ABTS 法)、滤纸酶活 (FPA 法) 来评价其产漆酶和产纤维素酶的能力。结果表明, 木霉菌株 XLGL201709099 为黄绿木霉 (*Trichoderma aureoviride*), 木生菌标准培养基 (GPY) 为其最优固体培养基, 该木霉菌株产漆酶酶活为 6.319 U/L, 总纤维素酶活为 0.538 U/g。木霉菌株 XLGL201709112 为康氏木霉 (*Trichoderma koningii*), GPY 培养基为其最优固体培养基, 该木霉菌株产漆酶酶活为 6.138 U/L, 总纤维素酶活为 0.888 U/g。通过对两株木霉的产漆酶和纤维素酶能力的研究, 以期利用木霉来降解本地区的纤维素、木质素等资源提供有益借鉴。

**关键词:** 木霉; 鉴定; 固体培养基; 漆酶; 纤维素酶

中图分类号: Q93-331

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)05-0067-05

## Identification of Two Wild *Trichoderma* Strains and Study on Laccase and Cellulase Production

LI Chungong<sup>1,2</sup>, XU Weiliang<sup>1,2</sup>, Duolana<sup>1,2</sup>, LU Tie<sup>3</sup>, GUO Liang<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Bioengineering, Xilingol Vocational College, Xilinhot 026000; 2. Xilingol Food Science and Testing Experimental Center/Xilingol Agricultural and Animal Products Testing Center, Xilinhot 026000; 3. School of Life Science and Bioengineering, Henan University of Urban Construction, Pingdingshan 467036, China)

**Abstract:** It is the main trend of green and energy saving utilization of resources to degrade cellulose, lignin and other polymers by using active enzyme system produced by microorganisms. In this study, XLGL201709099 and XLGL201709112 were isolated from Xilingol area and identified by ITS sequence analysis. Four different solid media were used, and the growth capacity and final biomass of mycelia were used as evaluation indexes to screen the optimal solid media. The total antioxidant capacity (ABTS) and filter paper enzyme activity (FPA) of two strains of trichoderma were determined respectively to evaluate the laccase and cellulase production capacity. The results showed that XLGL201709099 was the *Trichoderma aureoviride* strain, and GPY was the optimal solid medium. The laccase production activity of the strain was 6.319 U/L, and the total cellulase activity was 0.538 U/g. XLGL201709112 was the *Trichoderma koningii* strain, and GPY medium was the optimal solid medium. The laccase production activity of the strain was 6.138 U/L, and the total cellulase activity was 0.888 U/g. The laccase and cellulase production capacity of two strains of trichoderma were studied in order to provide useful reference for the degradation of cellulose and lignin in this area.

**Key words:** *Trichoderma*; Identification; Solid media; Laccase; Cellulase

收稿日期: 2019-11-23

基金项目: 锡林郭勒盟科技计划项目 (BG202101、BG202103); 锡林郭勒职业学院科研课题 (ZD-2021-01、ZD-2021-04)

作者简介: 李春冬 (1997-), 男, 研究实习员, 研究方向为微生物资源研究与开发。

通讯作者: 郭梁, 男, 博士, 副研究员, E-mail: herdman86@163.com

木霉 (*Trichoderma*) 属于半知菌亚门、丝孢纲、丛梗孢目、丛梗孢科的真菌, 广泛存在于自然界空气、土壤和腐烂植物体表面等多种基质中, 种类繁多, 且功能各异<sup>[1]</sup>。木霉不仅可以分解和利用纤维素、半纤维素、几丁质等多聚物作为其生长的碳源物质, 还能产生如漆酶、纤维素酶、木聚

糖酶等多种具有生物活性的酶系,在农业、造纸、化工等产业中有广泛的应用<sup>[2-3]</sup>。

漆酶(Laccase)是一种以单体糖蛋白的形式存在且含铜的多酚氧化酶<sup>[4]</sup>。漆酶的来源十分广泛,不但分布于植物中,还广泛分布于真菌和细菌中<sup>[5]</sup>。在锡林郭勒盟正蓝旗分离纯化得到一株野生多孔菌,其漆酶比活力达907.34 U/L<sup>[6]</sup>;在堆积腐木和堆积秸秆等木质素含量丰富的地方筛选出一株黄孢原毛平革菌,具有良好的木质素降解能力,其漆酶活力最高可达到233.33 U/L<sup>[7]</sup>。

纤维素酶(cellulase)是由多种功能不同的酶共同组成的,且不同功能各自独立可互相协作<sup>[8]</sup>。目前,木霉属真菌是公认产纤维素酶最高的菌种之一<sup>[9-10]</sup>。以白桦木木屑为固体产酶基质,测得哈茨木霉纤维素酶活为1.043 U/g<sup>[11]</sup>;采用单因子和复合因子诱变方法选育的绿色木霉菌株纤维素酶活力可达48.42 U/mL<sup>[12]</sup>。

本研究以锡林郭勒盟野生白桦林中采集得到的两株木霉菌种为研究对象,以ITS序列测序分析和构建系统发育树对其进行鉴定,利用4种不同固体培养基对两株木霉菌株进行最佳培养基筛选;并通过ABTS法测定两株木霉的漆酶活性,通过滤纸酶活法测定两株木霉菌的纤维素酶活性,以期为更好地开发和利用本地区的木质素、纤维素等资源提供借鉴。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 培养基

马铃薯综合培养基(PDA):切片马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,蒸馏水1 L,pH自然<sup>[13]</sup>。改良麦粒煮汁培养基:煮汁麦粒100 g,葡萄糖15 g,胰蛋白胨5 g,琼脂20 g,蒸馏水1 L,pH自然<sup>[14]</sup>。木生菌标准培养基(GPY):葡萄糖20 g,胰蛋白胨10 g,酵母浸膏20 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g,MgSO<sub>4</sub> 0.5 g,琼脂20 g,蒸馏水1 L,pH自然<sup>[15]</sup>。改良木生菌GPY培养基:葡萄糖20 g,胰蛋白胨5 g,酵母浸膏10 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g,MgSO<sub>4</sub> 1 g,琼脂20 g,蒸馏水1 L,pH自然<sup>[16]</sup>。PDB液体培养基(g/L):马铃薯切片200 g,葡萄糖20 g,pH自然。固体产酶培养基:以原基桦木屑为发酵培养基原料,将干燥无腐败的白桦木,粉碎过40目筛,准确称量10.0 g木屑加入两倍质量的营养液混匀,诱导木霉菌株产纤维素酶。营养液成分为:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8 g、MgSO<sub>4</sub> 0.4 g,溶于1 L水中,pH自然。上述培养

基均在121℃灭菌30 min后使用。

#### 1.1.2 主要试剂

0.1 mol/L乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.8):0.1 mol/L乙酸溶液(5.73 mL冰醋酸/L)205 mL与0.1 mol/L乙酸钠溶液(8.204 g无水乙酸钠/L)295 mL混合。3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂:称取6.3 g 3,5-二硝基水杨酸用水溶解,加入21.0 g NaOH,182 g酒石酸钾钠后加500 mL水,加热溶解,再依次加入5.0 g苯酚和5.0 g亚硫酸钠,搅拌溶解,冷却后定容至1 000 mL,存于棕色瓶中,放置7 d后使用。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 野生木霉菌种的分离培养

将从锡林郭勒盟野生白桦林采集的木霉菌种从基物上分离,接种到PDA固体培养基上,于25℃恒温培养,经多次连续传代,进行菌丝纯化。

#### 1.2.2 野生木霉菌种的分子鉴定

使用生工真菌DNA快速抽提试剂盒对菌株进行基因组提取,提取按照试剂盒步骤。使用Nanodrop 2000c核酸蛋白分析仪测量DNA浓度,并将样品DNA母液稀释至300 ng/μL备用,保存于-20℃。

以提取的基因组DNA为模板,选用引物ITS1和ITS4进行扩增。PCR反应体系(20 μL):模板1 μL、正向和反向引物各1 μL、EasyTaq PCR Super Mix 10 μL、ddH<sub>2</sub>O 7 μL。PCR反应程序参照文献[11],PCR扩增产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测。将PCR扩增后的产物送至北京睿博兴科生物科技有限公司进行测序。测序结果经拼接后在NCBI数据库中进行同源性比对。

#### 1.2.3 木霉菌种最优固体培养基的筛选

将纯化后的木霉菌丝接种到4种固体培养基上,于25℃恒温培养箱培养。每天观察菌丝生长状态并测量菌丝长度,直至菌丝长满培养皿,将最终培养的4种固体培养基于电磁炉上煮沸,使琼脂溶解,经40目滤网过滤得到菌丝。将菌丝放入预先称重的培养皿中,80℃烘干至恒重,称取菌丝干重。通过测量木霉菌丝在4种固体培养基上的生长速度和菌丝干重,评价4种固体培养基。

#### 1.2.4 漆酶活性测定

取液体摇瓶培养的木霉菌液,使用8层无菌纱布对发酵菌液进行过滤,将滤液于室温8 000 r/min离心10 min,取上清,即为粗酶液。总反应体系为3 mL:2 700 μL的HAc-NaAc(pH 4.0)与200 μL ABTS,30℃恒温水浴10 min后,加入100 μL酶液。将比色皿于420 nm紫外光下每隔30 s测量

样品 OD 值,共测量 3 min<sup>[17-20]</sup>。以沸水浴 15 min 后去除酶活性的粗酶液作为空白对照。酶活力定义:1 min 内使 1 μmol ABTS 氧化所需的酶量为 1 个酶活力单位(U),计算公式为:

$$\text{酶活力 (U/L)} = N \times \Delta \text{OD}_{420} \times 10^6 / (36\ 000 \times 3)$$

式中:N 为稀释倍数;ΔOD<sub>420</sub> 为 420 nm 下吸光度的变化值;36 000 为 ABTS 氧化态的摩尔吸光系数[L/(mol·cm)]。

### 1.2.5 原基诱导产纤维素酶发酵培养

将木霉菌丝接种到 100 mL PDB 液体培养基中,放入 25 °C 恒温培养摇床中 150 r/min 培养 3 d,将液体菌丝放入 40 目灭菌滤筛中,滤出 PDB 液体培养基,用灭菌水去除菌丝上面残留单糖,再用灭菌接种铲将菌丝刮取到无菌三角瓶中,加入 50 mL 营养液,摇匀后吸取 5 mL 至以原基桦木屑为发酵原料的固体培养基中,在 25 °C 恒温培养箱中培养 7 d,进行产纤维素酶发酵。

### 1.2.6 总纤维素酶活力测定

产纤维素酶发酵结束后均匀称取 5.0 g 质量的酶曲,每个样品三个平行,按缓冲液体积(mL):干曲质量(g)=10:1 加入 0.1 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.8),于 40 °C 80 r/min 振荡浸提 1.5 h 后,室温 8 000 r/min 离心 10 min 得上清液为待测酶液。将 0.5 mL 稀释酶液加入含 0.5 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液的具塞试管中,并放入一张 1 cm×6 cm 定性滤纸,50 °C 水浴中保温 1 h 后加入 1.0 mL DNS 显色液,煮沸 5 min,迅速冷水冷却,各加蒸馏水 8 mL 摇匀,于 520 nm 处比色。以沸水浴 15 min 的 0.5 mL 粗酶液作为空白对照。通过标准曲线回归方程求得作用 1 h 后产生的葡萄糖毫克数<sup>[21-22]</sup>,根据公式计算滤纸酶活(Filter Paper Activity,

FPA)。FPA 酶活单位定义<sup>[22]</sup>:50 °C pH 4.8 条件下每分钟产生 1 μmol 的葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{FPA 酶活 (U/g)} = (A \times n \times m) / (v \times h \times 180)$$

式中:A 为由吸光度从标准曲线上查得的葡萄糖微克数(μg);n 为稀释倍数;m 为浸提得到 1 g 干酶曲所使用缓冲液的体积(mL/g 干曲);v 为参与定糖的反应液体积(即实际参与反应的酶液体积)(mL);h 为反应时间(min);180 为葡萄糖的摩尔质量(μg/μmol)。

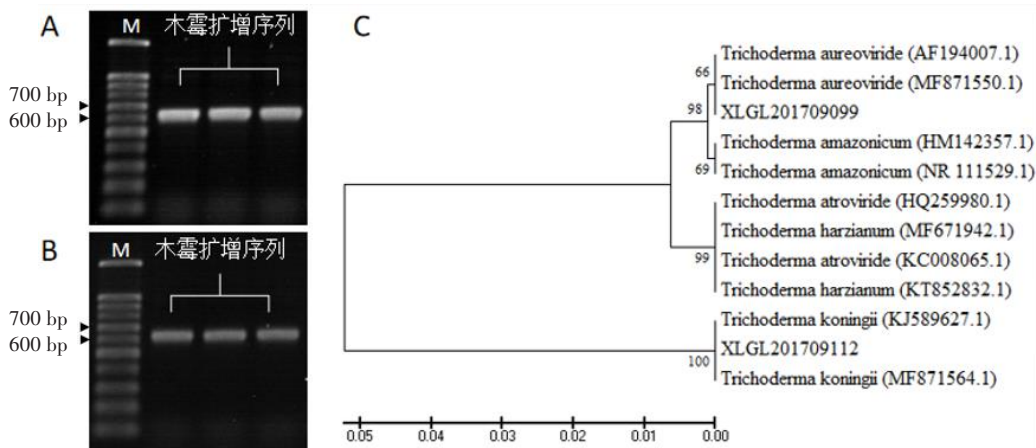
## 2 结果与分析

### 2.1 木霉菌种鉴定结果

将采集分离的木霉菌丝体以真菌 ITS1/ITS4 为引物,设置 3 个平行实验,进行 PCR 反应,并将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,经序列测序后的 ITS 序列,在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源比对,并利用 MEGA 5.0 的 Neighbor-Joining 构建系统发育树。

由图 1A 可知,菌株 XLGL201709099 的 DNA 在 600~700 bp 处有 ITS 序列片段。该木霉菌株与 *Trichoderma aureoviride* (AF194007.1) 和 *Trichoderma aureoviride* (MF871550.1) 序列比对相似度均为 100%,系统同源性最高(图 1C),最终确认此木霉菌株为黄绿木霉(*Trichoderma aureoviride*)。

由图 1B 可知,菌株 XLGL201709112 的 DNA 在 600~700 bp 处有 ITS 序列片段。该木霉菌株与 *Trichoderma koningii* (KJ589627.1) 和 *Trichoderma koningii* (MF871564.1) 序列比对相似度为 100%,系统同源性最高(图 1C),最终确认该木霉菌株为康氏木霉(*Trichoderma koningii*)。



注:M 为 marker、(A) 和 (B) 为 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果;(C) 为菌株 XLGL201709099 和菌株 XLGL201709112 的系统发育树

图 1 木霉的分子鉴定结果



## 2.2 木霉菌种固体培养基的筛选

用4种固体培养基培养两株木霉菌种,观察

并记录菌丝在固体培养基上的生长速度和菌丝最终干重,结果见表1。

表1 菌丝生长状况分析

培养基种类	菌丝层状态	产孢区形状	菌丝长势(最终)	菌丝生长速度(mm/d)	最终菌丝干重(g)
黄绿木霉(XLGL201709099)					
PDA培养基	薄	环状	++	27.3	0.079 7
改良麦粒煮汁培养基	薄	环状	+	27.3	0.049 2
GPY培养基	厚	同心轮纹	+++	16.4	0.106 3
改良GPY培养基	厚	同心轮纹	+++	16.4	0.090 7
康氏木霉(XLGL201709112)					
PDA培养基	薄	环状	++	16.4	0.054 0
改良麦粒煮汁培养基	薄	环状	+	20.5	0.045 1
GPY培养基	厚	同心轮纹	+++	16.4	0.114 9
改良GPY培养基	厚	同心轮纹	+++	13.6	0.108 7

注:“+++”:菌丝粗壮,密,长势良好;“++”:菌丝粗壮,较密,长势较好;“+”:菌丝细,疏散,长势一般

黄绿木霉(XLGL201709099)在PDA培养基和改良麦粒煮汁培养基上的生长速度最快,培养至1.5 d时,皿内菌丝已全部长满,其生长速度均为27.3 mm/d。木生菌GPY培养基和改良GPY培养基上的菌丝生长略慢,其生长速度均为16.4 mm/d。从菌丝长势来看,GPY培养基和改良GPY培养基长势较好,菌丝层厚,呈密集的蛛网状,产孢区形成同心轮纹。PDA培养基和改良麦粒煮汁培养基长势略差,菌丝生长呈放射性,中间最先出现环状产孢区,菌丝层薄而疏。通过菌丝生物量的试验数据对比表明,GPY培养基的菌丝干重最多为0.106 3 g,改良麦粒煮汁培养基菌丝干重最少为0.049 2 g。通过以上统计分析最终确定,木生菌GPY培养基为黄绿木霉菌种的最佳固体培养基配方。

康氏木霉(XLGL201709112)在改良麦粒煮汁培养基上生长速度最快,培养至2 d,皿内菌丝已全部长满,其生长速度为20.5 mm/d。PDA培养基、木生菌GPY培养基和改良木生菌GPY培养基上的菌丝生长略慢,其生长速度分别为16.4、16.4、13.6 mm/d。从菌丝长势来看,GPY培养基和改良GPY培养基长势较好,菌丝层厚,呈密集的蛛网状,产孢区形成同心轮纹。PDA培养基和改良麦粒煮汁培养基长势略差,菌丝生长呈放射性,中间最先出现环状产孢区,菌丝层薄而疏。通过菌丝生物量的试验数据对比表明,GPY培养基的菌丝干重最多为0.114 9 g,改良麦粒煮汁培养基菌丝干重最少为0.045 1 g。通过以上统计分析最终确定,木生菌GPY培养基为该木霉菌株的最佳固体培养基配方。

## 2.3 漆酶酶活力测定

试验以PDB液体发酵液离心上清液为粗酶

液,通过ABTS法测定木霉菌株的漆酶活性,最终测得黄绿木霉(XLGL201709099)漆酶活性为(6.319±0.49) U/L;康氏木霉(XLGL201709112)漆酶活性为(6.138±0.24) U/L。

## 2.4 纤维素酶活力测定

试验以菌株原基桦木屑为发酵培养基原料,对滤除单糖的木霉菌种进行固态发酵培养诱导其产纤维素酶。并通过滤纸酶活法测定该木霉的总纤维素酶活。将测得的样品吸光度值代入葡萄糖标准曲线回归方程求得作用1 h后产生的葡萄糖毫克数,通过公式最终测得黄绿木霉(XLGL201709099)的总纤维素酶活为(0.538±0.050) U/g;康氏木霉(XLGL201709112)总纤维素酶活为(0.888±0.044) U/g。

## 3 讨论

目前,木霉菌培养优化的研究主要集中在固态发酵培养方面,对固体培养基的培养优化未见报道。固体培养基在木霉菌种的观察、鉴定和保藏等方面研究具有重要意义。本试验采用4种常见固体培养基对分离的两株木霉菌种进行培养,以菌丝体长势、生物量的积累及菌丝的生长速度为评价指标,筛选出最佳固体培养配方。试验结果显示,两株木霉菌种在改良木生菌GPY培养基长势比GPY培养基略差;而在GPY培养基上,除菌丝生长速度略慢于PDA培养基和改良麦粒煮汁培养基外,其菌丝长势和生物量积累均优于其他3种培养基。因此确定木生菌GPY培养基为两株木霉菌种的最佳固体培养基配方。

真菌在培养过程中会向外界分泌多种胞外

酶,用来分解外界复杂的营养物质,以供自身生长所需。纤维素酶是一种诱导酶,在发酵过程中必须有诱导物的作用才会大量分泌。因此,在发酵过程中加入含纤维素的碳源,更容易诱导产生纤维素酶。本试验采用原基桦木屑为发酵培养基原料,能更好地进行产纤维素酶的诱导。利用小麦秸秆和麸皮作为固体产酶培养基的碳源,通过不同培养基配比,确定绿色木霉产纤维素酶的最佳培养基碳源为麦秆:麸皮为4:1<sup>[10]</sup>。利用新鲜稻草粉和豆粕粉作为绿色木霉产纤维素酶的发酵固料,通过对发酵工艺的营养条件和培养条件的优化,确立一套较优的固态发酵工艺<sup>[23]</sup>。对绒毛栓孔菌(*Trametes pubescens*)的培养研究发现,液体培养基中最先利用的碳源为木质素,其次利用淀粉和纤维素<sup>[24]</sup>。

本研究以菌株原基桦木屑为发酵培养基原料,通过更适合该木霉生长的木屑为诱导因子,诱导其产纤维素酶。由于对酶活力单位的定义不尽相同,因此,通过滤纸酶活法,以测定总纤维素酶活为评价指标,确定适用于本木霉菌株产生的纤维素酶活性测定的一种较优方案。

## 4 结 论

本研究结果表明,XLGL201709099菌株与*Trichoderma aureoviride*(AF194007.1)和*Trichoderma aureoviride*(MF871550.1)序列一致性均为100%,确认该木霉菌株为黄绿木霉(*Trichoderma aureoviride*);XLGL201709112菌株与*Trichoderma koningii*(KJ589627.1)和*Trichoderma koningii*(MF871564.1)序列一致性均为100%,系统同源性最高,最终确认该木霉菌株为康氏木霉(*Trichoderma koningii*)。通过固体培养基的筛选,最终确定木生菌GPY培养基为两株木霉的最佳固体培养基配方。利用ABTS法对两株木霉的漆酶酶活进行评价,最终测得黄绿木霉漆酶酶活为(6.319±0.49)U/L;康氏木霉漆酶酶活为(6.138±0.24)U/L。以菌株原基桦木屑为发酵培养基原料,诱导其产纤维素酶,利用滤纸酶活法对两株木霉的总纤维素酶活进行评价,测得黄绿木霉总纤维素酶活为(0.538±0.050)U/g;康氏木霉总纤维素酶活为(0.888±0.044)U/g。

## 参考文献:

[1] 颜一红. 食用菌木霉种类鉴定及木霉、疣孢霉防治研究[D]. 福州:福建农林大学,2011.

- [2] 李丹,张波,李玉. 高产漆酶菌株的筛选及其对秸秆降解初探[J]. 吉林农业科学,2013,38(6):90-94.
- [3] 陈荣庚. 木霉菌的分离鉴定及其抑菌机理研究[D]. 福州:福建农林大学,2008.
- [4] 吴明,冯启明,马海茵,等. 漆酶在制浆造纸中的应用研究进展[J]. 中国造纸学报,2019,34(2):66-71.
- [5] 王馥丽,赵鹏,裴承新,等. 漆酶及其应用研究进展[J]. 生命科学仪器,2017,15(5):19-24.
- [6] 郭梁,徐伟良,李春冬,等. 1种野生多孔菌的分离鉴定及其高产漆酶培养基的筛选[J]. 河南农业科学,2018,47(11):99-104.
- [7] 陈建军,刘梁涛,曹香林. 高效木质素降解菌的筛选及产漆酶条件的研究[J]. 甘肃农业大学学报,2018,53(4):130-136.
- [8] 温学鹏. 枯草芽孢杆菌降解纤维素的作用及纤维素酶基因过表达载体的构建[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2019.
- [9] Zhang Q, Lo C M, Ju L K. Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(4): 753-760.
- [10] 王仪明,张宗舟,蔺海明,等. 绿色木霉固态发酵产纤维素酶活力的研究[J]. 草业科学,2009,26(5):123-127.
- [11] 李春冬,徐伟良,鲁铁,等. 一株锡林郭勒盟木霉的鉴定及其产纤维素酶研究[J]. 中国酿造,2019,38(3):94-98.
- [12] 黄晓梅,赵红晓,范金霞,等. 一株高产纤维素酶绿色木霉菌株诱变选育与发酵研究[J]. 东北农业大学学报,2018,49(6):22-31.
- [13] 刘刚. 不同培养基和pH值对双孢菇母种菌丝生长的影响[J]. 现代农业科技,2014(16):71-74.
- [14] 鲁铁. 几种多孔菌的培养特性及白蜡多年卧孔菌生药学研究[D]. 长春:吉林农业大学,2013.
- [15] 吕英华,杜明,高凯,等. 野生桑黄菌固体培养基配方的优化试验[J]. 蚕业科学,2010,36(4):676-679.
- [16] 图力古尔,鲁铁,刘宇. 多孔菌科4种白腐菌培养特性[J]. 中国食用菌,2013,32(5):21-28.
- [17] 王寿南,陈青君,张国庆,等. 一种野生多孔菌的分离、鉴定、培养条件及抗氧化活性[J]. 应用与环境生物学报,2017,23(1):82-88.
- [18] 刘晓婷. 蒙古口蘑菌丝体生长发育及其漆酶表达特性研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2017.
- [19] 曾璐漫,康信聪,周荣辉,等. 不同培养基成分对灵芝漆酶酶活的影响[J]. 食用菌,2015,37(3):7-8.
- [20] 林俊芳,刘志明,陈晓阳,等. 真菌漆酶的酶活测定方法评价[J]. 生物加工过程,2009,7(4):1-8.
- [21] 赵玉萍,杨娟. 四种纤维素酶酶活测定方法的比较[J]. 食品研究与开发,2006(3):116-118.
- [22] 安琪,吴雪君,吴冰,等. 不同碳源和氮源对金针菇降解木质纤维素酶活性的影响[J]. 菌物学报,2015,34(4):761-771.
- [23] 姜绪林. 绿色木霉固态发酵产纤维素酶的研究[D]. 无锡:江南大学,2005.
- [24] 司静,崔宝凯. 绒毛栓孔菌液体培养过程中胞外酶活性的研究[J]. 基因组学与应用生物学,2012,31(1):70-77.

(责任编辑:王昱)