

Applied Study on Cellulase Production from Pretreated Wheat Straw by *Trichoderma reesei*

Key Point Study on Fuel Ethanol Production from Lignocellulosic Materials

Yuxiao Wang, Wenchang Zhuang, Ju Wang, Linlin Zhou, Yiting Sun, Xin Liu, Fengjuan Ge*

Xuzhou Engineering Research Center of Bio fuel, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou, Jiangsu, China, 221008

Email: wangyuxiao@xzit.edu.cn

Abstract: With the aim to improve cellulase production by *Trichoderma reesei* while trying to reduce its costs, the orthogonal experiments including the pretreatment of wheat straw as substrate instead of micro-crystalline cellulose by *Phanerochaete chrysosporium* and dilute acid were conducted. The result of a volumetric enzyme activity of filter paper activity (FPA, $6.11 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$), carboxymethyl cellulase activity (CMCase, $29.11 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$) and cellobiase activity (CBA, $16.11 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$) in the cellulase production under the optimum condition at initial pH5.0 and 30°C for 48 hours with pretreated wheat straw: bran = 3:2(w:w) by *Trichoderma reesei* showed a highly significant increase of FPA (30.78%), CMCase (26.82%) and CBA (37.11%) compared to previous cellulase production.

Keywords: cellulase production; pretreated wheat straw; *Trichoderma reesei*; filter paper activity(FPA); carboxymethyl cellulase activity (CMCase), cellobiase activity(CBA)

里氏木霉利用预处理小麦秆生产纤维素酶的应用研究

木质纤维素燃料乙醇关键技术研究

王欲晓, 庄文昌, 王 菊, 周琳琳, 孙怡婷, 刘 鑫, 葛奉娟 *

徐州工程学院徐州市生物质燃料工程技术研究中心, 江苏徐州, 中国, 221008

Email: wangyuxiao@xzit.edu.cn

摘 要: 为了降低里氏木霉生产纤维素酶的成本, 研究了小麦秸秆经白腐菌和酸处理后主要成分如纤维素、木聚糖、木质素含量的变化, 采用正交实验考察了里氏木霉菌发酵小麦秆生产纤维素酶的最佳条件, 研究得到的最佳条件为: 小麦秆: 麸皮=2: 3, 培养温度 30°C , 起始 pH5.0, 发酵时间 48h。通过对正交实验条件的优化, 发酵液滤纸酶活(FPA)为 $6.11 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 羧甲基纤维素酶活(CMCase)为 $29.11 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 纤维二糖酶活(CBA)为 $16.11 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。原工艺相比 FPA、CMCase 和 CBA 分别提高了 30.78%、26.82%和 37.11%。

关键词: 纤维素酶生产; 预处理小麦秆; 里氏木霉; 滤纸酶活; 羧甲基纤维素酶活; 纤维二糖酶活

1 引言

纤维素是地球上数量最大的可再生能源物质, 地球上每年光合作用的产物高达 $1.5 \times 10^{11} \sim 2.0 \times 10^{11} \text{ t}^{[1]}$, 是人类社会赖以生存的基本物质来源, 中国每年仅农业生产中形成的农作物残渣(稻草、麦秆等) 就约有 20 亿 $\text{t}^{[2]}$ 。但由于其木质纤维素含量高, 生物降解缓慢, 目前对其利用率不高。近年来对纤维素降解方面的研究最经济、环保的方法就是生物降解^[3-5]。利用微生物或其产生的

纤维素酶可将纤维素酶解为低分子量的己糖或戊糖, 用于生产燃料乙醇、新型饲料、单细胞蛋白等, 将缓解人类面临的能源和粮食危机^[6]。

纤维素酶的生产成本是束缚纤维素酶大规模使用, 尤其是生物燃料乙醇工业化生产的瓶颈所在。本研究利用预处理的小麦秆作为里氏木霉培养基的碳源, 优化液态发酵的生产条件高产纤维素酶, 以寻求更好降低纤维素酶生产成本的有效途径。用经过预处理的小麦秆代替微晶纤维素作为主要碳源, 麸皮作为部分氮源, 既解决了环境污染问题, 又可有效降低纤维素酶的生产成本。

基金项目: 江苏省重大科技支撑和自主创新项目(项目编号 BE2008121)

2 材料与方法

2.1 原料和菌种

小麦秆：取自中国江苏省铜山县，室内自然堆放。

菌种：里氏木霉（*Trichoderma reesei*），白腐菌（*Phanerochaete chrysosporium*），本实验室保藏。

2.2 培养基^[7]

白腐菌种子培养基（g·L⁻¹）：综合 PDA：马铃薯浸取液 1.0L，葡萄糖 20.0g，KH₂PO₄ 3.0g，MgSO₄·7H₂O 1.5g，维生素 B₁ 微量，琼脂 15.0g，PH 6.0，100℃灭菌 40min 后使用。。

里氏木霉种子培养基（g·L⁻¹）：葡萄糖 10，蛋白胨 3，硫酸铵 2，酵母膏 0.5，KH₂PO₄ 4，Ca₂Cl₂·2H₂O 0.3，MgSO₄·7H₂O 0.3，100℃灭菌 40min 后使用。

里氏木霉正交实验产酶培养基：（g·L⁻¹）：蛋白胨 3，酵母膏 0.5，KH₂PO₄ 3，Ca₂Cl₂·2H₂O 0.3，MgSO₄·7H₂O 0.3，硫酸铵 1.5 或 2，小麦秆：麸皮(W/W)=1:5 或 2:3，100℃灭菌 30min 后使用。

里氏木霉优化产酶培养基（g·L⁻¹）：蛋白胨 3，硫酸铵 2，酵母膏 0.5，KH₂PO₄ 3，Ca₂Cl₂·2H₂O 0.3，MgSO₄·7H₂O 0.3，Tween80 0.2，Avicel：麸皮(W/W)=2:3，100℃灭菌 30min 后使用。

2.3 主要仪器与设备

洁净工作台 SW-CJ-1FD，苏州净化设备有限公司；生化培养箱 LRH-250，上海一恒科学仪器有限公司；数显恒温气浴振荡器 THZ-82A，金坛市金南仪器制造有限公司，紫外可见分光光度计 UV751GD，上海分析仪器总厂；自动手提式灭菌器 YXQ-LS-18SI，上海博讯实业有限公司；电热恒温鼓风干燥箱 DHG，上海精宏实验设备有限公司；数显恒温水浴锅 HH-4，常州国华电器有限公司；台式高速冷冻离心机 TGL-16gR，上海安亭科学仪器厂；真菌发酵系统 RTY-S-50L，镇江日泰生物工程设备有限公司。

Table 1. Design of factors and levels of orthogonal experiment for cellulase production

表 1 纤维素酶生产的 正交实验 4 因素 2 水平设计表

水平 level	因素 Factors			
	A	B	C	D
	小麦秆:麸皮 wheat straw: bran	无机氮源 inorganic N sources /%	pH	温度 Temperature /℃
1	1:5	0.15%	5.0	28
2	2:3	0.20%	5.5	30

2.4 实验方法

1.4.1 种子液的制备

白腐菌种子液：采用蒸馏水斜面孢子悬液，挑 1 环孢子至 5 mL 液体种子培养液于 25 mL 试管中，在 28℃180 r·min⁻¹ 摇床上培养 5-7d，然后再将试管中的白腐菌（5mL 菌液 / 25 mL）按 10%的接种量接种到装有综合 PDA 培养基的锥形瓶(50 mL/250 mL)中，在 120r·min⁻¹，28℃的气浴恒温振荡器中培养 10h，显微镜检测后作为液体种子。

里氏木霉种子液：采用蒸馏水斜面孢子悬液，挑 1 环孢子至 5mL 液体种子培养液于 25mL 试管中，在 28℃150 r·min⁻¹ 空气摇床上培养 2-3d，测其 OD₆₀₀ 值为 0.3~0.6 之间，显微镜检测后作为液体种子。

1.4.2 小麦秆的预处理

白腐菌处理：将培养好的白腐菌液体种子液接种到粉碎的小麦秆中，接种量为 50mL 种子液：100g 小麦秆，室温培养 5 周，每隔 7 天取样，样品烘干恒重后定量分析其中木聚糖、纤维素和木质素的含量。

稀硫酸处理：酸浓度 0.6%，温度 100℃，固液比 1:10，处理时间 2h。处理后样品烘干恒重，然后定量分析其中纤维素、木聚糖和木质素的含量。

1.4.3 用于酶活分析的葡萄糖标准曲线的绘制

称取于(103±2)℃下烘干至恒重的无水葡萄糖 0.1000g，用水溶解并定溶至 100mL。参考文献^[11] 实验方法，绘制葡萄糖标准曲线。

1.4.4 生产纤维素酶的正交试验设计

里氏木霉液体种子以 10%的接种量接种到 50 mL 培养基/250 mL 锥形瓶中，转速 100 r·min⁻¹，参考文献^[8]设计纤维素酶生产的正交实验，按照表 1 要求以 FPA、CMCase 和 CBA 为指标考察小麦秆：麸皮、无机氮源、pH 和发酵温度等 4 因素的最佳组合。

Table 2. Cellulase production condition of sectional control by *Trichoderma reesei*

表 2 里氏木霉分段控制生产纤维素酶中试条件

发酵时间 / h	变温控制 T/ ℃	通气量控制 L/min	pH	转速 r/min
0~12	30	1:0.5 (40L/min)	4.8~5.2	150
12~120	28	1:1 (20L/min)		

1.4.5 分段控制生产纤维素酶中试试验

以 10 % 的接种量将培养成熟的里氏木霉液体种子接入装有 30L 发酵培养基的 50L 全自动真菌发酵罐中,按照表 2 的要求分段控制,进行纤维素酶发酵生产实验。在发酵过程中从 12h 起,每隔 12 h 取样检测 FPA、CMCase 和 CBA 酶活,每个样品分析 3 次取平均值计算。

1.5 分析方法

1.5.1 小麦秆主要化学成分定量分析方法

纤维素含量测定参照文献^[9];戊聚糖含量测定按照中华人名共和国国家标准 GB/T2677.9-94 造纸原料多戊糖含量的测定[M];酸不溶木质素含量测定按照中华人名共和国国家标准 GB/T2677.8-94 造纸原料酸不溶木质素含量的测定[M]。

1.5.2 待测酶液的制备

所得发酵液在 4℃ 低温冷冻离心机内,以转速 3500~4000 r·min⁻¹ 离心约 10min,除去固形物和菌体后,上清液即为粗酶液。如不澄清可继续离心^[10]。

1.5.3 酶活的测定方法

酶活定义:在标准反应条件下,1min 将底物转化生成 1μmol 产物所需要的酶量即为 1 个酶活力单位,单位为 IU·mL⁻¹。

(1) 滤纸酶活(FPA)的测定

参考文献^[11]有改动,具体如下:取 4 支具有 25mL 刻度的刻度试管编号 0~3, 0~3 试管各加 50 mg 滤纸,0 号不加酶液,1~3 号加入 0.5 mL 适当稀释澄清酶液,再加 1.0 mL 用 0.05 mol·L⁻¹ pH4.8 的柠檬酸缓冲液。在 50℃ 下反应 60 min,取出 0 号加 0.5 mL 酶液,迅速加入 DNS 溶液 3 mL 100 °C 煮沸 5 min,水浴冷却后,加蒸馏水定容至 10mL 刻度处,颠倒混匀,在 550nm 波长下,用 0 号管作空白,分别读取 1~3 号管的 OD 值。根据事先做出的葡萄糖标准曲线算

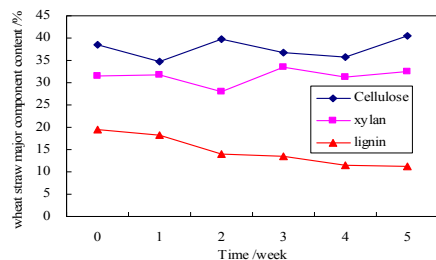


Figure 1. Dynamic curve of content variation of major components of wheat straw treated by *Phanerochaete chrysosporium*

图 1. 白腐菌处理小麦秆 5 周主要化学成分含量的动态变化曲线

出反应生成的糖量 (mg), 求得 FPA。

$$FPA(IU \cdot mL^{-1}) = \frac{\text{生成的还原糖量 (mg)} \times \text{稀释倍数} \times 10^3}{180 (g \cdot mol^{-1}) \times \text{酶液的体积 (mL)} \times 60(\text{min})}$$

(2) 羧甲基纤维素酶活(CMCase)测定

参考文献^[11]有改动,具体如下:在 25mL 刻度试管中加入 0.5mL 适当稀释澄清酶液及 1.0mL 用 0.005 mol·L⁻¹、pH4.8 的柠檬酸缓冲液配制的 1%羧甲基纤维素(天津柯密欧化学试剂开发中心)悬浮液。在 50℃ 下反应 30min。取出迅速加入 DNS 溶液 3 mL, 100 °C 煮沸 5 min,水浴冷却后定容至 10 mL,摇匀,550 nm 测定吸收值,求得 CMCase。

$$CMCase(IU \cdot mL^{-1}) = \frac{\text{生成的还原糖量 (mg)} \times \text{稀释倍数} \times 10^3}{180 (g \cdot mol^{-1}) \times \text{酶液的体积 (mL)} \times 30(\text{min})}$$

(3) 纤维二糖酶活(CBA)测定^[12]

参考文献^[12],具体如下:在 25 mL 刻度试管中加入 0.5mL 适当稀释澄清的酶液,以及 1.0mL 用 0.005 mol/L、pH4.8 的柠檬酸缓冲液配制的 1%水杨苷(上海源聚生物科技有限公司)溶液。在 50℃ 下反应 30 min。取出,迅速加入 DNS 溶液 3 mL, 100 °C 煮沸 5 min,水浴冷却后定溶至 25 mL,摇匀,550 nm 测定吸收值,求得 CBA。

$$CBA(IU \cdot mL^{-1}) = \frac{\text{生成的还原糖量 (mg)} \times \text{稀释倍数} \times 10^3}{180 (g \cdot mol^{-1}) \times \text{酶液的体积 (mL)} \times 30(\text{min})}$$

3 结果与讨论

3.1 小麦秆预处理实验结果

由图 1 可以看出,白腐菌在室温下处理小麦秆 5 周,木质素含量由 19.40%降低到 11.31%,减少了 41.70%,白腐菌去除木质素效果显著。但是纤维素含量和戊聚糖含量变化不明显。

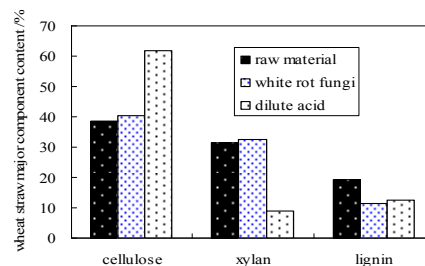


Figure 2. Histogram of major components content of wheat straw treated by *Phanerochaete chrysosporium* and dilute acid

图 2. 小麦秆经白腐菌和稀酸处理前后主要化学成分含量的变化图

由图 2 可以看出，经过白腐菌和稀酸联合处理，木质素和木聚糖去除效果显著，分别去除了 35.05%和 71.06，纤维素含量由 38.56%上升到 61.90%，增加了 60.53%。处理后的小麦秆可以用于纤维素酶的生产。

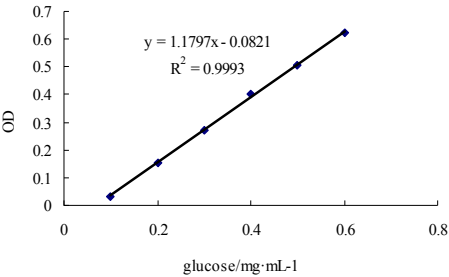


Figure 3. Calibration curve of glucose for enzymatic activity
图 3. 用于酶活分析的葡萄糖标准曲线

3.2 用于酶活分析的葡萄糖标准曲线

实验得到的葡萄糖标准曲线如图 3，由 Excel 软件分析得到的线性回归方程为 $y=1.1797x-0.0821$ （y 为 OD 值，x 为葡萄糖浓度）， $R^2=0.9993$ 说明 OD 值和葡萄糖浓度线性关系好，回归方程有意义，可以用于纤维素酶活分析。

3.3 纤维素酶生产正交实验结果和分析

纤维素酶生产正交实验结果见表 3，综合极差分析和方差分析的结果，可知最佳生产条件为：温度 30℃、pH5.5、小麦秆：麸皮=2:3、无机 N 源 0.2%。发酵液中 FPA、CMCase、CBA 等 3 种酶活最高分别为 4.229 IU·mL⁻¹，21.303 IU·mL⁻¹，10.131 IU·mL⁻¹。

Table 3. Result of orthogonal experiment for cellulase production by *Trichoderma reesei*
表 3. 里氏木霉生产纤维素酶正交实验结果

	A	B	C	D	FPA /IU·mL ⁻¹	CMCase /IU·mL ⁻¹	CBA /IU·mL ⁻¹
1	1	1	1	1	2.046	10.373	8.361
2	1	1	1	2	3.633	9.320	9.319
3	1	2	2	1	3.344	5.148	8.500
4	1	2	2	2	3.304	12.669	10.131
5	2	1	2	1	3.002	10.750	9.254
6	2	1	2	2	4.229	16.568	9.174
7	2	2	1	1	3.138	11.184	8.915
8	2	2	1	2	3.238	21.303	8.486
K1	3.082	3.227	3.014	2.882			
K2	3.402	3.256	3.470	3.601			
R	0.310	0.029	0.456	0.719			
FPA	F	0.495	0.005	2.495			
influence factor	D>C>A>B						
optimum condition	D2 C2 A2 B2						
Significant	-	-	-	[*]			
K1	9.378	11.753	13.045	9.364			
K2	14.951	12.576	11.284	14.965			
R	5.573	0.823	1.761	5.601			
CMCase	F	1.877	0.041	0.187			
influence factor	D>A>C>B						
optimum condition	D2 A2 C1 B2						
Significant	[*]	-	-	[*]			
K1	9.078	9.027	8.770	8.757			
K2	8.957	9.008	9.265	9.278			
R	0.121	0.019	0.495	0.521			
CBA	F	0.109	0.004	1.847	2.040		
influence factor	D>C>A>B						
optimum condition	D2 C2 A1 B1						
Significant	-	-	[*]	[*]			

K1: 因素水平 1 的实验平均值; K2: 因素水平 2 的实验平均值; R 每个因素 2 水平的极差; F=SD1/SD2; Significant: 显著性判断标准, 当 $F_j > F_{0.01}(1,4)$, 称因素在 $\alpha=0.01$ 水平上显著 (高度显著) 记为**; 当 $F_{0.01}(1,4) > F_j > F_{0.05}(1,4)$, 称因素在 $\alpha=0.05$ 水平上显著 (显著) 记为*; 当 $F_{0.05}(1,4) > F_j > F_{0.10}(1,4)$, 称因素在 $\alpha=0.10$ 水平上显著 (较显著) 记为 (*); 当 $F_{0.10}(1,4) > F_j > F_{0.25}(1,4)$, 称因素在 $\alpha=0.25$ 水平上显著 (有影响) 记为[*]; 当 F_j 值 $< F_{0.25}(1,4)$, 称因素不显著, 记为-。 $F_{0.01}(1,4)=21.20$, $F_{0.05}(1,4)=7.71$, $F_{0.10}(1,4)=4.54$, $F_{0.25}(1,4)=1.8$ 。

3.4 纤维素酶中试实验结果

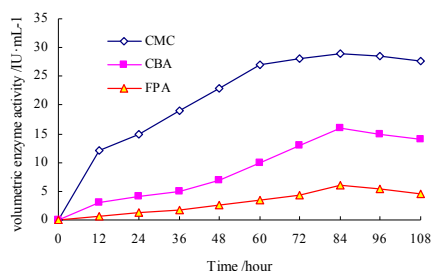


Figure 4. Dynamic curve of analysis result of CMCase, CBA and FPA in the cellulase production on pilot scale

图 4. 纤维素酶中试实验过程中 CMCase、CBA 和 FPA 的动态变化曲线

在 50L 中试发酵罐中分段控制里氏木霉发酵生产纤维素酶，每隔 12h 检测发酵液中 FPA、CMCase、CBA 等 3 种酶活，结果如图 4 所示。由图 4 可以看出，发酵 84h，FPA、CMCase、CBA 等 3 种酶活最高分别为 $6.11 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ， $29.11 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ， $16.11 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，和原工艺相比分别提高了 30.78%、26.82%、37.11%。优化后的生产工艺取得了显著效果。

4 结论

小麦秆经白腐菌和稀硫酸联合处理，木质素和戊聚糖去除效果显著，纤维素含量由 38.56% 上升到 61.90%，增加了 60.53%。

通过正交试验，确定了里氏木霉生产纤维素酶的最有条件：小麦秆：麸皮=2:3，培养温度 30°C ，发酵时间 48h，起始 pH5.0。正交试验结果：FPA 最高为 $4.229 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，CMCase 最高为 $21.303 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，CBA 最高为 $10.131 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

通过优化生产条件，分段控制，在 50L 中试发酵罐中，里氏木霉发酵预处理小麦秆生产纤维素酶，48h 粗酶液中 FPA、CMCase 和 CBA 等 3 种酶活分别为 $6.11 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $29.11 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $16.11 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，和原工艺相比分别提高了 30.78%、26.82% 和 37.11%。本研究为工业化大规模生产纤维素酶提供了借鉴。

致 谢

衷心感谢江苏省重大科技支撑和自主创新项目（项目编号 BE2008121）对本研究的资助。衷心感谢徐州工程学院化学化工学院实验室主任岳玮高级实验师对本研究提供的帮助。

References (参考文献)

- [1] QU Xiao-shuang, DUN Bao-qing, GUO Ming-ming, et al. Initial studies on isolation of a thermophilic cellulose-degrading bacteria and its enzymology characteristics[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2009, 11(1): P124-128.
曲小爽, 顿宝庆, 郭明鸣, 等, 一株嗜热纤维素分解菌的分离及其酶学性质的初探[J], 中国农业科技导报, 2009, 11(1): P124-128.
- [2] DENG Mao-Cheng, WANG Yao, YANG Yuan-e. Study on the technics of deep liquid fermentation of cellulase-enzyme with a trichoderma green[J]. Food and Machinery, 2004, 20(03): P6-8.
邓毛程, 王瑶, 阳元娥, 一株绿色木霉液体深层发酵产纤维素酶工艺研究[J], 食品与机械, 2004, 20(03): P6-8.
- [3] Masohiro N, Masahiro G, Hirofumi O, et al. L-sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*[J]. Curr Genet, 2001 (38): P329-334.
- [4] Rizzatti ACS, Jorge JA, Terenzi HF, et al. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-glucosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2001 (26): P156-160.
- [5] HUANG Ji-chuan, PENG Zhi-ping, YU Jun-hong, et al. Screening of a maize straw cellulose-decomposition fungus strain and its cellulase-producing condition [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2009(1): P89-91.
黄继, 彭智平, 于俊红等, 降解玉米秸秆纤维素的真菌筛选及其产酶条件研究[J], 广东农业科学, 2009 (1): P89-91.
- [6] WU Dan, DENG Ze-yuan, FAN Ya-wei, et al. The optimal liquid fermentation conditions of cellulase production by *Neurospora crassa*[J]. Food and Machinery, 2007, 23(3): P25-27.
吴丹, 邓泽元, 范亚伟等, 粗壮脉纹孢菌液体发酵产纤维素酶的条件优化[J], 食品与机械, 2007, 23 (3): P25-27.
- [7] YU Xiao-bin, JU Rui-mo. *Trichoderma reesei* liquid fermentation production cellulase[J]. Food and Fermentation Industries, 1988, (01) P22-27.
余晓斌, 具润漠, 里氏木霉液体发酵法生产纤维素酶[J], 食品与发酵工业, 1998, (01) P22-27.
- [8] ZHANG Xiao-xuan, LI Jing-fu, WANG Aoxue. *Trichoderma reesei* optimized conditions of cellulase [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008, (07) P29-33.
张晓娟, 李景富, 王傲雪, 里氏木霉产纤维素酶条件的优化[J], 东北农业大学学报, 2008, (07) P29-33.
- [9] LIU Shuai, ZHANG Meiyun. Analysis and determination for pulp and paper [M]. Beijing: industry press of chemical engineering, 2004, P17-30.
刘书钗, 张美云等, 制浆造纸分析与检测[M], 北京: 化工工业出版社, 2004, P17-30.
- [10] HU Cai-jing, DAI Shu-mei, LI Qiu-yuan. *Trichoderma reesei* liquid fermentation production cellulase research [J]. Food and Fermentation Industries, 2005, (09) P49-52.
胡彩静, 代淑梅, 李秋园, 里氏木霉(*Trichoderma reesei*)产纤维素酶液体发酵条件的研究[J], 食品与发酵工业, 2005, (09) P49-52.
- [11] Chinese National Standard for light industry (QB / T 2583-2003) Cellulase [M]. Beijing: China National Development and Reform Committee, 2003, P4-9.
中华人民共和国轻工业行业标准 (QB / T 2583-2003) 酶制剂 [M]. 北京: 中华人民共和国国家发展与改革委, 2003, P4-9.
- [12] JIANG Hua, YU Zhao-hai. Purification and Characterization of Cellulase from *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2007, (06) P48-52.
江华, 于兆海, 里氏木霉纤维素酶系的分离及其酶学性质[J], 南京林业大学学报, 2007, (06) P48-52.