

台湾乳白蚁和黄翅大白蚁消化道主要木质纤维素降解酶活性比较*

宁娜¹ 张倪² 吴燕¹ 倪金凤^{1**}

¹山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250000

²西北民族大学医学院 兰州 730000

摘要 台湾乳白蚁和黄翅大白蚁是我国南方广泛分布的两种白蚁, 为了解黄翅大白蚁木质纤维素降解情况, 对其消化道木质纤维素酶活性进行测定并与台湾乳白蚁进行比较分析. 以同一时间、同一地区采集的两种白蚁为材料, 同样方法、平行测定两种白蚁消化道各部位(唾液腺、前肠、中肠和后肠)的内切- β -1, 4-葡聚糖酶(EG)、外切- β -1, 4-葡聚糖酶(CBH)、 β -葡萄糖苷酶(BG)和木聚糖酶(Xyl)活性. 结果显示, 所测几种酶在两种白蚁肠道的活性分布明显不同, 在黄翅大白蚁中, 以上4种酶活性集中分布于中肠, 除BG为43%, 其余3种酶活都在60%以上; 而在台湾乳白蚁中, EG酶活性的81%分布于唾液腺, Xyl和CBH酶活性主要分布于后肠, 分别是93%和58%, BG酶活较均匀地分布于中肠、后肠和唾液腺. 另外黄翅大白蚁肠道3种酶, BG、CBH和Xyl, 其各自的总酶活均高于台湾乳白蚁相应的酶活. 本研究有助于进一步了解黄翅大白蚁木质纤维素降解酶. 图2 表2 参28

关键词 台湾乳白蚁; 黄翅大白蚁; 纤维素酶; 木聚糖酶; 酶活

CLC Q965

Comparison of lignocellulolytic enzyme activities of the fungus-growing termite *Macrotermes barneyi* and the lower termite *Coptotermes formosanus**

NING Na¹, ZHANG Ni², WU Yan¹ & NI Jinfeng^{1**}

¹State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250000, China

²Medical School, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730000, China

Abstract The fungus-growing termite *Macrotermes barneyi* and the lower termite *Coptotermes formosanus* are widely distributed in southern China. To learn the lignocellulose degradation system of *M. barneyi*, this study aimed to determine the activities of four enzymes (endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase, β -glucosidase, and xylanase) in its digestive tract and compare with those of *C. formosanus*. *C. formosanus* and *M. barneyi* collected in the same region at the same time were dissected and subjected to lignocellulolytic enzyme assay using the same method. The results showed significant differences in enzyme activities and intestinal distributions in the guts of the two termite species. The total activity levels of β -glucosidase, exo- β -1,4-glucanase, and xylanase were higher in *M. barneyi* than in *C. formosanus*. Additionally, in *M. barneyi*, the major activities of all four enzymes were found predominantly in the midgut; but in *C. formosanus*, endo- β -1,4-glucanase was mainly distributed in the salivary glands (81%), while xylanase and exo- β -1,4-glucanase were mainly located in the hindgut (93% and 58%, respectively). The differences of intestinal enzyme activity between *C. formosanus* and *M. barneyi* indicate different lignocellulose degradation system. The information will be helpful for further investigation into the lignocellulolytic mechanism in fungus-growing termites.

Keywords *Coptotermes formosanus*; *Macrotermes barneyi*; lignocellulolytic enzymes; enzyme activity

白蚁是自然界木质纤维素的重要分解者^[1-2], 了解白蚁木质纤维素降解机制对生物质的再利用有借鉴和启示作用, 而分析白蚁肠道木质纤维素降解酶的分布和活性大小是研究

其木质纤维素降解机制的基础. 木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素组成. 纤维素降解酶包括内切 β -1,4-葡聚糖酶(Endo- β -1,4-glucanase, EG)、外切 β -1,4-葡聚糖酶(Exo- β -1,4-glucanase, CBH)和 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, BG); 木聚糖酶包括内切 β -1,4-木聚糖酶(Endo- β -1,4-xylanase)和 β -木糖苷酶(β -xylosidase), 主要参与半纤维素降解, 而漆酶等与木质素的降解相关^[3].

白蚁可分为低等白蚁(约占总数的25%)和高等白蚁(约占总数的75%)两大类^[3]. 低等白蚁主要食木, 而高等白蚁食

收稿日期 Received: 2014-11-18 接受日期 Accepted: 2015-03-04

*国家重点基础研究发展计划(973计划)子课题(2011CB707402)和国家自然科学基金项目(31272370、30870085)资助 Supported by the State Key Basic R & D Program of China (973 Program, 2011CB707402) and the National Natural Science Foundation of China (31272370, 30870085)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: jinfngni@sdu.edu.cn)

性复杂,包括木材、腐殖质、土壤、真菌等。白蚁肠道酶活大小和分布受种类、食性等多种因素影响。低等白蚁方面的研究相对较多,人们对其肠道酶活性、木质纤维素的降解有比较清楚的认识^[4-8]。一般认为低等白蚁自身产生的内源性纤维素酶(唾液腺,前肠)和肠道共生体(后肠)产生的纤维素酶、木聚糖酶在低等白蚁体内协同作用消化木质纤维素^[9-10]。相比于低等白蚁,对种类占多数的高等白蚁木质纤维素降解酶系了解较少^[3]。

黄翅大白蚁是广泛分布于我国南方的高等培育白蚁,黄翅大白蚁与体内外细菌和真菌形成三维共生关系,其体内木质纤维素的降解更加复杂。本研究对其肠道的纤维素酶、木聚糖酶和漆酶活性进行初步分析,同时对采集于同一区域的台湾乳白蚁肠道酶活性进行平行测定,比较它们肠道酶活性的差异,旨在为进一步研究黄翅大白蚁的木质纤维素降解提供信息。

1 材料与方法

1.1 供试白蚁

台湾乳白蚁和黄翅大白蚁均采自湖南省耒阳县木兰村。我们将提前做好的樟木盒子(40 cm × 30 cm × 15 cm)埋藏于阴凉潮湿的土坡或树丛中,来诱捕白蚁。一个月后,将盒子快速收集回来,带到实验室挑选工蚁进行后续的实验工作。台湾乳白蚁和黄翅大白蚁的区分主要通过兵蚁形态特征判断。

1.2 实验仪器及试剂

1.2.1 实验仪器 解剖镜(OLYMPUS);台式离心机(Eppendorf公司);恒温水浴摇床(上海知楚仪器有限公司);紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司);恒温金属浴(杭州博日科技有限公司)。

1.2.2 主要试剂 羧甲基纤维素钠;醋酸;醋酸钠;3,5-二硝基水杨酸;酒石酸钾钠;对硝基苯酚;葡萄糖;碳酸钠;对硝基苯酚;蛋白酶抑制剂(德国Roche公司);对-硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)(Sigma公司);燕麦木聚糖(Sigma公司);对硝基苯基-β-D-纤维二糖苷(pNPC)(Sigma公司);2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)。以上无特殊说明试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 白蚁解剖及粗酶提取物的制备

取25只台湾乳白蚁的工蚁和20只黄翅大白蚁的大工蚁,依次通过无菌水、75%酒精和0.1 mol/L SAB缓冲液(pH 5.5)漂洗,然后置于解剖镜下进行解剖。用镊子夹住头部,解剖刀压住尾尖部并慢慢拉出白蚁肠道,分离唾液腺,将肠道组织分为前肠、中肠和后肠。分离的组织分别加入到装有200 μL 0.1 mol/L醋酸钠缓冲液(含蛋白酶抑制剂)的2 mL微量离心管中,冰浴状态下研磨,然后在4 °C下20 000 g离心10 min,收集上清液,再向每个装有上清液的试管中加入醋酸钠缓冲液至总体积1 mL,最后得到的上清液用作酶活性测定的粗酶提取物。

1.4 酶活性测定

1.4.1 内切-β-1,4-葡聚糖酶活性的测定 以1%的羧甲基纤维素钠(以0.1 mol/L pH 5.5的醋酸-醋酸钠缓冲液为溶剂配制)为底物,用3,5-二硝基水杨酸(DNS)法来测定产生的还原糖。

吸取粗酶提取物50 μL加入到200 μL底物中混合均匀并在37 °C下温水浴30 min。反应后,加入100 μL的DNS溶液并煮沸5 min,然后将混合物立即放入冰水中,加入650 μL蒸馏水使体积达到1 mL,测量520 nm处的吸光度。将37 °C、pH 5.5条件下,每分钟产生1 μmol还原糖(葡萄糖)所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

1.4.2 木聚糖酶活性的测定 以1%的燕麦木聚糖(以0.1 mol/L pH 5.5的醋酸-醋酸钠缓冲液为溶剂配制)为底物,用1.3.1的DNS法来测定还原糖。反应后,将混合物以6 000 g/min离心1 min,取上清液并测量520 nm处的吸光度,分析和测定酶活性的方法同内切β-1,4-葡聚糖酶的测定。

1.4.3 β-葡萄糖苷酶活性的测定 以0.1 mol/L的醋酸钠缓冲液(pH 5.5)为溶剂配制5 mmol/L的对-硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)作为底物。取200 μL底物与50 μL粗酶液混合均匀并在37 °C下温水浴30 min,之后加入1 mL 0.6 mol/L的Na₂CO₃终止该实验,测量410 nm的吸光度。每分钟产生1 μmol对硝基苯酚所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

1.4.4 外切-β-1,4-葡聚糖酶活性的测定 以0.1 mol/L的醋酸钠缓冲液(pH 5.5)为溶剂配制1 mmol/L的对硝基苯基-β-D-纤维二糖苷(pNPC)作为底物。分析和测定酶活性的方法同1.4.3中β-葡萄糖苷酶的测定。

1.4.5 漆酶活性的测定 用2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)作反应底物来测定漆酶的活性。反应混合物的制备如下:将800 μL 0.1 mol/L的醋酸钠缓冲液,150 μL 1 mmol/L的ABTS和50 μL的粗酶提取物混合并彻底搅拌均匀,在420 nm处检测其反应动力学曲线。以上所有酶活的测定都至少进行3次。

2 结果与分析

2.1 白蚁解剖

台湾乳白蚁和黄翅大白蚁均为我国南方常见白蚁,根据明显的兵蚁形态学特征和经验来区分白蚁种类。为防止黄翅大白蚁与黑翅大白蚁混淆,进一步测序分析黄翅大白蚁线粒体的COII基因,测序结果表明为黄翅大白蚁^[11]。台湾乳白蚁肠道形态图参见文献[12]。黄翅大白蚁肠道形态如图1所示,F为前肠部分,与前肠相连细长部分是中肠(M),中肠后面深色膨大部位为后肠(H)。唾液腺位于头部,从肠道拉出时受到破坏,呈弥散状(SG)。



图1 培育白蚁黄翅大白蚁肠道的形态。SG: 唾液腺; F: 前肠; M: 中肠; H: 后肠。

Fig. 1 Gut morphology of fungus-growing termite *Macrotermes barneyi*. SG: salivary gland; F: foregut; M: midgut; H: hindgut.

2.2 内切β-1,4-葡聚糖酶 (EG) 和木聚糖酶 (Xyl)

由表1 可见, 内切-β-1, 4-葡聚糖酶 (EG) 和木聚糖酶 (Xyl) 活性在两种白蚁肠道中的分布明显不同. 对于台湾乳白蚁, EG活性主要存在于唾液腺 (81.06%), 这与早期台湾乳白蚁中的报道比例 (80.8%)^[4]基本一致, 但与采集于日本冲绳的台湾乳白蚁中的研究报道^[13]不同. 另外由于检测酶的方法和使用的单位不同, 酶的绝对活性数值不一样. Xyl活性主要存在于后肠 (93.26%), 与报道的黄胸散白蚁 (96%) 和台湾乳白蚁 (82.2%)^[14-15]基本相似. 在黄翅大白蚁中, EG酶和Xyl酶活主要都存在于中肠 (分别是83.57%, 83.52%). 唾液腺中的EG酶活和后肠的Xyl酶活都很低. EG酶活在黄翅大白蚁肠道中的分布基本上与相关研究报道^[16-18]一致. 在高等食木白蚁中, 主要EG酶活 (99%) 也分布于中肠^[13], 但是高等培菌白蚁——黑翅土白蚁的EG酶活主要分布于唾液腺 (69.1%)^[13]. 比较消化道总酶活, 台湾乳白蚁EG酶的总酶活约是黄翅大白蚁总酶活的3.3倍 (图2), 而台湾乳白蚁的Xyl酶总酶活 (288 mU/白蚁), 低于黄翅大白蚁Xyl酶活性 (368 mU/白蚁) (图2).

2.3 β-葡萄糖苷酶 (BG) 和外切-β-1,4-葡聚糖酶 (CBH)

不同于EG和Xyl酶两种酶活性在肠道中的集中分布, BG活在两种白蚁肠道中的分布相对比较均匀 (表2). 在台湾乳白蚁中, BG活性几乎均匀地分布在中肠 (37.52%) 和后肠 (35.17%), 与之前报道结果^[19]相似. BG酶活性在唾液腺中稍低 (24.44%), 在前肠中只检测到微弱的BG活性 (2.87%). 在黄翅大白蚁中, 中肠的BG活性最高 (43%), 其次为唾液

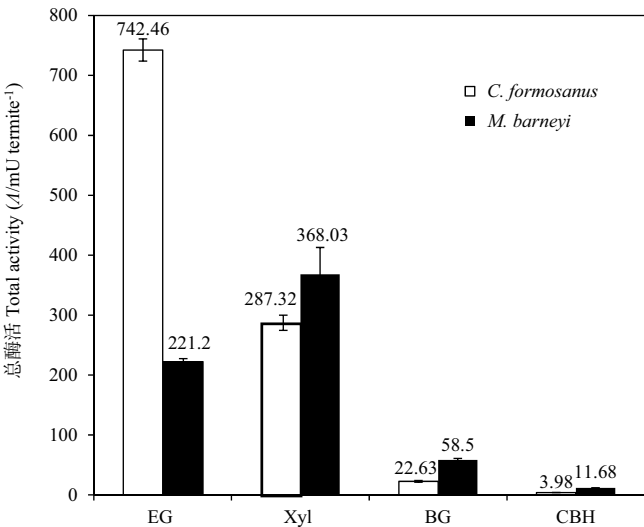


图2 台湾乳白蚁和黄翅大白蚁消化道内切葡聚糖酶 (EG)、木聚糖酶 (Xyl)、β-葡萄糖苷酶 (BG) 和外切葡聚糖酶 (CBH) 总酶活比较.
Fig. 2 Comparison of the total activities of endo-β-1,4-glucanase, xylanase, β-glucosidase and exo-β-1,4-glucanase between *M. barneyi* and *C. formosanus*. EG: endo-β-1,4-glucanase; Xyl: xylanase; BG: β-glucosidase; CBH: exo-β-1,4-glucanase.

腺 (30%), 前肠和后肠中BG活性都比较低 (分别是10%和16%). 从酶活性的绝对数值看, 黄翅大白蚁消化道各部位的BG活性都高于台湾乳白蚁, 黄翅大白蚁消化道总BG酶活性约是台湾乳白蚁BG总酶活的2.59倍 (图2). 在两种白蚁消化道中, CBH活性都比较低, 在台湾乳白蚁中, 主要CBH酶活存在于后肠 (58.54%), 而黄翅大白蚁中, 主要CBH酶存在于中

表1 内切葡聚糖酶和木聚糖酶在台湾乳白蚁和黄翅大白蚁肠道内的分布
Table 1 Intestinal distribution of endoglucanase and xylanase in *Coptotermes formosanus* and *Macrotermes barneyi*

白蚁 Termite	酶及百分比 Enzyme	唾液腺 Salivary gland	前肠 Foregut	中肠 Midgut	后肠 Hindgut
台湾乳白蚁 <i>C. formosanus</i>	内切葡聚糖酶 EG (A/mU termite ⁻¹)	601.83 ± 13.66	17.43 ± 1.33	46.33 ± 1.82	76.87 ± 1.77
	P/%	81.06	2.35	6.24	10.35
	木聚糖酶 Xyl (A/mU termite ⁻¹)	2.96 ± 0.26	3.60 ± 0.40	12.80 ± 1.45	267.96 ± 10.61
	P/%	1.03	1.25	4.45	93.26
黄翅大白蚁 <i>M. barneyi</i>	内切葡聚糖酶 EG (A/mU termite ⁻¹)	9.55 ± 0.17	5.65 ± 0.13	182.69 ± 3.46	23.31 ± 1.33
	P/%	4.32	2.56	83.57	10.54
	木聚糖酶 Xyl (A/mU termite ⁻¹)	7.74 ± 0.28	8.24 ± 0.54	307.37 ± 41.43	44.68 ± 2.64
	P/%	2.1	2.24	83.52	12.14

一个酶活单位 (Unit) 定义为37 °C、pH 5.5反应条件下, 每分钟产生1 μmol还原糖 (相当于葡萄糖) 所需要的酶量. 所得数值是至少3次测定值的平均数.
One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that can produce 1 μmol of reducing sugar (glucose equivalent) per minute at 37 °C and pH 5.5. Values are means of at least three assessments.

表2 β-葡萄糖苷酶和外切葡聚糖酶在台湾乳白蚁和黄翅大白蚁肠道内的分布
Table 2 Intestinal distribution of β-glucosidase and exoglucanase in *Coptotermes formosanus* and *Macrotermes barneyi*

白蚁 Termite	酶种类及百分比 Enzyme	唾液腺 Salivary gland	前肠 Foregut	中肠 Midgut	后肠 Hindgut
台湾乳白蚁 <i>C. formosanus</i>	β-葡萄糖苷酶 BG (A/mU termite ⁻¹)	5.53±0.08	0.65 ± 0.01	8.49 ± 1.02	7.96 ± 0.40
	P/%	24.44	2.87	37.52	35.17
	外切葡聚糖酶 CBH (A/mU termite ⁻¹)	0.74±0.03	0.04 ± 0.00	0.87 ± 0.03	2.33 ± 0.02
	P/%	18.59	1.01	21.86	58.54
黄翅大白蚁 <i>M. barneyi</i>	β-葡萄糖苷酶 BG (A/mU termite ⁻¹)	17.80±1.31	6.16 ± 0.03	25.16 ± 0.92	9.38 ± 0.15
	P/%	30.43	10.53	43.01	16.03
	外切葡聚糖酶 CBH (A/mU termite ⁻¹)	0.87±0.01	0.98 ± 0.02	7.88 ± 0.13	1.95 ± 0.02
	P/%	7.45	8.39	67.45	16.70

一个酶活单位 (Unit) 为37 °C、pH 5.5反应条件下, 每分钟产生1 μmol对硝基苯酚所需要的酶量. 所得数值是至少3次测定值的平均数.
One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that can produce 1 μmol of p-nitrophenol per minute at 37 °C and pH 5.5. Values are means of at least three assessments.

肠(67.45%)。黄翅大白蚁消化道总CBH酶活高于台湾乳白蚁CBH酶活(图2)。

2.4 漆酶

漆酶的活性仅在7月份采集的黄翅大白蚁的中肠和后肠中检测到,漆酶在中肠的活性大约是后肠的2倍,9月份采集的黄翅大白蚁的肠道中没有检测出漆酶的活性,所有时期采集到的台湾乳白蚁都未能检测出漆酶的活性。

3 讨论

本研究的目的是探究内切 β -1,4-葡聚糖酶、外切 β -1,4-葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶3种纤维素酶以及木聚糖酶(主要是内切木聚糖酶)和漆酶在黄翅大白蚁肠道内的活性变化和分布规律,并与台湾乳白蚁肠道对应酶活进行平行比较分析。尽管纤维素酶和木聚糖酶活性在几种低等白蚁或高等白蚁中都有报道^[4, 14, 20-22]。但是白蚁肠道酶活受多种因素影响,它不仅与种类相关,还与食性、培养方式、采集白蚁时间、地点以及酶活性测定方法、酶活定义等多种因素相关^[13, 17, 19, 23-25]。本研究同时对两种食性不同的白蚁肠道酶活性进行测定,有利于数据间的比较分析,也为进一步了解高等培菌白蚁木质纤维素酶降解提供信息。

低等白蚁台湾乳白蚁和高等培菌白蚁黄翅大白蚁二者食性不同,导致其消化道木质纤维素降解酶活性分布不一样。本研究获得的两种白蚁的酶活性分布与之前的报道有一致之处,也有不同处。以单位白蚁肠道总酶活计算比较两种白蚁,黄翅大白蚁体内的 β -葡萄糖苷酶、外切 β -1,4葡聚糖酶和木聚糖酶的总活性水平高于台湾乳白蚁(图2),特别是 β -葡萄糖苷酶和木聚糖酶的活性。众所周知,台湾乳白蚁是最具破坏力的昆虫之一,本实验结果预示黄翅大白蚁有较高的木质纤维素降解效率。外切葡聚糖酶是降解结晶纤维素的主要酶,其酶活性主要存在于低等白蚁后肠,预示由后肠的共生微生物产生^[25]。对于高等培菌白蚁, Martin曾提出获得性消化酶假说^[16],即培菌白蚁从外界获得外切葡聚糖酶,然而外切葡聚糖酶的高酶活性仅存在于中肠,而非唾液腺、后肠等其它部位,另外中肠微生物量少,预示高酶活可能来自于白蚁自身产生的酶,但还需要进一步的研究和证明。关于漆酶,在低等白蚁*Reticulitermes flavipes*唾液腺和前肠中检测到活性^[26]。而本实验在低等白蚁台湾乳白蚁的体内没有检测到漆酶的活性,其原因可能是白蚁种类不同或者所测酶活所用底物不同。但是同样测定条件下在黄翅大白蚁的中肠和后肠中检测到了漆酶活性,因为黄翅大白蚁属于培菌白蚁,其活性可能来自其共生真菌^[27-28]。

总之,我们对采集于同一地区的两种南方常见白蚁——属于低等白蚁的台湾乳白蚁和高等培菌白蚁的黄翅大白蚁,同时进行了肠道木质纤维素降解酶的活性检测,发现所测定的4种木质纤维素降解酶在两种白蚁消化道中的分布明显不同。台湾乳白蚁消化道酶活性主要分布于唾液腺或后肠,与低等白蚁木质纤维素降解酶系相对应^[9, 10, 15]。作为高等培菌白蚁的黄翅大白蚁,所测定的4种木质纤维素降解酶活性集中分布于中肠,预示其不同于低等白蚁的木质纤维素降解体系。本研究结果为深入了解高等白蚁特别是黄翅大白蚁的木

质纤维素酶和降解机制奠定了基础。

参考文献 [References]

- Ohkuma M. Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61** (1): 1-9
- Kudo T. Termite-microbe symbiotic system and its efficient degradation of lignocellulose [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, **73** (12): 2561-2567
- Ni J, Tokuda G. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota [J]. *Biotechnol Adv*, 2013, **31** (6): 838-850
- Nakashima K, Azuma J. Distribution and properties of endo-beta-1,4-glucanase from a lower termite, *Coptotermes formosanus* (Shiraki) [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, **64** (7): 1500-1506
- Watanabe H, Tokuda G. Animal cellulases [J]. *Cellular Mol Life Sci*, 2001, **58** (9): 1167-1178
- Nakashima KI, Watanabe H, Azuma JI. Cellulase genes from the parabasal symbiont *Pseudotrichonympha grassii* in the hindgut of the wood-feeding termite *Coptotermes formosanus* [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, **59** (9): 1554-1560
- Todaka N, Moriya S, Saita K, Hondo T, Kiuchi I, Takasu H, Ohkuma M, Piero C, Hayashizaki Y, Kudo T. Environmental cDNA analysis of the genes involved in lignocellulose digestion in the symbiotic protist community of *Reticulitermes speratus* [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, **59** (3): 592-599
- Tartar A, Wheeler MM, Zhou X, Coy MR, Boucias DG, Scharf ME. Parallel metatranscriptome analyses of host and symbiotic gene expression in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes* [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2009, **2**: 25
- Nakashima K, Watanabe H, Saitoh H, Tokuda G, Azuma JI. Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, **32** (7): 777-784
- Scharf ME, Karl ZJ, Sethi A, Boucias DG. Multiple levels of synergistic collaboration in termite lignocellulose digestion [J]. *PLoS ONE*, 2011, **6** (7): e21709
- Wei SJ, Ni JF, Yu ML, Shi BC. The complete mitochondrial genome of *Macrotermes barneyi* Light (Isoptera: Termitidae) [J]. *Mitochondrial DNA*, 2012, **23** (6): 426-428
- Watanabe H, Tokuda G. Cellulolytic systems in insects [J]. *Annu Rev Entomol*, 2010, **55**: 609-632
- Tokuda G, Lo N, Watanabe H, Arakawa G, Matsumoto T, Noda H. Major alteration of the expression site of endogenous cellulases in members of an apical termite lineage [J]. *Mol Ecol*, 2004, **13** (10): 3219-3228
- Slaytor M, Sugimoto A, Azuma J, Murashima K, Inoue T. Cellulose and xylan utilisation in the lower termite *Reticulitermes speratus* [J]. *J Insect Physiol*, 1997, **43** (3): 235-242
- Arakawa G, Watanabe H, Yamasaki H, Maekawa H, Tokuda G. Purification and molecular cloning of xylanases from the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, **73** (3): 710-718
- Martin MM, Martin JS. Cellulose digestion in the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis*: the role of acquired digestive enzymes [J]. *Science*, 1978, **199** (4336): 1453-1455
- Li ZQ, Liu BR, Zeng WH, Xiao WL, Li QJ, Zhong JH. Character of

- cellulase activity in the guts of flagellate-free termites with different feeding habits [J]. *J Insect Sci*, 2013, **13** (37): 1-8
- 18 Crosland MWJ, Chan LK, Buswell JA. Symbiotic fungus and enzymatic digestion in the gut of the termite, *Macrotermes barneyi* (Light) (Isoptera: Termitidae) [J]. *J Entomol Sci*, 1996, **31** (1): 132-137
 - 19 刘瑞娴, 曾文慧, 李志强, 刘炳荣, 李秋剑, 钟俊鸿. 室内饲养与野外台湾乳白蚁木质纤维素水解酶活性的比较研究[J]. *应用昆虫学报*, 2012, **49** (3): 715-720 [Liu RX, Zeng WH, Li ZQ, Liu BR, Li Q, Zhong JH. Comparative study of the activity of lignocellulolytic enzymes in captive and field colonies of *Coptotermes formosanus* [J]. *Chin J Appl Entol*, 2012, **49** (3): 715-720]
 - 20 Tokuda G, Watanabe H, Matsumoto T, Noda H. Cellulose digestion in the wood-eating higher termite, *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulases and properties of endo-beta-1,4-glucanase [J]. *Zool Sci*, 1997, **14** (1): 83-93
 - 21 Tokuda G, Saito H, Watanabe H. A digestive beta-glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'- and 3'-RACE amplifications with degenerate primers [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, **32** (12): 1681-1689
 - 22 Arakawa G, Watanabe H, Yamasaki H, Maekawa H, Tokuda G. Purification and molecular cloning of xylanases from the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, **73** (3): 710-718
 - 23 Mo JC, Yang TC, Song XG, Cheng JA. Cellulase activity in five species of important termites in China [J]. *Appl Ento Zool*, 2004, **39** (4): 635-641
 - 24 许利霞, 徐荣, 赵焕玉, 杨红. 黑胸散白蚁纤维素酶的体外酶学特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2012, **18** (1): 70-74 [Xu LX, Xu R, Zhao HY, Yang H. *In vitro* Characteristics of the Cellulases from *Reticulitermes chinensis* Snyder [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2012, **18** (1): 70-74
 - 25 Smith JA, Scharf ME, Pereira RM, Koehler PG. Changes in *Reticulitermes flavipes* (Kollar) gut cellulolytic activities in response to hardwood, softwood and cellulose diets [J]. *J Entomol Sci*, 2009, **44** (3): 256-263
 - 26 Coy MR, Salem TZ, Denton JS, Kovaleva ES, Liu Z, Barber DS, Campbell JH, Davis DC, Buchman GW, Boucias DG, Scharf ME. Phenol-oxidizing laccases from the termite gut [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2010, **40** (10): 723-732
 - 27 Taprab Y, Johjima T, Maeda Y, Moriya S, Trakulnaleamsai S, Noparatnaraporn N, Ohkuma M, Kudo T. Symbiotic fungi produce laccases potentially involved in phenol degradation in fungus combs of fungus-growing termites in Thailand [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71** (12): 7696-7704
 - 28 Zhou Y, Deng TF, Pan CY, Chen CR, Mo JC. Purification of a laccase from fungus combs in the nest of *Odontotermes formosanus* [J]. *Process Biochem*, 2010, **45** (7): 1052-1056