

一株褐腐真菌产纤维素酶活力的分析

韩树英, 池玉杰, 薛煜* (东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的]获得一株可降解纤维素的褐腐真菌,并且分析其产酶特性。[方法]从腐朽木材上分离出一株褐腐真菌,分析该菌株的形态学特征、生物学特性,并且通过液体发酵培养,测定该菌株的2种纤维素酶活力。[结果]该菌株为栗黑拟层孔菌。发酵试验表明,在初始 pH 6.0、CMC-Na 0.5 g/L、KH₂PO₄ 0.5 g/L、CaCl₂ 0.5 g/L、VB₁ 0.5 g/L、MgCl₂ 2 mmol/L、酵母粉 5.0 g/L、酒石酸铵 0.5 g/L 的条件下,培养 5 d 时纤维素酶活力最高,内切葡聚糖苷酶(CMCCase)为 21.71 U/ml,β-葡聚糖苷酶为 10.69 U/ml。[结论]该试验为进一步研究褐腐真菌降解木质纤维素的机制提供前期基础。

关键词 褐腐真菌;液体发酵;纤维素酶

中图分类号 S188+.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)16-04953-03

On Conditions for Cellulase Production by *Fomitopsis* sp. CY-2012

HAN Shu-ying, XUE Yu et al (College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective] The aim was to isolate and identify a brown-rot fungus, and study the characteristics of the enzyme. [Method] The cellulase-producing strain was isolated from the rot-wood, and was identified according to the observation of its morphology and 18S rRNA sequence analysis. And the conditions for cellulase production were studied. [Result] The isolated strain was named *Fomitopsis* sp. CY-2012. The best fermentation medium was the initial pH 6.0, CMC-Na 5 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, CaCl₂ 0.5 g/L, VB₁ 0.5 g/L, MgCl₂ 2 mmol/L, yeast 5 g/L, ammonium tartrate 0.5 g/L, fermenting at 28 °C for 5 d. Under the optimized conditions, the CMCCase activity and the β-glucosidase activity were 21.71 U/ml and 10.69 U/ml. [Conclusion] The research provided certain theoretical basis for the degradation of cellulose by the brown-rot fungus.

Key words Brown-rot fungus; Liquid fermentation; Cellulase

木质纤维原料主要由纤维素(一种葡萄糖聚合物)、半纤维素(一种戊糖和己糖聚合物)及木质素(一种不规则苯丙醇单元聚合物)组成^[1]。其中,纤维素又被称为“生物币”,是地球上最古老、最丰富的可再生生物资源,并且广泛存在于植物中^[2]。有资料显示,植物每年产纤维素量约为 1 800 亿 t,纤维素能够转化为可溶性糖、乙醇以及工业化合物等可利用产物^[3]。从环保、高效的角度出发,纤维素被分解且无污染的一条有效途径就是利用纤维素酶的水解,其中采用微生物发酵是最方便的方法。纤维素酶主要由内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β-葡聚糖酶 3 种酶组成,而大部分微生物如细菌、放线菌和真菌等能够产生纤维素酶。真菌中,已深入研究且作为水解纤维素的模式菌为软腐菌(*Trichoderma viride*)和白腐菌(*Phanerochaete chrysosporium*),但是对褐腐菌降解纤维素的研究较少^[4]。笔者从长白山地区腐朽木材上分离出一株可以分解纤维素的褐腐菌。该菌株与其他 63 种菌株相比分解木材能力最强^[5],通过对其进行鉴定和优化培养,以期对真菌纤维素酶的研究和应用提供新的真菌资源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源。东北林业大学林学院森林保护教研室保存菌种。

1.1.2 培养基。PDA 培养基组成为:去皮马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L。基础培养基组成为:CMC-Na 5 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L,酵母 10 g/L, CaCl₂ 0.5 g/L, VB₁ 0.5 g/L。

作者简介 韩树英(1989-),女,河南禹州人,硕士研究生,研究方向:森林病理。*通讯作者,教授,从事森林病理学教学和科研工作。

收稿日期 2014-05-08

1.1.3 DNS 试剂的配制^[6]。量取 750 ml 去离子水,加热至 45 °C 时加入 10.00 g 3,5-二硝基水杨酸,待完全溶解后依次加入 100 ml 4 mol/L NaOH、5.00 g 苯酚、5.00 g Na₂SO₃ 和 300.00 g 酒石酸钾钠,溶解后定容至 1 L,将棕色瓶在室温、暗处放置 7 d 后使用。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种鉴定。采用 18rRNA ITS 基因序列分析。以基因组 DNA 为模板,采用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3') 进行 PCR。扩增体系为:10 × PCR Buffer 2.5 μl, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μl, 上游引物(20 μmol/L) 1 μl, 下游引物(20 μmol/L) 1 μl, *rTaq* 酶 0.25 μl, DNA 模板 0.5 μl, 去离子水补足至 25 μl。反应条件为:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 60 s, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.2.2 葡萄糖标准曲线的制作。准确称取 100 mg 葡萄糖(预先在 105 °C 烘干至恒重),用去离子水溶解后定容至 100 ml,得到葡萄糖标准溶液。取标准溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 ml,加蒸馏水定容至 2 ml,再分别加入 3 ml DNS 试剂,混匀后沸水浴 5 min,立即冷却至室温,加蒸馏水至 25 ml,摇匀,520 nm 处测吸光值,以此制作葡萄糖标准曲线,计算出回归方程和回归系数。

1.2.3 粗酶液的制备。接种 4 °C 保存的试管菌于 PDA 平皿中,28 °C 静止培养。待长满皿后用打孔器(直径 9 mm)转接进 PDA 平皿中扩大培养。培养 8 d 后,取最外围菌饼接入含 100 ml 产酶液的 250 ml 三角瓶中,28 °C、150 r/min 培养。取发酵液于 4 °C 下,10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液。

1.2.4 纤维素酶活力的测定。

1.2.4.1 内切葡聚糖苷酶(CMCCase)的测定^[7]。取 0.5 ml

粗酶液,添加 1 ml 浓度 1% CMC-Na(用 pH 5.0,50 mmol/L 柠檬酸缓冲液溶解 CMC-Na),对照不添加酶液,50 °C 条件下反应 30 min,立即加入 3 ml DNS 试剂,再于对照管中加入 0.5 ml 粗酶液,沸水浴 5 min 后取出,立即冷却至室温,定容至 5 ml,于 520 nm 波长处测 OD 值。

1.2.4.2 β-葡聚糖苷酶的测定。在离心管中加入 1 ml 浓度 0.5% 水杨苷柠檬酸缓冲液和 0.5 ml 酶液,50 °C 水浴 30 min 后取出,立即加入 3 ml DNS 试剂,再于对照管中加入 0.5 ml 粗酶液,沸水浴 5 min,立即冷却至室温,定容至 5 ml,在 520 nm 波长下测定 OD 值。以上酶活力单位(U/ml)定义为:在 50 °C 条件下,每毫升酶液在 1 min 内催化底物生成 1 μg 葡萄糖所需的酶量。

1.3 产酶条件的优化

1.3.1 不同初始 pH。以基础培养基为产酶培养基,初始 pH 分别调节为 4.5、6、7。接入 5 块直径 9 mm 的菌饼于含 50 ml 发酵液的 250 ml 三角瓶中,150 r/min 培养 5 d,测定 CMCCase。每个处理重复 3 次。

1.3.2 不同发酵时间。以基础培养基为产酶培养基,接入 7 块菌饼于含 100 ml 发酵液的 250 ml 三角瓶中,分别培养 1、3、5、7 和 9 d,测定 CMCCase、β-葡聚糖苷酶酶活。

1.3.3 正交试验设计。在上述单因素试验的基础上,研究不同初始 pH(A)、装液量(B)、氮源浓度(C)和接种量(D)4 个因素对酶活的影响。按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验因素、水平见表 1。

1.3.4 不同金属离子。在上述最佳条件下,分别添加 $MgCl_2$ 、 $ZnCl_2$ 、KCl、NaCl 和 $MnCl_2$,培养 5 d 后测定 CMCCase、β-葡聚糖苷酶酶活。

1.3.5 不同 N 源。在上述最佳条件下,分别以尿素、酒石酸铵、磷酸铵、 NH_4NO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ 为氮源,培养 5 d 后测定 CMCCase、β-葡聚糖苷酶酶活。

表 1 因素水平

水平	因素			
	A	B//ml	C//g/L	D//块
1	4	50	5	3
2	5	70	10	5
3	6	100	15	7

1.3.6 不同氨基酸。以上述获得的最佳培养基为产酶培养基,分别加入亮氨酸、泛氨酸、烟酸、谷氨酸、苏氨酸,培养 5 d 后测定 CMCCase、β-葡聚糖苷酶酶活。

1.4 分析方法 运用 SPSS 进行数据分析,用 Excel 进行作图^[8]。

2 结果与分析

2.1 菌株 ITS 序列鉴定^[9] 将测序结果提交到 NCBI 的 GenBank 中,得到登陆号为 JX863102.1,在线进行 Blast 分析,结果显示与该褐腐菌相似性最高的菌株均属于 *Fomitopsis* 属,与栗生灰黑孔菌 *Melanoporia castanea* 相似性达 99%。利用 MEGA 5.2 的 Neighbor-Joining 构建系统进化树,结果如图 1 所示。菌株 CY-2012 占据着一个独立的分支,可能为一个新的亚种。

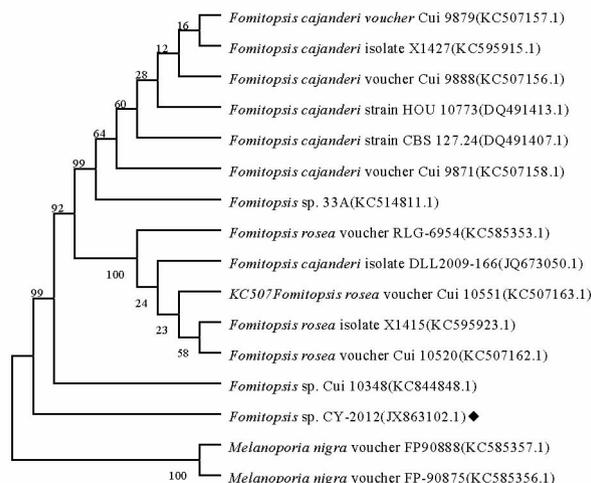


图 1 基于 ITS 序列的栗黑拟层孔菌 NJ 聚类法系统进化树

2.2 葡萄糖标准曲线 运用 Excel 绘制标准曲线(图 2),对应的回归方程为: $y = 0.0254x - 0.0262$, $R^2 = 0.9986$ 。该标准曲线线性关系好,可用于酶活力的测定,得出酶活力 = $2(y + 0.0262) / 0.0254 \cdot V/T$,式中 V 代表定容时体积,为 5 ml, T 代表反应时间,为 30 min。

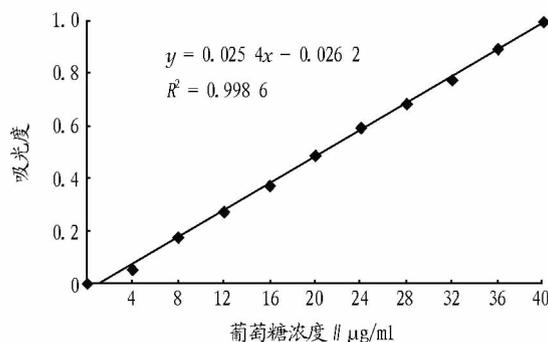


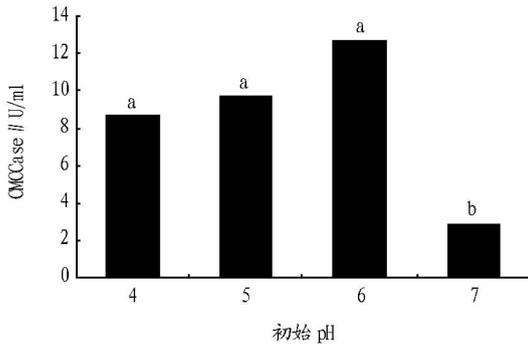
图 2 葡萄糖标准曲线

2.3 菌株产酶条件的优化

2.3.1 不同初始 pH 对产酶条件的影响。为了探索不同初始 pH 对褐腐菌发酵产纤维素酶能力的影响,将菌株置于不同的 pH 条件下进行发酵。由图 3 可知,当初始 pH 为 6.0 时,产 CMCCase 最高,酶活为 12.62 U/ml。在 pH 4.0~6.0 时,随着 pH 的增加,产酶量逐渐提高。通过显著性分析,发现在 pH 4.0~6.0 时,差异不显著,说明该菌株在 4~6 之间有利于产生 CMCCase;当 pH 高于 6.0 时产酶量急剧下降,说明该菌适宜在偏酸环境下生长。

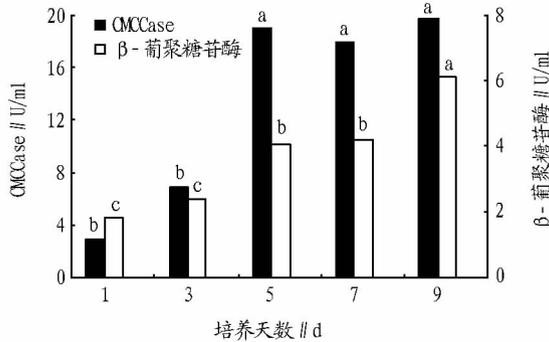
2.3.2 不同发酵时间对产酶的影响。在不同培养时间,检测 CMCCase、β-葡聚糖苷酶酶活的大小。由图 4 可知,在培养的第 1 天,在发酵液中已经检测到酶活,到第 5 天时产酶开始显著升高,CMCCase 酶活为 19 U/ml;到第 9 天时,酶活基本达到稳定。β-葡聚糖苷酶在第 9 天时最高,酶活为 6.14 U/ml。为了缩短培养时间,同时得到高产量的酶活,选取第 5 天为最佳产酶时间。

2.3.3 正交试验。由于 pH 在 4~6 时差异不显著,选取 pH、装液量、氮源浓度和接种量为研究对象,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,在第 5 天时检测 CMCCase 酶活。试验结果及分



注:图中不同小写字母表示差异在 0.05 水平显著。

图3 初始 pH 对产酶条件的影响



注:图中不同小写字母表示差异在 0.05 水平显著。

图4 不同培养天数对产酶的影响

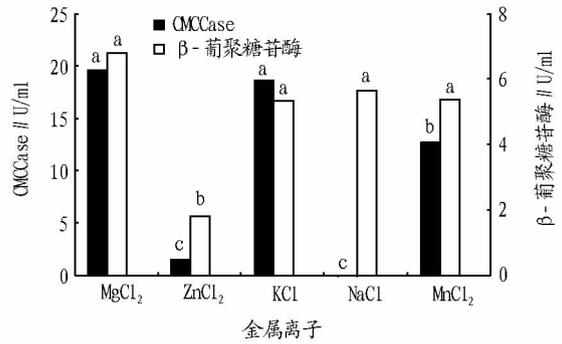
析见表 2。采用直观分析法分析结果,发现第 8 组 $A_3B_2C_1D_3$ 产酶量最高,酶活为 18.05 U/ml。由方差分析可知,接种量、pH 对褐腐菌产 CMCCase 的影响最大,酵母浓度次之,装液量对产酶影响最小,从而得到最优产酶组合为 $A_3B_3C_1D_3$ 。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果分析

试验号	因素				CMCCase U/ml
	A	B	C	D	
1	4	50	5	3	12.79
2	4	70	10	5	3.30
3	4	100	15	7	14.09
4	5	50	10	7	9.48
5	5	70	15	3	1.66
6	5	100	5	5	9.07
7	6	50	15	5	9.91
8	6	70	5	7	18.05
9	6	100	10	3	11.97
T_1	90.55	96.55	119.75	79.28	
T_2	60.64	69.05	74.24	66.85	
T_3	119.79	105.38	76.99	124.85	
R_1	10.06	10.73	13.30	8.81	
R_2	6.74	7.67	8.25	7.43	
R_3	13.31	11.71	8.55	13.87	
F 值	31.45	12.91	23.41	33.55	

2.3.4 不同金属离子对菌株产酶活力的影响。由图 5 可知,MgCl₂ 和 KCl 有利于产 CMCCase 酶,酶活分别为 19.57、18.57 U/ml,NaCl 抑制 CMCCase 酶的产生,但是有利于 β-葡聚糖苷酶的产生。MgCl₂ 最有利于 β-葡聚糖苷酶的产生,酶活为 6.80 U/ml。显著性分析结果表明,ZnCl₂ 对 CMC-

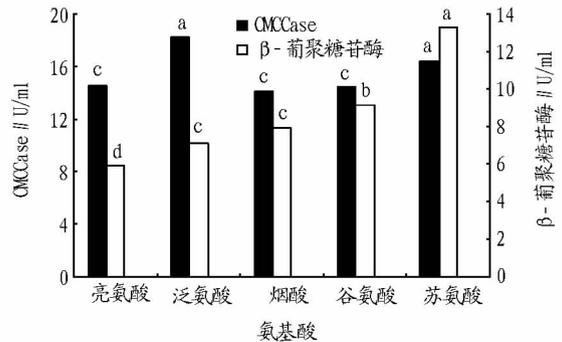
Case 酶和 β-葡聚糖苷酶的产生量最少。



注:图中不同小写字母表示差异在 0.05 水平显著。

图5 不同金属离子对产酶的影响

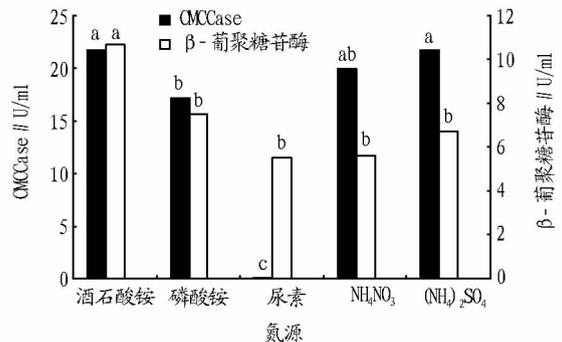
2.3.5 不同氨基酸对产酶的影响。分别选取浓度 0.05% 的亮氨酸、泛氨酸、烟酸、谷氨酸和苏氨酸为氨基酸,研究其对褐腐菌产纤维素酶的影响。由图 6 可知,泛氨酸最有利于 CMCCase 酶的产生,达 18.20 U/ml;苏氨酸最有利于 β-葡聚糖苷酶的产生,酶活达 13.28 U/ml。



注:图中不同小写字母表示差异在 0.05 水平显著。

图6 不同氨基酸对产酶的影响

2.3.6 不同氮源对产酶的影响。以正交试验获得的最佳组合为基础,即 CMC-Na 5 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, 酵母 5 g/L, CaCl₂ 0.5 g/L, VB₁ 0.5 g/L, pH 6.0, 每 250 ml 三角瓶装 100 ml 发酵液,同时添加 0.5 g/L MgCl₂, 接种 7 块菌饼,添加不



注:图中不同小写字母表示差异在 0.05 水平显著。

图7 不同氮源对产酶的影响

同的无机氮源,培养 5 d 时检测酶活。由图 7 可知,当添加尿素时,菌株几乎不产生 CMCCase 酶;酒石酸铵最利于产

- [27] GANCEDO C, FLORES C L. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi[J]. *FEMS Yeast Res*, 2004, 4: 351 – 359.
- [28] LIU M, CHING-TE C, TSAN-PIAO L. Constitutive components and induced gene expression are involved in the desiccation tolerance of *Selaginella tamariscina*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 653 – 663.
- [29] KAPLAN F, JOACHIM K, DALE W H, et al. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136: 4159 – 4168.
- [30] PRAMANIK M H R, IMAI R. Functional identification of a trehalose 6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 58: 751 – 762.
- [31] LUO Y, GAO Y M, WANG W, et al. Application of trehalose ameliorates heat stress and promotes recovery of winter wheat seedlings [J]. *Biologia Plantarum*, 2014, 58(2): 395 – 398.
- [32] 汤绍虎, 周启贵, 孙敏, 等. 海藻糖在渗透胁迫下对油菜种子萌发和幼苗生理的影响[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(6): 206 – 209.
- [33] 周启贵, 汤绍虎, 孙敏, 等. 海藻糖对渗透胁迫下油菜种子萌发和幼苗生长的影响[J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2007, 32(1): 39 – 42.
- [34] GIBON Y, BESSIERES M A, LARHER F. Is glycine betaine a non-compatible solute in higher plants that do not accumulate it? [J]. *Plant Cell Environ*, 1997, 20: 329 – 340.
- [35] GAGNEUL D, AÏNOUCHE A, DUHAZEL C, et al. A reassessment of the function of the so-called compatible solutes in the halophytic *Plumbaginaceae Limonium latifolium*[J]. *Plant Physiol*, 2007, 144: 1598 – 1611.
- [36] AVONCE N, ALFREDO M V, MORETT E, et al. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis[J]. *BMC Evol Biol*, 2006, 6: 109 – 113.
- [37] AVONCE N, LEYMAN B, MASCORRO-GALLARDOL J O, et al. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136: 3649 – 3659.
- [38] ROA A Q, THENCOURT B L B, PILARDC S, et al. Trehalose determination in linseed subjected to osmotic stress. HPAEC-PAD analysis: an inappropriate method [J]. *Physiologia Plantarum*, 2013, 147: 261 – 269.
- [39] SCHLUEPMANN H, VAN DIJKEN A, AGHDASI M, et al. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135: 79 – 890.
- [40] ROMERO C, BELLES J M, VAYA J L, et al. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance [J]. *Planta*, 1997, 201: 293 – 297.
- [41] GARG A K, KIM J K, OWENS T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 15898 – 15903.
- [42] QI L, JIAO S X, WANG T X, et al. Trehalose inhibited the phagocytosis of refrigerated platelets *in vitro* via preventing apoptosis [J]. *Transfusion*, 2009, 49: 2158 – 2166.
- [43] REAPE T J, MCCABE P F. Apoptotic-like programmed cell death in plants [J]. *New Phytol*, 2008, 180: 13 – 26.
- [44] YAMADA T, TAKATSU Y, MANABE T, et al. Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of *gladiolus* [J]. *Plant Sci*, 2003, 164: 213 – 221.
- [45] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system [J]. *Nature*, 2006, 444: 323 – 329.
- [46] HANSON J, SMEEKENS S. Sugar perception and signaling—an update [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12: 562 – 567.
- [47] PEREIRA C S, ROBERTO D L, CHANDRASEKHAR I, et al. Interaction of the disaccharide trehalose with a phospholipid bilayer: a molecular dynamics study [J]. *Biophys J*, 2004, 86: 2273 – 2285.
- [48] FRISON M, PARROUB J L, GUILLAUMOT D, et al. The *Arabidopsis thaliana* trehalase is a plasma membrane-bound enzyme with extracellular activity [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581: 4010 – 4016.
- [49] HARTHILL J E, MEEK S M, MORRICE N, et al. Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* trehalase-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose [J]. *Plant J*, 2006, 47: 211 – 223.
- [50] SCHLUEPMANN H, PELLNY T, VAN DIJKEN A, et al. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 6849 – 6854.
- [51] MILLER G, SHULAEV V, MITTLER R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress [J]. *Physiol Plant*, 2008, 33: 481 – 489.
- [52] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 405 – 410.
- [53] MA C, WANG Z Q, KONG B B, et al. Exogenous trehalose differentially modulate antioxidant defense system in wheat callus during water deficit and subsequent recovery [J]. *Plant Growth Regul*, 2013, 70(3): 275 – 285.
- [54] 刘强, 王庆成, 孙晶, 等. NaHCO₃ 胁迫下外源海藻糖对南蛇藤几种与抗逆性有关的生理生化指标变化的影响 [J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(5): 853 – 856.
- [55] NERY D D C M, SILVA C G D, MARIANI D, et al. The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780: 1408 – 1411.

(上接第 4955 页)

CMCCase 酶和 β -葡聚糖苷酶, 酶活分别为 21.71、10.69 U/ml。

3 讨论

通过形态鉴定、生物学分析, 确定该褐腐菌为栗黑拟层孔菌 (*Fomitopsis* sp. CY-2012), 在系统进化树上处于一个单独的分支, 可能是一个新的亚种。该菌株是 64 种腐朽菌中降解木材最高的一种。通过发酵培养, 发现该菌株几乎不产滤纸酶。真菌是 VB₁ 的天然缺陷型。它们以一种辅酶的形式存在, 对真菌的生长很重要。因此, 在发酵培养基中添加 VB₁, 有利于菌株良好的生长^[10]。由于该菌不像木霉一样能够产生大量的孢子, 接种时以菌饼为主, 且选取平皿中最外围新生的菌丝。在优化前, CMCCase 酶活约为 8 U/ml, 优化后为 21.71 U/ml, 提高了 3 倍左右。该菌产 β -葡聚糖苷酶较低, 添加氨基酸后产量明显增加。尿素和 NaCl 都会抑制 CMCCase 酶的产生, 但对 β -葡聚糖苷酶的产生无抑制作用。

近年来, 对木霉发酵产纤维素酶的培养条件的研究很多, 但是有关腐朽菌产纤维素酶的研究较少^[11]。该研究通过对褐腐菌产纤维素酶液体发酵条件进行优化, 为进一步研

究腐朽菌降解纤维素机制提供前期基础。

参考文献

- [1] KUHAD R C, SINGH A, ERIKSSON K E. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1997, 57: 46 – 125.
- [2] 田海娇, 吴昊, 杨洪岩. 提高纤维素产生菌产酶能力方法的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(5): 1280 – 1286, 1290.
- [3] LUTZEN N W, NIELSEN M H, OXENBOEL K M, et al. Cellulases and their application in the conversion of lignocelluloses to fermentable sugars [J]. *Phil Trans R Soc Lond B*, 1983, 300: 283 – 291.
- [4] DESWAL D, KHASA Y P, KUHAD R C. Optimization of cellulose production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 6065 – 6072.
- [5] 池玉杰. 东北林区 64 种木材腐朽菌木材分解能力的研究 [J]. *林业科学*, 2001, 37(5): 107 – 112.
- [6] 王俊丽, 聂国兴, 李素贞, 等. DNS 法测定还原糖含量时最适波长的确定 [J]. *河南农业科学*, 2010(4): 115 – 118.
- [7] 许玉林, 郑月霞, 叶冰莹, 等. 一株纤维素降解真菌的筛选及鉴定 [J]. *微生物学通报*, 2013, 40(2): 220 – 227.
- [8] 孙盈, 田永强, 赵丽坤. 纤维素酶的 CMCC 酶活测定条件的研究 [J]. *食品工业科技*, 2013(2): 68 – 71, 74.
- [9] 宋贤冲, 唐健, 邓小军, 等. 产纤维素酶真菌的分离筛选、鉴定及其酶学性质分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(3): 372 – 378.
- [10] 马琳, 徐田田, 张铁军. 红缘拟层孔菌液体发酵培养基配方的研究 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(2): 121 – 124.
- [11] 安莉颖, 施思, 谭德勇, 等. 里氏木霉 *RutC-30* 产纤维素酶条件优化研究 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(8): 4818 – 4820.