

一株产纤维素酶菌株的鉴定及其产酶条件优化

李 杨,桓明辉,高晓梅,刘晓辉,敖 静,朱巍巍,池景良

辽宁省微生物科学研究院, 辽宁 朝阳 122000

摘要: 从土壤中筛选出一株产纤维素酶的细菌, 编号为 X-2。该菌株为革兰氏阳性菌, 好氧, 可生成芽孢。根据其菌体形态、菌落形态、生理生化特征作为初步分类依据, 并通过 16S rDNA 分子生物学鉴定的技术手段, 鉴定为苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)。液体发酵试验表明, 其产酶的最适条件为: 发酵时间为 72 h, 培养温度 35 °C, 转速 130 rpm、接种量 6% 以及初始 pH 7.2, 在该条件下其羧甲基纤维素酶 (CMCase) 活性可达 10.89 U/mL。

关键词: 纤维素酶; 鉴定; 苏云金芽孢杆菌; 产酶条件优化

中图分类号: Q93-331

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2017)04-0556-06

Identification for a Strain of Produce Cellulase and Enzyme Production Conditions Optimization

LI Yang, HUAN Ming-hui, GAO Xiao-mei, LIU Xiao-hui, AO Jing, ZHU Wei-wei, CHI Jing-liang

Microbial Research Institute of Liaoning Province, Chaoyang 122000, China

Abstract: This paper screened a strain of cellulose-producing bacteria No. X-2 from the soil. It was an aerobic Gram-positive bacteria and able to generate spore. It had been identified as *Bacillus thuringiensis* in laboratory according to thallus morphology, Colony morphology, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA molecular biology identification. Liquid fermentation test showed that Optimum fermentation conditions of X-2 were 72 h fermentation time, incubation temperature at 35 °C, 130 rpm of revolving speed, 6% of inoculum size and pH7.2 of the initial value. The activity of hydroxymethyl cellulase (CMCase) under this condition reached 10.89 U/mL.

Keywords: Cellulase; identification; *Bacillus thuringiensis*; optimization of fermentation conditions

纤维素是地球上数量最大的可再生能源物质, 由于其存在很多的高能氢键难以水解, 因此很难被人类或动物直接利用^[1]。我国是农业大国, 每年产玉米秸秆超过 7 亿 t, 玉米秸秆是一种纤维素含量很高的农作物废弃物, 目前对玉米秸秆的处理大部分是丢弃或者焚烧, 产生了严重的环境问题^[2-4]。如何使玉米秸秆达到无害化和资源化利用已经成为目前研究的热点。利用微生物产生的纤维素酶作用于玉米秸秆, 已经取得了一定的进展, 具有效果稳定、降解彻底和降低污染的优点, 因而得到了普遍的认可^[5,6]。因此, 筛选和分离出产纤维素酶的微生物菌株, 提高其对纤维素的降解能力, 研制出混合菌株的腐熟剂已经成为目前利用微生物降解玉米秸秆以及纤维素资源的开发利用的研究重点, 同时对于解决能源危机和环境污染等具有重大的意义。纤维素酶是能够降解纤维素生成葡萄糖的一类酶的总称, 是一个由多种水解酶组成的复杂酶系^[7,8]。在纤维素资源的综合利用过程中, 纤维素酶发挥重要作用。

过去的研究中, 大多数报道的纤维素酶来源于丝状真菌, 尤其是木霉属和曲霉属, 由于这些菌株产纤维素酶种类多、产量高、性质多样, 因此成为发酵法产纤维素酶的主要菌株^[9,10]。近几年人们对产纤维素酶的细菌产生了浓厚的兴趣, 因为细菌的一个最大优点是易于培养、生长周期和产酶周期短, 生产过程中可以降低成本, 同时可彻底降解天然纤维素, 达到预想的效果。随着对细菌深入研究, 一些新的可降解纤维素的好氧细菌菌种被发现和开发利用。本实验室从自然界中筛选出了一株好氧、生长速度快且产纤维素酶较高的细菌菌株 X-2, 鉴定为苏云金芽孢杆菌, 对其进行了进一步分子生物学鉴定, 通过测定菌株菌数和 CMCase 活力作为指标, 优化其最适产酶条件, 为后期深入研究该菌株的规模化生产奠定了基础, 同时为微生物秸秆腐熟剂提供一株后备菌株。

1 材料与方法

收稿日期: 2015-11-09

修回日期: 2015-12-03

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2013GB2B000093)

作者简介: 李 杨(1982-),女,硕士研究生,助理研究员,主要从事农业微生物生理生化方面研究. E-mail:liyong_0223@163.com

1.1 菌株与试剂

从土壤中分离一株产纤维素酶细菌,命名为 X-2。

1 mg/mL 葡萄糖标准溶液; 3,5-二硝基水杨酸显色剂(DNS 显色剂); pH4.8 乙酸-乙酸钠缓冲液; 1% CMC-Na 溶液。

1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基; 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基^[11]。

液体发酵培养基: 蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 10.0 g, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, KH₂PO₄ 4.0 g, CaCl₂·2H₂O 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, CMC-Na 10.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH7.2。

V-P 培养基; 甲基红(M.R.)培养基; 明胶液化培养基; 淀粉水解培养基; 葡萄糖氧化发酵培养基(休和利夫森培养基); 柠檬酸盐利用培养基^[12]。

甘露醇卵黄多粘素琼脂培养基(MYP)、胰酪胨大豆羊血琼脂基础培养基和无菌脱纤维羊血购于青岛海博生物技术有限公司。

1.3 菌种鉴定方法

1.3.1 形态学特征和生理生化试验 根据《伯杰细菌鉴定手册》(第8版)和《常见细菌系统鉴定手册》^[13,14],对分离得到的菌株进行鉴定。

1.3.2 16S rDNA 序列比对及系统发育分析 用细菌 16 S rDNA 的引物,即上游引物 F: 5'-CAGAGT TTGATCCTGGCT-3', 下游引物 R: 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 进行 16S rDNA 的扩增。扩增体系为: rTaq 酶(5 U/μL)12.5 μL, 上游引物和下游引物(2.5 μmol/L)各 1 μL, 模板 DNA 2 μL, 最后加双蒸水至 50 μL, 混合后瞬间离心, 置于 PCR 仪上 98 °C 变性 3 min, 然后 98 °C 变性 25 s, 55 °C 退火 25 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min 反应结束。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 于凝胶成像系统下观察并拍照记录结果。委托上海生工进行测序。将测序结果输入 GenBank 进行同源性分析。利用 Mega、Clustal 等软件进行比对, 构建进化树, 重复次数为 1000 次。

1.4 产酶发酵条件优化

1.4.1 产 CMCase 的测定

1.4.1.1 刚果红平板法检测菌株产纤维素酶能力 将菌株接种于 CMC-Na 培养基平板上培养 3 d, 用 0.1% 的刚果红染色 30 min 后用 1 M NaCl 溶液洗脱, 观察是否出现透明圈。

1.4.1.2 CMCase 的测定

(1)粗酶液的制备: 将发酵液于 4 °C、5000 rpm 条件下离心 10 min, 所得上清液即为粗酶液。

(2)葡萄糖标准曲线: 取 8 支 20 mL 的具塞刻度试管, 分别加入标准葡萄糖溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL, 加入蒸馏水 2.0、1.8、1.6、1.4、1.2、1.0、0.8、0.6 mL, 1.5 mL 的 DNS 显色剂, 混合液摇匀后于沸水浴中煮沸 5 min, 迅速置于凉水中冷却, 定容到 10 mL, 摇匀, 540 nm 处测定吸光值。以葡萄糖含量(mg)为横坐标, 以对应的吸光度值为纵坐标, 绘制葡萄糖标准曲线。

(3)羧甲基纤维素酶活力(CMCase)的测定^[15,16]。取 4 支试管编号。其中 1-3 号为反应管, 4 号为对照管。取 0.5 mL 粗酶液加入 1-3 号试管中, 加入 1% CMC-Na 溶液 1.5 mL; 4 号管中加入 0.5 mL 经高温灭活的粗酶液和 1% CMC-Na 溶液 1.5 mL。将上述试管置于 50 °C 水浴 30 min, 立即加入 1.5 mL DNS 显色剂终止反应。再将上述试管一同沸水浴 5 min 后, 迅速冷却并定容至 10 mL, 摇匀, 540 nm 波长处测定吸光度, 记录各管的吸光值。

CMCase 酶活力定义: 在上述反应条件下, 纤维素酶液每分钟催化底物 1% CMC-Na 溶液生成 1 μg 葡萄糖所需酶量定义为一个酶活力单位(U)。

1.4.2 产酶发酵时间的优化 将菌株 X-2 接种到发酵培养基中, 于 30 °C、130 rpm 条件下培养 24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h 及 96 h 后测发酵液在 570 nm 的 OD 值并测定 CMCase 活力, 重复 3 次。

1.4.3 温度的优化 设 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C 4 个温度条件, 130 rpm 振荡培养 72 h 后测发酵液

的 OD 值和 CMCase 活力，重复 3 次。

1.4.4 接种量的优化 按 1%、2%、4%、6%、8%、10% 的接种量接种，在 35 °C、130 rpm 的条件下培养 72 h 后测发酵液的 OD 值和 CMCase 活力，重复 3 次。

1.4.5 转速的优化 设定摇床转速在 100 rpm、130 rpm、150 rpm、180 rpm，于 35 °C 培养 72 h 后测发酵液的 OD 值和 CMCase 活力，重复 3 次。

1.4.6 初始 pH 的优化 设定培养基初始 pH 为 6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8 和 8.0，于 35 °C、130 rpm 培养 72 h 后测发酵液的 OD 值和 CMCase 活力，重复 3 次。

2 结果

2.1 形态学特征

对 X-2 细菌形态特征进行观察（表 1），结果表明菌株 X-2 为革兰氏阳性菌，24 h 后可形成稳定的菌落。X-2 细菌菌体为杆状，侧生鞭毛，产中生芽孢。

表 1 细菌 X-2 的形态观察

Table 1 The morphological observation of X-2

菌株 Strain	菌落形态 Colony morphology	芽孢 Germ	菌体形态 Thallus morphology	革兰氏染色 Gram stain	鞭毛 Flagellum	荚膜 Membrane
X-2	菌落大、成片、不规则形状、有芽孢、椭圆形、边缘锯齿状、产黄色素	中生、孢囊不膨大	杆状	阳性	有鞭毛，侧生	无

2.2 生理生化反应

X-2 菌生理生化反应见（表 2）。根据《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》所列的芽孢杆菌属形态学和生理生化性状的描述，初步认为 X-2 为芽孢杆菌属（*Bacillus*）。

表 2 细菌 X-2 生理生化性状鉴定

Table 2 Identification of X-2 physiological and biochemical characters

实验项目 Items	结果 Results	实验项目 Items	结果 Results
1. 接触酶	+	8. 葡萄糖氧化发酵	-
2. 厌氧性	-	9. 脲酶	-
3. 淀粉水解	+	10. 运动性	+
4. 明胶液化	+	11. V-P 反应	+
5. 柠檬酸盐利用	-	12. 溶血性	+
6. 甲基红试验	+	13. 耐盐性 3%	+
7. 卵黄反应	+	5%	+
		7%	+
		10%	-

注：“+”为阳性，“-”为阴性。

Note: “+” is positive, “-” is negative

2.3 PCR 反应扩增后各菌株的 16 S rDNA 片断

从图 1 可以看出，得到的扩增产物的分子量在 1500 bp 左右，符合 16 S rDNA 片断大小，说明该扩增片断是 16S rDNA 片断。

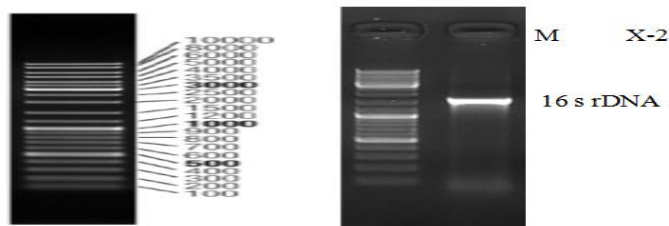


图 1 细菌 X-2 的 16 S rDNA

M 泳道为 marker，点样量为 5 μL

Fig.1 16 s rDNA of X-2

M lane was marker, sample dosage was 5 μL

2.4 细菌 X-2 的 16 S rDNA 鉴定以及系统发育树的构建

测序测得 16 S rDNA 大部分序列为 1494 bp。登陆 NCBI, 使用 BLAST 在线将得到的 16 S rDNA 序列提交进行 BLAST 在线分析。将测出的序列通过 16 S rDNA 序列同源性比较, X-2 与 *Bacillus thuringiensis* 的 16 S rDNA 序列相似性均达到 100%。根据同源性比较结果, 可以初步确认细菌 X-2 为苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)。

从 Genbank 中选择了 11 个菌株, 应用 Mega、Clustal 软件进行多重比较后构建系统发育树。如图 2 所示, 菌株 X-2 和苏云金芽孢杆菌在一个分支中, 且菌株 X-2 与苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (FN433030.1) 和 *Bacillus thuringiensis* (GU471753.1) 的亲缘关系较近。进一步证明菌株 X-2 为苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)。

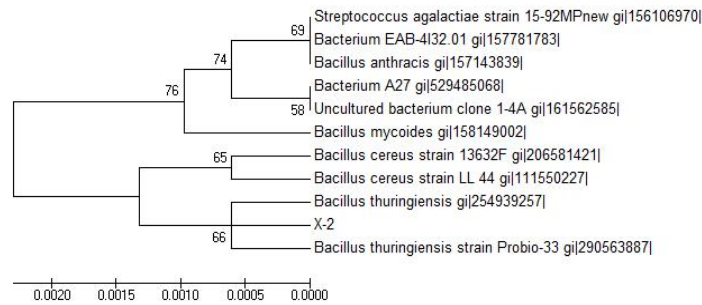


图 2 细菌 X-2 基于 16 S rDNA 的系统进化树
Fig.2 Phulogenetic tree of X-2 based on the 16 S rDNA sequence

2.5 葡萄糖标准曲线的绘制

不同含量的葡萄糖对应的吸光值和葡萄糖标准曲线如下所示。吸光值与葡萄糖含量成正比例关系, 且 $R^2=0.995$, 因此可以通过测定溶液的吸光值 OD 计算出相应的葡萄糖含量。

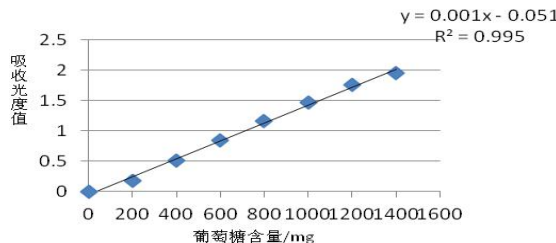


图 3 葡萄糖标准曲线
Fig.3 Standard curve of Glucose

2.6 菌株 X-2 产纤维素酶能力的测定

菌株培养 3 d 后, 结果如图 4。刚果红能与培养基中的纤维素形成红色复合物。当纤维素被纤维素酶分解后, 刚果红-纤维素的复合物就无法形成, 培养基中会出现以纤维素分解菌为中心的透明圈, 因此通过是否产生透明圈可以判定菌株是否产纤维素酶。测量 X-2 透明圈的直径 (12.72±3 mm), D1/d1 是 3.24。故 X-2 是一株可以产纤维素酶的细菌。

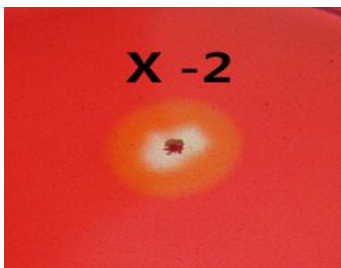


图 4 菌株 X-2 产纤维素酶的定性分析
Fig.4 Qualitative analysis on CMCase of X-2

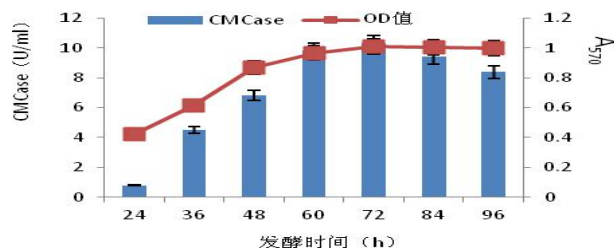


图 5 培养时间对菌株 X-2 生长和产 CMC 酶的影响
Fig.5 Culturing time effect on growth and CMCCase of X-2

2.7 培养条件对生长速率和产酶量的影响

2.7.1 发酵时间对生长速率和产酶量的影响 结果如图 5 所示, 接种后 24 h 内, 菌株生长比较缓慢, 24 h 后菌株快速生长, 培养 72 h 后发酵液 OD 值达最大, 产酶量达到 10.31 U/mL, 为纤维素酶的最佳收获期。72 h 后随着时间的延长, 生长速率逐渐减小趋于平衡。由于养分的消耗和代谢产物的分泌, 菌丝老化严重, 慢慢解体, 故发酵液的 OD 值有所下降。

2.7.2 发酵温度对生长速率和产酶量的影响 结果如图 6 所示, X-2 在 30~35 °C 代谢最旺盛, 可见其最适生长温度为 30~35 °C。随着温度升高生长速率均受到抑制, 说明培养温度对细菌 X-2 的 CMCase 影响效果显著。产酶量随着温度的升高呈上升趋势, 在 35 °C 时达到最高, 超过 35 °C, 随温度升高, 酶活力有所下降。综合考虑其生长曲线和产酶能力, 确定 X-2 最适宜的发酵产酶温度为 35 °C。

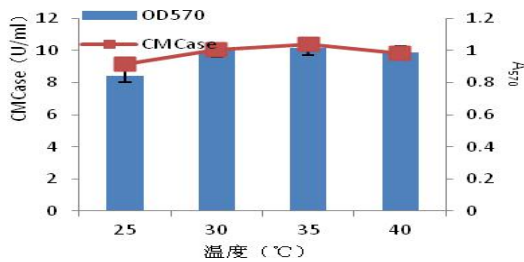


图 6 发酵温度对菌株 X-2 生长和产 CMC 酶的影响

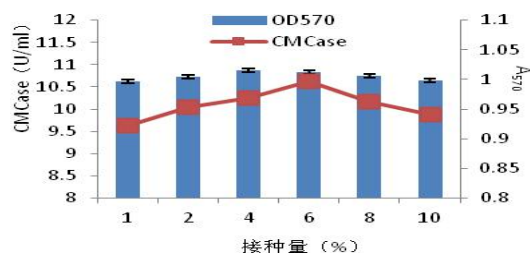


图 7 接种量对菌株 X-2 生长和产 CMC 酶的影响

Fig.6 Temperatures effects on growth and CMCase of X-2 Fig.7 Inoculum effects on growth and CMCase of X-2

2.7.3 接种量对生长速率和产酶量的影响 结果表明, 如图 7, 随着接种量的增加, 菌株的生长代谢呈现较好状态, 菌数和 CMCase 的酶活力均增加, OD 值均可达到 1.00 以上, 接种量对细菌 X-2 生长的影响并不显著。但当接种量超过 6% 的时候, 酶活力逐步下降, 推测是由于接种量过多导致培养基中溶氧量不足的原因。综合生长速率和 CMC 酶活力确定 X-2 的最适接种量为 6%。

2.7.4 转速对生长速率和产酶量的影响 由图 8 可以看出, 当转速为 100 rpm 时, 菌数和酶活力都较低, 生长状况相对最好的转速条件是 130 rpm 和 150 rpm, 此时 OD 值分别为 1.011 和 1.014。130、150 和 180 rpm 转速条件下, 菌株 X-2 的产纤维素酶能力差别不大, 当转速在 130 rpm 时, 其菌数和产纤维素酶能力相对偏高。综合考虑, 菌株 X-2 的产酶发酵最佳转速确定为 130 rpm。

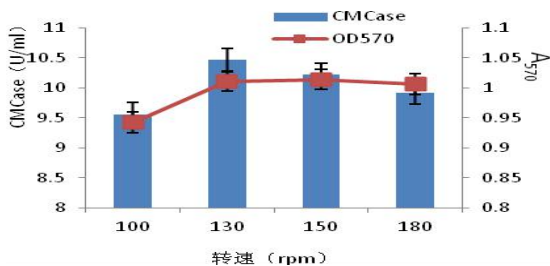


图 8 转速对菌株 X-2 生长和产 CMC 酶的影响

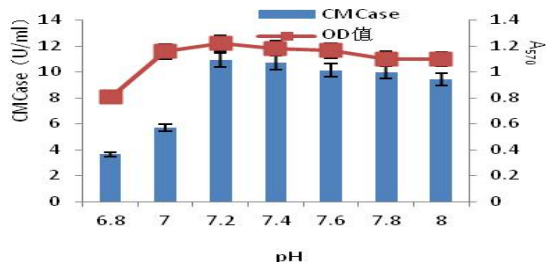


图 9 pH 对菌株 X-2 生长和产 CMC 酶的影响

Fig.8 Rotate speed effect on growth and CMCase of X-2 Fig.9 pH effect on growth and CMCase of X-2

2.7.5 初始 pH 对生长速率和产酶量的影响 从图 9 可以看出, 初始 pH 对菌株 X-2 生长速率和酶活力均有显著影响。初始 pH 在 6.5 时 OD 值较低, 随着初始 pH 的增加, OD 值呈明显上升趋势。初始 pH 为 7.2 时, OD 值达最高 1.221, 进一步增加而有所降低。初始 pH 在 7.2~8.0 的条件下, 菌株 X-2 的产酶活性均可保持在一个较高的水平。在培养基初始 pH 为 7.2、7.4 时, CMCase 分别达 10.89 U/mL 和 10.72 U/mL。因此, 菌株 X-2 的发酵培养最适 pH 为 7.2。

3 讨论

纤维素是年产量巨大的可再生能源物质, 通过微生物产生的纤维素酶来分解和转化纤维素是纤维素利用的有效途径, 也是多年来研究者的目标。已发现的具有降解纤维素能力的微生物有近 200 种, 分布在真菌、细菌和放线菌中, 其中以真菌类产纤维素酶为主^[17-19], 但真菌产纤维素酶的规模生产较繁琐、周期长, 在很大程度上影响了纤维素的酶解效率, 增大了生产成本^[20,21], 因此筛选出一种周期短、产酶高的菌株至关重要。本试验对细菌菌株 X-2 进行了鉴定及产纤维素酶条件的优化。

菌株 X-2 能产芽孢, 革兰氏阳性, 分子生物学鉴定其为苏云金芽孢杆菌。其最适产酶条件为: 培养基起始 pH 值为 7.2, 发酵温度 35 °C, 接种量为 6%, 转速为 130 rpm, 培养 72 h, 此条件下产 CMCase 可达 10.89 U/mL。X-2 在 72 h 即可达到产酶高峰, 大大缩短了生产周期, 且产纤维素酶量也较高, 这与陈晨^[22]等发现菌株 F1 即鉴定为苏云金芽孢杆菌后, 其纤维素酶活在 72 h 可达到最高的研究一致。到目前为止, 对 *Bacillus agaradhaerens*、*Bacillus cellulyticus*、解淀粉芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌产纤维素酶研究比较深入, 纤维素酶的纯化方法已经形成, 超过 20 个编码纤维素降解酶的基因已经被测序和克隆^[23]。X-2 对纤维素具有较强的降解作用, 本实验只是对其发酵条件进行了初步探索, 下一步继续研究该菌株产纤维素酶的基因及其纤维素酶的性质, 期望从基因水平上提高菌株的纤维素酶活, 将其应用于微生物腐熟剂的制作过程中, 为腐熟剂的复合菌种提供后备菌株, 对环境和生态问题会有很大的应用前景和意义。

4 结论

(1) 根据其菌体形态、菌落形态、生理生化特征作为初步分类依据, 该菌株为革兰氏阳性菌, 杆状, 好氧, 可生成芽孢。并通过 16S rDNA 分子生物学鉴定的技术手段, 鉴定为苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)。

(2) 刚果红平板结果表明 X-2 是一株可以产纤维素酶的细菌, 透明圈的直径 (12.72±3 mm), D1/d1 是 3.24。

(3) 液体发酵试验表明, 其产酶的最适条件为: 发酵时间为 72 h, 培养温度 35 °C, 转速 130 rpm、接种量 6% 以及初始 pH 7.2, 在该条件下其羧甲基纤维素酶 (CMCase) 活性可达 10.89 U/mL。

参考文献

- [1] 张 勇, 陶青燕. 纤维素酶的应用进展[J]. 中国饲料, 2002, 18(4): 17-19
- [2] 王巧兰, 郭 刚, 林范学. 纤维素研究综述[J]. 湖北农业科学, 2004(3): 14-19
- [3] 辛亚平, 咎林森, 杜双田, 等. 降解纤维素菌株筛选及其鉴定[J]. 畜牧兽医杂志, 2011, 30(5): 1-5
- [4] 赵方圆, 范宁杰, 朱建春, 等. 纤维素高效降解菌 YN1 的筛选及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 496-502
- [5] 刘春芬, 贺稚非, 蒲海燕, 等. 纤维素酶及应用现状[J]. 粮食与油脂, 2004(1): 15-17
- [6] 胡 月, 刘 霞, 雷 颀. 高产纤维素酶青霉菌的筛选及产酶条件的研究[J]. 中国食品添加剂, 2007, 2(1): 80-84
- [7] 张传富, 顾文杰, 彭科峰, 等. 微生物纤维素酶的研究现状[J]. 生物信息学, 2007, 5(1): 34-36
- [8] 周俊强, 邱忠平, 韩云平, 等. 纤维素降解菌的筛选及其产酶特性[J]. 环境工程学报, 2010(3): 705-708
- [9] Johann O, Teinar RBB. Phylogenetic and Pysiological studies of Four Hydrogen-Producing Thermoanaerobes from Icelandic Geothermal areas[J]. Icelandic Agri. Sei, 2007, 20: 93-105
- [10] Hari S, Krishna K, Selthar C. Studies on the Production and application of cellulose from *Trichoderma reesei* QM-9414[J]. BioProcess. Eng, 2000(22): 467-470
- [11] 张建强, 李亚澜, 李 勇. 纤维素降解菌的分离鉴定及固态发酵条件[J]. 西南交通大学学报, 2006, 41(4): 442-446
- [12] 沈 萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 214-222
- [13] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 62-65
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 62-63
- [15] 齐 云, 袁月祥, 陈 飞, 等. 一组纤维素分解菌的分离、筛选及其产酶条件的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(6): 510-512
- [16] 刘德海, 杨玉华, 安明理, 等. 纤维素酶活性的测定方法[J]. 中国饲料, 2002, 17: 27-28
- [17] 杨礼富, 谢贵水, 王真辉, 等. 木质纤维素酶高产菌株的筛选和鉴定[J]. 热带作物学报, 2001, 22(3): 70-77
- [18] 马旭光, 张宗舟, 蔺海明, 等. 黑曲霉高产纤维素酶活突变株的筛选[J]. 中国酿造, 2008, 9: 61-63
- [19] 赵连娣, 孟顺利, 史兆国, 等. 绿色木霉液态发酵产纤维素酶条件的优化[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(3): 442-447
- [20] 陈丽燕, 张光祥, 黄春萍, 等. 两株高产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及酶学特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(4): 531-538
- [21] 黄 艳, 覃拥灵, 凌 敏, 等. 不同碳源诱导康氏木霉产纤维素酶的研究[J]. 中国酿造, 2008, 15(8): 41-44
- [22] 陈 晨, 解玉红, 冯 炘, 等. 纤维素降解菌的分离及单菌株与菌群纤维素酶活性性质[J]. 天津理工大学学报, 2012, 28(4-5): 62-65
- [23] Lin Ling, Kan Xianzhao, Yan Hao, et al. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains[J/OL]. Electronic journal of biotechnology, 2012, 15(3). http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-34582012000300002&script=sci_arttext&tlng=p