

# 内生青霉菌纤维素酶在银杏总黄酮提取中的应用研究

赵一璐, 许云峰, 周建芹, 陈韶华, 王剑文\*  
(苏州大学药学院, 苏州 215123)

[摘要] 目的: 利用筛选的高产纤维素酶内生青霉菌的发酵液辅助提取银杏黄酮。方法: 采用单因素分析和正交试验, 以银杏总黄酮提取率为指标, 对酶辅助提取中影响总黄酮提取效果的主要因素(如酶解时间, 温度, pH, 酶料比等)进行研究。结果: 通过单因素试验和正交试验, 得出纤维素酶发酵液酶解银杏叶的最佳条件为: 发酵液以酶料比 15:1 加入银杏干粉中, 在 pH 5.0、温度 50 ℃ 下, 酶解处理 3 h, 该条件下的银杏黄酮提取率达到了 1.33%, 比常规醇提法提高了 18.75%, 与纯酶辅助提取率相近。结论: 内生青霉菌发酵液辅助法是提取银杏总黄酮的有效方法。

[关键词] 纤维素酶; 内生青霉菌; 银杏; 黄酮; 提取

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0013-05

## Application of a Cellulose-producing Endophytic *Penicillium* sp. G-6 on Extraction of Total Flavonoids from *Ginkgo biloba*

ZHAO Yi-lu, XU Yun-feng, ZHOU Jian-qin, CHEN Shao-hua, WANG Jian-wen\*  
(School of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the application of the crude cellulase in the culture of endophytic *Penicillium* sp. G-6 to total flavonoids extraction from leaves of *Ginkgo biloba*. **Method:** The process was studied by single factor analysis and orthogonal design  $L_9(3^4)$  with the extraction rate of total flavonoids as comprehensive index, and the effect of the ratio of dry *G. biloba* leaves to crude enzymatic extracts, temperature, time, and pH value on extraction rate were also studied. **Result:** The extraction rate of total flavonoids was 1.33%, increased by 18.75% than that in regular extraction process, under the condition that dry *G. biloba* leaves were incubated with crude enzymatic extracts with 15:1 (pH 5.0) at 50 ℃ for 3 h. **Conclusion:** The results presented a practical method of cellulase-assistant extraction process on total flavonoids in leaves of *Ginkgo biloba*.

**[Key words]** cellulose; endophytic *Penicillium*; *Ginkgo biloba* L.; total flavones; extraction

中药成分复杂且有效成分含量低, 如何快速有效地从中药中提取、分离和纯化微量成分, 并保持其高活性, 已成为开发中药的关键工序。传统的提取分离方法包括煎煮法、浸渍法、渗滤法、回流法等<sup>[1]</sup>, 这些方法存在有效成分损失大、提取率低、生产周期长、易污染环境等众多问题。随着中药现代化的发

展, 许多新技术如微波<sup>[2]</sup>、超声波<sup>[3]</sup>、酶工程<sup>[4]</sup>和超临界技术<sup>[5]</sup>等迅速涌现, 并取得了显著成效。尤其是酶工程技术<sup>[6,7]</sup>具有反应特异性高、高效、反应条件温和易于控制等优点, 这使其具有更大的应用价值。目前用于酶法提取的酶种类主要有纤维素酶、果胶酶等<sup>[7-9]</sup>, 而其中以纤维素酶最为常用。

植物内生真菌是指生活史的一部分能侵染并定殖在植物组织器官中, 宿主无明显感染症状的一类真菌<sup>[10]</sup>。它们在和植物长期共存和进化过程中建立了一种共生关系<sup>[11]</sup>。史央等比较了大戟科 4 种药用植物内生真菌的纤维素酶、漆酶和多酚氧化酶的活性, 发现茎内的真菌漆酶活性和多酚氧化酶活

[收稿日期] 20100707(001)

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”第五批高层次人才项目 (B2008048)。

[第一作者] 赵一璐, 硕士研究生, 研究方向: 中药生物技术。

[通讯作者] \* 王剑文, 研究员, 博士生导师, Tel: 0512-69561430, E-mail: jwwang@suda.edu.cn

性普遍比叶内真菌高;重阳木内生真菌的漆酶及多酚氧化酶活性比乌桕、大戟和泽漆的内生真菌高,且不同植物以及同一植物不同部位的内生真菌的胞外酶活性存在较大差异<sup>[12]</sup>。肖春玲等从重阳木茎内皮中筛选得到 5 株具有降解纤维素能力的内生真菌,据初步鉴定这 5 株菌株分属于球拟酵母属(*Torulopsis sp.*)、黑曲霉属(*Aspergillus sp.*)和毕赤酵母属(*Pichia sp.*)<sup>[13]</sup>。金波等从槲寄生中分离得到的拟茎点霉属(*Phomopsis sp.*)内生真菌具有较高的纤维素酶活性,其羧甲基纤维素钠酶活为 5.2 U mL<sup>-1</sup>,滤纸酶活为 0.33 U mL<sup>-1</sup>, $\alpha$ -葡萄糖苷酶活为 0.67 U mL<sup>-1</sup><sup>[14]</sup>。这些研究都表明:生活在植物内部的内生真菌具有降解一部分植物木质素和纤维素的能力,具有较高的果胶酶、木聚糖酶、纤维素酶和多酚氧化酶活性。

植物细胞壁是由纤维素、半纤维素、果胶质、木质素等物质构成的致密结构。选用纤维素酶作用于药用植物材料,可以破坏细胞壁的致密构造,从而有利于有效成分的溶出,提高药用成分的提取率<sup>[15]</sup>。银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科银杏属多年生落叶乔木,是我国丰富的经济植物资源,其果实、叶均可药用。银杏叶中的黄酮类化合物是其重要的生理活性物质,不但具有消除自由基抗氧化活性,而且有扩张血管、抗炎、镇痛、调血脂、抗衰老,增强免疫力等多种药理作用<sup>[16]</sup>。已有文献报道运用纤维素酶辅助提取银杏黄酮类化合物,吴梅林等在纤维素酶质量浓度 0.40 g L<sup>-1</sup>,温度 50 ℃,pH 4.5 条件下酶解原料 2 h,再用 70% 乙醇 70 ℃ 下提取,银杏总黄酮得率较传统工艺提高了 18.92%<sup>[17]</sup>。丁兴红等应用纤维素酶处理银杏叶提取银杏叶总黄酮,得率提高了 54.93%<sup>[18]</sup>。然而这些研究围绕的都是纯酶辅助提取,从生产成本和处理条件上都限制了银杏黄酮酶法提取的大规模工业化生产。本文利用筛选的高产纤维素酶内生青霉菌的发酵液辅助提取银杏黄酮类化合物,初步提出了利用内生真菌纤维素酶辅助中药提取的有效方法。

## 1 材料

银杏叶收集自苏州大学独墅湖校区,经苏州大学药学院生药学实验室刘春宇教授鉴定为银杏(*Ginkgo biloba* L.)叶,清洗晾干后粉碎成 40 目的干粉备用。槲皮素、山奈酚、异鼠李素对照品(中国固体制剂制造技术国家工程研究中心,纯度

98%),纤维素酶(国药集团化学试剂有限公司,15 000 U g<sup>-1</sup>,批号 F20090831),甲醇(色谱纯,Tedia Company,批号 907900),其他试剂均为国产分析纯。

PYX-DHS-40X50-S 型恒温培养箱(太仓市试验设备厂);HZQ-X100 型恒温振荡培养箱(上海跃进医疗器械厂);AG 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);LC-20A 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司)。

## 2 方法

**2.1 银杏内生菌的分离、纯化及筛选** 银杏(*Ginkgo biloba* L.)枝条采自苏州大学独墅湖校区,经 75% 酒精及 0.1% 升汞消毒后,无菌条件下切成 1 cm 左右的小段,纵剖为二,剖面向下紧贴于培养基上,28 ℃ 培养多天至菌落生成。菌落在新 PDA 板上传代多次,直至获得纯培养物。以羧甲基纤维素钠为底物,采用刚果红染色法<sup>[19]</sup>,粗筛出 4 株产纤维素酶内生菌。将有脱色圈的菌株挑出,接种于马铃薯液体培养基中振荡培养 5 d 后,采用羧甲基纤维素钠盐法测定酶活,以每 min 生成 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需的酶量为一个酶活性单位(U)<sup>[20]</sup>。复筛获得具有较高纤维素酶活性(5.35 U·mL<sup>-1</sup>)的内生青霉菌(*Penicillium sp.* G-6)。菌种保藏在苏州大学药学院真菌资源与菌种保藏室。

**2.2 培养基** 菌种分离采用 PDA 培养基:马铃薯 20%,葡萄糖 2%,琼脂 1%,pH 自然。纤维素酶初筛采用羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基:CMC-Na 1%,蛋白胨 0.5%,酵母膏 0.05%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15%,MgSO<sub>4</sub> 0.02%,NaCl 0.05%,琼脂 1%,pH 7.0<sup>[19]</sup>。发酵培养基采用综合马铃薯培养基:马铃薯 20%,葡萄糖 2%,琼脂 2%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3%,MgSO<sub>4</sub> 0.15%,维生素 B1 10 mg·L<sup>-1</sup>,酵母膏 0.5%<sup>[21]</sup>。

**2.3 培养条件** 活化菌种:将青霉菌(*Penicillium sp.* G-6)接种于 PDA 平板上活化,28 ℃ 培养 5 d。

摇床发酵:培养基为综合马铃薯培养基,装液量为每 500 mL 摇瓶装液 300 mL,接种量为 5%,摇床转速为 150 r·min<sup>-1</sup>,温度为 28 ℃,恒温振荡培养 7 d 后,抽滤离心所得发酵液 4 ℃ 保存备用。

## 2.4 银杏叶中总黄酮的含量测定

**2.4.1 色谱条件** 银杏总黄酮含量测定采用 HPLC 外标法定量。色谱柱 Agilent C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m);流动相甲醇-0.4% 磷酸溶液 59:41;流速 1.0 mL min<sup>-1</sup>;柱温 30 ℃;进样量 20  $\mu$ L;检测波长 360 nm。

**2.4.2 标准曲线的制备** 精密称取银杏黄酮各对照品, 分别配制成  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  对照品储备液。精密吸取各对照品储备液, 依次稀释成 50, 100, 200, 400, 800  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液, 用  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 进样量为  $20 \mu\text{L}$ , 每一浓度进样 3 次。以各对照品含量 ( $\mu\text{g}$ ) 对峰面积进行回归, 得标准曲线方程。

**2.4.3 精密度试验** 取质量浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的各对照品溶液, 重复进样 6 次, 每次  $20 \mu\text{L}$ , 测定峰面积值, 考察仪器精密度。

**2.4.4 稳定性试验** 精密吸取同一份供试品, 间隔 3 h 进样 1 次, 每次进样  $20 \mu\text{L}$ , 重复 6 次, 测定峰面积并计算总黄酮含量, 考察供试品的稳定性。

**2.4.5 重复性试验** 任选同一批银杏干粉按照供试品项下方法平行制备 6 份供试品, 依法测定, 计算总黄酮含量, 考察此测定方法的重复性。

**2.4.6 加样回收率试验** 平行制备供试品溶液 6 份, 各取  $100 \mu\text{L}$ , 分别加入甲醇  $100 \mu\text{L}$ 、黄酮标准品  $100 \mu\text{L}$ , 混匀, 进样测定。

**2.4.7 供试品的制备** 精密称取银杏干粉 5 g, 置索氏提取器中, 加 70% 乙醇  $50 \text{ mL}$  回流提取 2 h, 抽滤后提取液加等体积石油醚萃取 3 次, 至石油醚相呈无色, 弃石油醚相, 滤液再加等体积乙酸乙酯萃取 3~5 次, 合并乙酸乙酯相, 室温下挥干溶剂后用  $1 \text{ mL}$  甲醇(色谱纯)溶解, 再加入 25% 盐酸  $0.2 \text{ mL}$ ,  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  加热回流 60 min, 放冷,  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 作为供试品待测。

银杏总黄酮含量 = 槲皮素含量 + 山奈酚含量 + 异鼠李素含量

**2.5 纤维素酶发酵液辅助提取银杏黄酮的条件优化** 内生青霉菌发酵液, 经  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 上清液即为纤维素酶粗提液, 测定酶活后  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存, 使用前测酶活。准确称取银杏干粉 3 份, 每份 5 g, 在应用纤维素酶粗提液处理银杏干粉时, 选

择不同的处理时间、温度、pH 及酶料比(发酵液量/投料量,  $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 分别研究各提取条件对总黄酮提取率的影响。根据单因素的试验结果, 选取  $L_9(3^4)$  正交试验设计, 因素与水平见表 1, 并进行极差分析。

表 1 内生菌纤维素酶辅助总黄酮提取正交试验因素水平表

水平	A 温度/ $^\circ\text{C}$	B pH	C 酶解时间/h	D 酶料比/ $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$
1	40	4	1	10 1
2	50	5	2	15 1
3	60	6	3	20 1

**2.6 酶法提取银杏黄酮的验证性试验** 我们设计了 3 组试验比较, 分别为纤维素酶发酵液处理组、纯纤维素酶处理组及未加酶处理对照组。未加酶处理对照组: 称取干燥银杏干粉 50 g, 加入  $500 \text{ mL}$  70% 乙醇,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  加热浸提 3 h, 抽滤, 浸提液先石油醚脱脂至无色, 再用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并萃取液, 减压旋转至  $50 \text{ mL}$ , 室温下挥干即为供试品。纯纤维素酶处理组: 称取干燥银杏干粉 50 g, 按酶料比 15 1 加入 pH 5.0 的柠檬酸缓冲液, 再加入纤维素酶  $0.15 \text{ g}$ ,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下, 酶解处理 3 h。纤维素酶发酵液处理组: 称取干燥银杏干粉 50 g, 按酶料比 15 1 加入纤维素酶发酵液, 在 pH 5.0、温度  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  下, 酶解处理 3 h。

### 3 结果与讨论

**3.1 银杏叶中总黄酮的测定** 本实验采用 HPLC 外标法测定银杏总黄酮的含量。如图 1 所示, 在上述色谱条件下, 分别取对照品溶液及供试品溶液进样测定, 得到槲皮素、山奈酚、异鼠李素等 3 种对照品的特征峰, 与杂质峰分离良好, 无干扰。各对照品量 ( $\mu\text{g}$ ) 对峰面积回归标准曲线方程分别为:  $Y = 130116X + 32006$  ( $R^2 = 0.9991$ );  $Y = 158352X + 24376$  ( $R^2 = 0.9996$ );  $Y = 93273X + 87252$  ( $R^2 = 0.9993$ )。结果表明,

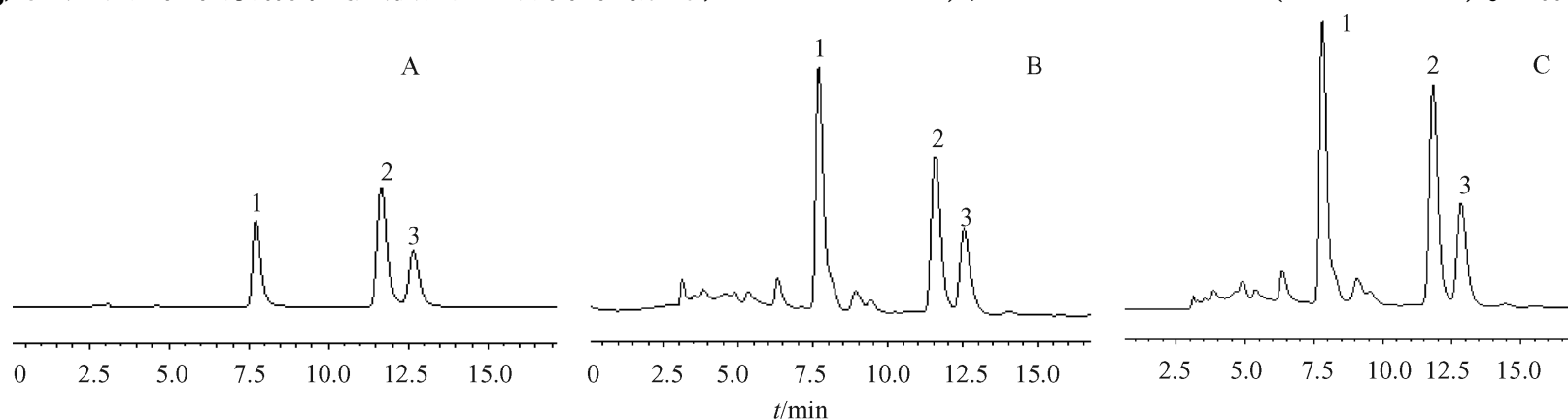


图 1 银杏黄酮对照品(A) 常规提取供试品(B) 和酶法提取供试品(C) 的 HPLC  
1. 槲皮素; 2. 山奈酚; 3. 异鼠李素

槲皮素、山奈酚、异鼠李素都在 2.5 ~40 μg 与峰面积线性关系良好。精密度试验结果显示各对照品峰面积积分值的 RSD 分别为 1.21%, 2.15%, 1.02% ( $n=6$ ), 表明仪器精密度良好。稳定性试验结果表明银杏黄酮提取液供试品中各成分 RSD 分别为 1.17%, 0.64%, 1.82% ( $n=6$ ), 表明供试品溶液在 18 h 内稳定。重复性试验结果显示黄酮提取液供试品中各成分 RSD 分别为 1.18%, 3.44%, 0.47% ( $n=6$ )。加样回收率试验中黄酮提取液供试品平均回收率分别为 102.12%, 105.72%, 96.52%, RSD 分别为 1.27%, 0.73%, 2.29% ( $n=6$ )。

### 3.2 产纤维素酶内生菌发酵液辅助提取条件

**3.2.1 纤维素酶法提取的单因素试验** 当应用 75 mL 内生青霉菌粗酶液处理 5 g 银杏干粉, 在 50 , pH 3 ~7 的条件下, 酶解 3 h 后, 银杏总黄酮提取率相比未加酶对照组提高了 7.13% ~28.7%, 最佳酶解 pH 为 5.0 (图 2)。加酶处理时, 酶解温度 (30 ~70 ), 酶解时间 (1 ~5 h) 和酶料比 (10 1 ~30 1) 单一因子变化对银杏总黄酮提取率影响不显著。

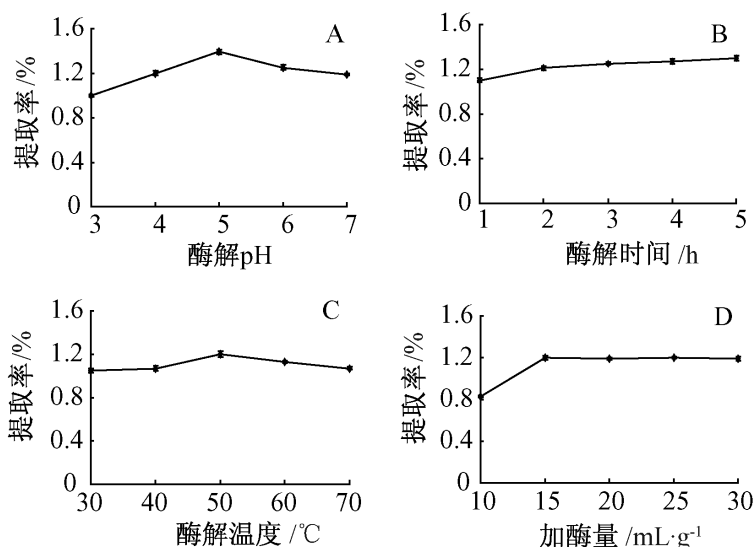


图 2 酶解 pH(A), 时间(B), 温度(C) 及加酶量(D) 对纤维素酶作用下总黄酮提取率的影响

**3.2.2 纤维素酶法提取的正交试验** 我们进一步采用正交试验, 分析各因子对提取率的影响。结果表明(表 2): 4 个影响因子对银杏黄酮提取率的影响程度为 pH > 加酶量 > 酶解温度 > 酶解时间。由表 3 可知, 因素 B 有显著性差异, 说明 pH 对银杏黄酮的提取率有较大的影响, 因此只能选择在正交试验中有最大  $K$  值的水平; 因素 A、C、D 均无显著性差异, 说明酶解温度、酶解时间、加酶量在正交设计的 4 水平内对银杏黄酮的提取率无显著性影响, 结合单因素试验, 最后确定酶法提取银杏黄酮的最佳工艺条件为  $A_2B_2C_3D_2$ , 即酶解温度 50 、pH 5.0、酶料比 15 1、酶解时间 3 h。

**3.3 纤维素酶法提取银杏黄酮的验证试验** 由表 4 可知酶法提取率明显高于常规醇提法, 而发酵液辅助提取的提取率与纯酶相当。

表 2 内生菌纤维素酶辅助总黄酮提取正交试验结果

	A	B	C	D	提取率 / %
1	40	4	2	20	1.13
2	50	4	1	10	1.15
3	60	4	3	15	1.19
4	40	5	1	15	1.29
5	50	5	3	20	1.29
6	60	5	2	10	1.18
7	40	6	3	10	1.20
8	50	6	2	15	1.30
9	60	6	1	20	1.21
$K_1$	3.620	3.470	3.650	3.530	
$K_2$	3.740	3.760	3.610	3.780	
$K_3$	3.580	3.710	3.680	3.630	
R	0.053	0.097	0.023	0.083	

表 3 正交试验提取率方差分析

来源	SS	f	MS	F	P
A	0.005	2	0.002 3	5.622	
B	0.016	2	0.008 0	19.486	< 0.05
C	0.001	2	0.000 4	1.000	
D	0.011	2	0.005 3	12.838	
误差	0.001	2	0.000 4		
总和	0.032	8			

$$F_{0.05}(2, 2) = 19, F_{0.01}(2, 2) = 99$$

表 4 不同提取方法的比较 ( 珣±s, n=3)

提取方法	投料量 / g	总黄酮 / g	提取率 / %
常规醇提	50	0.56 ±0.03	1.12 ±0.01
纤维素酶发酵液	50	0.67 ±0.02	1.33 ±0.02
纯酶	50	0.66 ±0.05	1.32 ±0.01

## 4 结论

本文在银杏黄酮常规提取过程中应用产纤维素酶内生菌发酵液预处理样品, 通过单因素试验和正交试验, 优化了提取条件: 发酵液以酶料比 15 1 加入银杏干粉中, 在 pH 5.0、温度 50 下, 酶解处理 3 h, 该条件下的银杏黄酮提取率达到了 1.33%, 比常规醇提法提高了 18.75%, 与纯酶辅助提取基本相当。我们曾应用内生镰刀菌漆酶辅助提取槐米总黄酮, 总黄酮提取率达 11.4%, 比常规提取法提高了 28.7%<sup>[22]</sup>。吴鹏等用植物来源复合酶(含纤维素

酶、-鼠李糖苷酶、-淀粉酶等, CMC 酶活  $1.0 \times 10^6$   $U g^{-1}$ ) 提取银杏叶黄酮, 总黄酮提取率比传统方法提高了 55.76%<sup>[23]</sup>。孙萍等应用纤维素酶和果胶酶辅助提取沙枣黄酮, 黄酮提取率比普通的超声辅助法提高了 32.3%<sup>[24]</sup>。然而这些研究大都应用纯酶辅助提取, 从生产成本和处理条件上都限制了银杏黄酮酶法辅助提取的大规模工业化生产。内生菌粗酶液的应用相对于纯酶成本进一步降低, 而且工业生产中粗酶液的大规模发酵获得也较容易实现, 所以使用微生物发酵产酶提取中药材是一个切实可行的新方法, 其工业前景十分广阔, 值得进一步开发研究。

### [参考文献]

- [1] 许明淑, 罗明芳, 刑新会, 等. 酶法强化中药提取的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(12): 37.
- [2] 高岐, 刘宏文. 洋葱中总黄酮的微波提取法[J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 218.
- [3] 郑静, 常迺滔, 林英, 等. 超声波法和超声波酶法提取灵芝多糖的条件研究[J]. 食用菌学报, 2006, 13(1): 48.
- [4] 朱奇, 陈彦, 陈坤, 等. 仙人掌黄酮类物质提取工艺的比较研究[J]. 江苏农业科学, 2006(3): 162.
- [5] 李美丽. 超临界技术在中药中的应用[J]. 中国医药卫生, 2005, 6(16): 112.
- [6] Zhang X Y, Xu C Y, Wang H X. Pretreatment of bamboo residues with *coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis [J]. *J Biosci Bioengin*, 2007, 104(2): 149.
- [7] 张黎明, 张露亿, 杜连祥. 酶解法提取胡芦巴种子中薯蓣皂苷元的工艺研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(2): 161.
- [8] 陈庆庆, 夏黎明. 纤维素酶对豆粕异黄酮提取的影响[J]. 化工学报, 2007, 58(1): 136.
- [9] 马秸云, 赵晶岩, 姜颖, 等. 纤维素酶在黄连提取工艺中的应用[J]. 中草药, 2002, 31(2): 103.
- [10] Petri O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews J H and Hirano S S eds. *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer-Verlag, 1991: 179.
- [11] Krings M, Taylor T N, Haas H, et al. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses [J]. *New Phytologist*, 2007, 174(3): 648.
- [12] 史央, 戴传超, 陆玲, 等. 大戟科 4 种药用植物内生真菌 3 种胞外酶活性的比较[J]. 生物资源与环境学报, 2002, 11(2): 17.
- [13] 肖春玲, 蒙玉娟, 邹小明, 等. 重阳木降解纤维素内生真菌的筛选研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(4): 956.
- [14] 金波, 赵娴, 劳一敏, 等. 1 株高效降解纤维素的槲寄生内生真菌研究[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(6): 27.
- [15] 梁京云, 柴家前, 刘永庆. 中草药化学成分提取新方法[J]. 山东畜牧兽医, 2007, 28(6): 34-36.
- [16] 黄爱玲. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(10): 71-72.
- [17] 吴梅林, 周春山, 陈龙胜, 等. 酶法提取银杏黄酮类化合物研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(6): 557.
- [18] 丁兴红, 孙杰, 喻治霞, 等. 纤维素酶辅助提取银杏叶总黄酮的工艺条件[J]. 林业科技开发, 2009, 23(4): 66.
- [19] 吴敏峰, 耿秀蓉, 祝小, 等. 产纤维素酶芽胞杆菌的分离鉴定[J]. 饲料工业, 2006, 27(20): 21.
- [20] 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, 27(3): 116.
- [21] 朱明旗, 曹支敏, 李振歧. 栓菌属高产漆酶菌株的筛选及其发酵产酶条件研究初报[J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 119.
- [22] 许云峰, 张臻, 周建芹, 等. 内生镰刀菌漆酶辅助提取槐米中总黄酮的研究[J]. 中草药, 2008, 39(11): 1637.
- [23] 吴鹏, 郭峰, 陈龙, 等. 银杏叶黄酮的酶法提取及生物转化研究[J]. 特产研究, 2007, (4): 22.
- [24] 孙萍, 马彦梅, 廉宜君, 等. 正交试验优化沙枣果肉中黄酮的酶辅助提取研究[J]. 中草药, 2009, 40: 165.

[责任编辑 仝燕]