

嗜热子囊菌光孢变种 *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* β-葡萄糖苷酶的分离纯化及特性研究

王冬梅¹, 李多川¹, 孟 军²

(1. 山东农业大学环境生物系, 山东 泰安 271018; 2. 山东省莱芜市畜牧局, 山东 莱芜)

摘 要:采用室内培养、测定方法,对嗜热子囊菌光孢变种 *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* 产生的 β-葡萄糖苷酶进行了分离纯化及特性研究。粗酶液经硫酸铵沉淀、DEAE-Sephrose Fast Flow 阴离子层析、Phenyl-Sephrose 疏水层析等步骤获得了凝胶电泳均一的 β-葡萄糖苷酶。结果表明,经 12%SDS-PAGE 测得酶的单亚基分子量约为 118 kDa,凝胶过滤层析测得酶的分子量约为 350 kDa。该酶反应的最适温度和最适 pH 分别为 80 ℃和 4.5~5.0,在 pH5.0 条件下,该酶在 70 ℃条件下基本稳定,80 ℃保温 30 min,剩余酶活为 15%。金属离子对 β-葡萄糖苷酶活性影响较大,其中 Ca²⁺、Ba²⁺对酶有激活作用;Ag⁺、Fe³⁺、Cu²⁺对酶有显著的抑制作用。该酶对水杨苷具有很强的底物特异性。

关键词:嗜热子囊菌光孢变种; *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*; β-葡萄糖苷酶; 纯化; 特性

中图分类号:Q936 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)05-1007-06

Purification and Properties of β-glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*

WANG Dong-mei¹, LI Duo-chuan¹, MENG Jun²

(1. Department of Environmental Biology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 2. Animal Husbandry Bureau of Laiwu, Shandong Province)

Abstract: Cellulose is the most abundant and renewable source of energy on Earth. It is an insoluble polysaccharide composed of long, linear chains of β-1,4-linked glucose units. Cellulase system is a series of enzymes that can break down cellulose in the natural circumstance and make little pollution to the environment. The enzymes can be divided into three types: endo-β-1,4-glucanase (EC3.2.1.4), exo-β-1,4-glucanase (EC3.2.1.91) and β-glucosidase (EC3.2.1.21). β-Glucosidase completes the hydrolysis by converting cellobiose and cellooligosaccharides into glucose. It also stimulates the rate and extent of cellulose hydrolysis by relieving cellobiose-induced inhibition of endo- and exo-glucanases. *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* Upadhyay, Farmelo, Goetz & Melan is a new record species of thermophilic fungi isolated from Yunnan Province, grows well at 45℃~50℃, and the cellulase system produced by it keep higher activities. By using ammonium sulfate fraction, DEAE-Sephrose Fast flow chromatography, Phenyl-Sephrose Fast Flow chromatography and SephacrylS-100 chromatography, an extracellular β-glucosidase from culture supernatant of *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* was purified, and its properties and substrate specificities were studied. The single subunit molecular weight and molecular weight were about 118000 and 350000, which was identified by 12% SDS-PAGE and gel filtration respectively.. The β-glucosidase was a homotrimer and optimally active at pH 4.5~5.0 and 80℃, showed almost thermostable at 70℃, and kept 15% of its optimal activity after 30 min at 80 ℃.It was stable at pH5.0, but the stability decreased at pH values above and below 5.0. Different metal ions had different effects on the activity of β-glucosidase, Ca²⁺ and Ba²⁺ enhanced the activity, whereas Ag⁺, Fe³⁺ and Cu²⁺ inhibited it. The enzyme acted on salicin specially.

Keywords: thermophilic fungi; *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*; β-glucosidase; purification; properties

纤维素酶是一种能降解纤维素生成葡萄糖的复合酶系,由三类不同但又互补的酶组成。其中, β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, EC3.2.1.21,也称为 BG 或纤维二糖酶)^[1]的作用是水解纤维二糖和低分子量的纤维寡糖生成葡萄糖,从而防止纤维二糖的积累^[2-3],同时该酶可显著提高外切葡聚糖酶和内切葡聚糖酶的活性^[4],能大大促进纤维素酶系的整体水解活性,因此对 β -葡萄糖苷酶进行具有重要的理论意义和应用价值。

中温真菌(mesophilic fungi)分泌的纤维素酶在反应中生物学性质不稳定,以致于很多高温化学反应过程难以实现。嗜热真菌产酶快、量大且分解纤维素效率高,是一类非常具有开发潜力的纤维素分解菌。Bhat等研究发现嗜热真菌 *Sprotrichum thermophile* 降解纤维素的速度是中温真菌 *Trichoderma reesei* 的 5 倍^[5]。目前,对嗜热真菌(thermophilic fungi)及其产生的嗜热酶的研究已成为重点和热点。

作者从云南大理分离到的嗜热子囊菌光孢变种是嗜热子囊菌属中的一个变种,其最适生长温度为 45℃~50℃,产生的 β -葡萄糖苷酶酶有很强的耐热性。Marey 等对嗜热子囊菌光孢变种的蛋白酶进行了纯化及性质研究^[6],本文主要对其产生的 β -葡萄糖苷酶的分离纯化和主要性质作一报道。

1 材料和方法

1.1 菌种、培养基及培养条件

1.1.1 菌种

嗜热子囊菌光孢变种 (*Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*),由本人分离并鉴定,菌种保存于山东农业大学植物病理学标本室,标本号:HSAUP 90001。

1.1.2 培养基

固体培养基:PDA 培养基。

液体培养基:1 000 mL 培养基含 KH_2PO_4 2 g, CaCl_2 0.3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, MgSO_4 0.3 g, 酵母 0.5 g, 蛋白胨 1 g,微晶纤维素 10 g,吐温-80 1 mL, Vogel's 微量元素 1 mL,自来水 250 mL,蒸馏水 750 mL。用浓盐酸调 pH 值到 6.5,103.5 kPa 下灭菌 30 min(Hong J, 2003)。

1.1.3 培养条件

将活化的菌种接种到含固体培养基 PDA 的培养皿中,50℃培养 3 d 后,取 30 块直径 1 cm 的菌块接种到含 75 mL 液体培养基的 250 mL 摇瓶中,共 20

瓶。在水浴恒温摇床 (120 r·min⁻¹, 50℃) 上培养 7 d 后,纱布过滤,将滤液于 8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液即为粗酶液。

1.2 酶活性测定

DNS 法^[7]测定酶反应产物-还原糖。原理:利用 3,5-二硝基水杨酸与还原糖溶液共热后被还原成棕红色的氨基化合物,在一定的范围内还原糖的量和棕红色的物质颜色深浅的程度成一定的比例关系,可用于比色测定。

将 0.1 mL 0.05 mol·L⁻¹pH5.0 的醋酸缓冲液、0.1 mL 1%水杨苷溶液、0.1 mL 适当稀释的酶液混合后,50℃保温 30 min,用 DNS 法测产生的还原糖。一个酶活力单位(U)定义为水解水杨苷产生 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 还原糖所需的酶蛋白量。

1.3 酶的分离纯化

粗酶液加硫酸铵至 90%饱和度,过夜沉淀后 8 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,收集沉淀,用适量的缓冲液 A (0.05 mol·L⁻¹Tris-HCl 缓冲液,pH8.0)回溶,并在相同缓冲液中透析 24 h,10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液。将上清液施于经缓冲液 A 平衡好的 DEAE-Sepharose 柱(1.0 cm×20 cm;凝胶为 pharmacia 产品),酶蛋白先用 5 倍柱床体积的缓冲液 A 洗脱至 A280 不变后,再用 120 mL 缓冲液 A 和 120 mL 含 NaCl (0.3 mol·L⁻¹)的相同缓冲液进行线形梯度洗脱,流速为 3 mL·min⁻¹,2 min 收集 1 管,每管进行活性测定。收集有活性的酶液加固体硫酸铵至 50%的饱和度后,立即施于经含 50%饱和硫酸铵的缓冲液 A 平衡的 Phenyl-Sepharose 疏水柱 (1.0 cm×20 cm;凝胶为 Pharmacia 产品)。酶蛋白先用 5 倍床体积的含 50%饱和硫酸铵的缓冲液 A 洗脱至 A280 不变后,再用 100 mL 50%饱和硫酸铵的相同缓冲液和 100 mL 不含硫酸铵的相同缓冲液进行梯度洗脱,流速 3 mL·min⁻¹,2 min 收集 1 管。收集有活性的酶液加固体硫酸铵至 90%的饱和度,过夜沉淀后 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集沉淀,用适量的缓冲液 A 回溶并定溶至 2 mL,10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液施于经缓冲液 A 平衡好的 Sephacryl S-100 柱(1.0 cm×100 cm;凝胶为 pharmacia 产品)进行分子筛层析,用缓冲液 A 洗脱,流速 0.3 mL·min⁻¹,6 min 收集 1 管,收集有活性的酶液,用 SDS-PAGE 确认其纯度。

1.4 蛋白质纯度及分子量测定

采用 SDS-PAGE 和凝胶过滤层析法^[8],聚丙烯酰胺凝胶浓度为 12%,标准蛋白为 Pharmacia 生产的较

高分子量标准蛋白。

1.5 蛋白质含量测定

蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[9],以牛血清白蛋白为标准蛋白。

2 结果和分析

2.1 酶的纯化及鉴定

2.1.1 DEAE-Sephacryl Fast Flow 阴离子交换柱层析

850 mL 粗酶液经 90%硫酸铵沉淀、缓冲液 A 回溶及透析后得到 45 mL 酶液,进行 DEAE-Sephacryl 层析,结果如图 1 所示。共得到 4 个蛋白峰,经检测峰 I-2 和 I-3 均有酶活性,而 I-1 和 I-4 为杂蛋白峰,故收集 I-2 和 I-3 中有活性的酶液进行下一步的纯化(约 56 mL)。

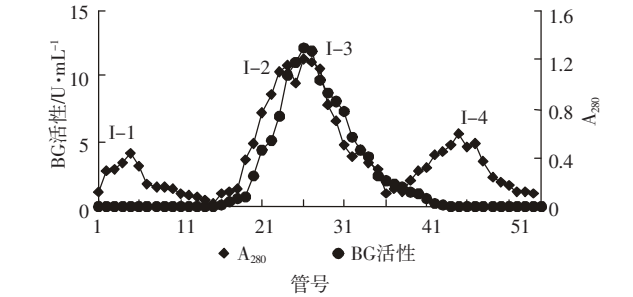


图 1 DEAE-Sephacryl Fast Flow 层析图谱
Figure 1 Chromatography of β -glucosidase on DEAE-Sephacryl Fast Flow

2.1.2 Phenyl-Sephacryl 疏水柱层析

56 mL 酶液经 Phenyl-Sephacryl 层析后,结果如图 2 所示。共得到 3 个蛋白峰,经检测峰 II-3 有酶活性,II-1 和 II-2 为杂蛋白峰,收集 II-3 中有活性的酶液,进行下一步的纯化(约 34 mL)。

2.1.3 Sephacryl S-100 分子筛层析

将有活性的 34 mL 酶液脱盐处理后浓缩至约 2

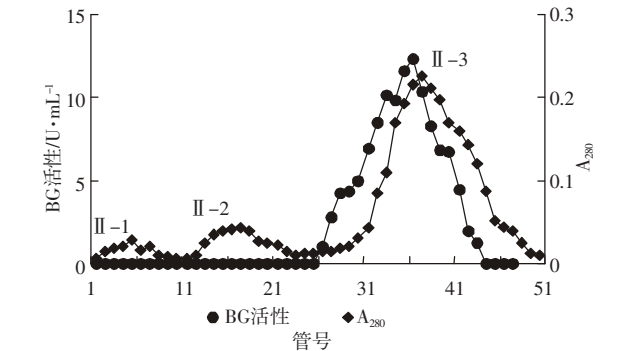


图 2 Phenyl-Sephacryl 层析图谱
Figure 2 Chromatography of β -glucosidase on Phenyl-Sephacryl

mL 进行分子筛层析,结果如图 3 所示。共得到 4 个蛋白峰,经检测峰 III-1 为酶蛋白峰,III-2、III-3 和 III-4 为杂蛋白峰。收集峰 III-1 的约 8.5 mL 酶液,经 SDS-PAGE 检测只显示一条蛋白带(图 4),表明已达到电泳纯。整个纯化过程见表 1。 β -葡萄糖苷酶相对于粗酶液纯化了 12.8 倍,酶比活力由 $5.15 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 提高到了 $65.7 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,活力回收率为 3.9%。

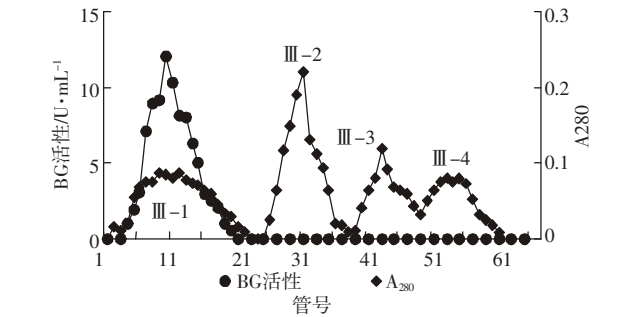


图 3 Sephacryl S-100 分子筛层析图谱
Figure 3 Chromatography of β -glucosidase on Sephacryl S-100

表 1 嗜热子囊菌光孢变种产生的 β -葡萄糖苷酶的纯化
Table 1 Purification of β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*

纯化步骤	总体积 /mL	总蛋白量 /mg	总活力 /U	比活力 /U · mg ⁻¹	纯化倍数	回收率 /%
Crude extract	850	582	2 996.5	5.15	1.00	100
90%(NH ₄) ₂ SO ₄	45	36.1	514.46	14.25	2.77	17.17
DEAE-Sephacryl	56	8.71	411.9	47.3	9.18	13.7
Phenyl-Sephacryl	34	3.68	204.4	55.5	10.78	6.82
Sephacryl S-100	8.5	1.82	119.6	65.7	12.8	3.90

2.2 β -葡萄糖苷酶的一般性质

2.2.1 酶的分子量

采用 SDS-PAGE 测定该酶的单亚基分子量约为 118 kDa,如图 4 所示;采用凝胶过滤层析法测得该酶的分子量约为 350 kDa,说明本研究所纯化的 β -葡萄糖苷酶为三聚体蛋白质。

2.2.2 酶反应的最适温度

不同温度下测酶活性,得出酶反应的最适温度为 80 ℃,见图 5。

2.2.3 酶反应的最适 pH

在不同 pH 值的甘氨酸-HCl、磷酸、醋酸、Tris-HCl 缓冲液中测定酶活性,测出该酶反应的最适 pH 值为 4.5~5.0,见图 6。

2.2.4 酶的热稳定性

将适量酶液与 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 值为 5.0 的 HAc-NaAc 的缓冲液在不同的温度下分别保温不同

时间后,立即在 0℃冰箱中冷却,然后在 50℃下测酶的活性,以未经过保温处理的酶活性为 100%。该酶具有较高的热稳定性,70℃条件下基本稳定;80℃保温 30 min,还有 15%的原酶活性,见图 7。

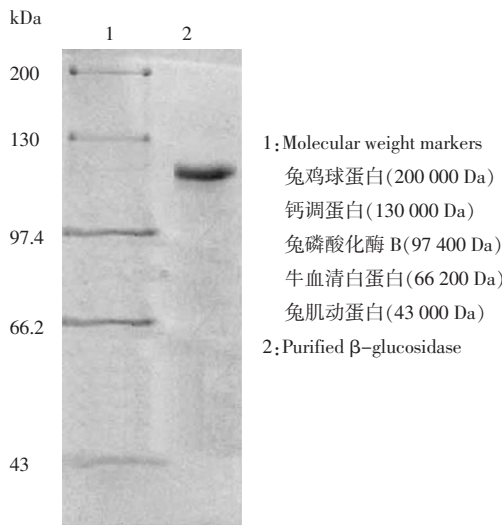


图 4 纯化的 β-葡萄糖苷酶 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
Figure 4 SDS-PAGE pattern of purified β-glucosidase

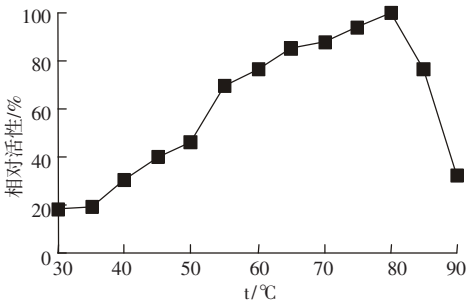


图 5 温度对 *T. aurantiacus* var. *levisporus* 产生的 β-葡萄糖苷酶活性的影响
Figure 5 Effect of temperature on the activity of β-glucosidase from *T. aurantiacus* var. *levisporus*

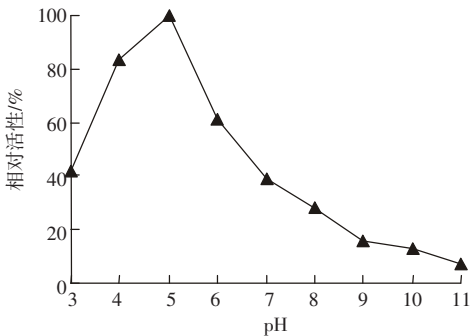


图 6 pH 值对 *T. aurantiacus* var. *levisporus* 产生的 β-葡萄糖苷酶活性的影响
Figure 6 Effect of pH on the activity of β-glucosidase from *T. aurantiacus* var. *levisporus*

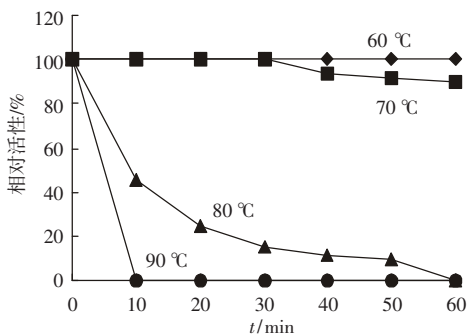


图 7 *T. aurantiacus* var. *levisporus* β-葡萄糖苷酶的热稳定性
Figure 7 Kinetics of thermostability of β-glucosidase from *T. aurantiacus* var. *levisporus*

2.2.5 酶的 pH 稳定性

将适量酶液与不同 pH 缓冲液在 50℃下预处理 1 h 后,调整 pH 为 5.0,标准条件下测酶活。该酶在 pH4.0~5.0 之间较稳定;在 pH8 时,剩余酶活为 25%,说明该酶耐酸性。(图 8)

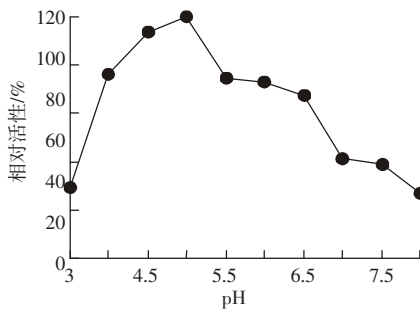


图 8 *T. aurantiacus* var. *levisporus* β-葡萄糖苷酶的 pH 值稳定性

Figure 8 Kinetics of pH of β-glucosidase from *T. aurantiacus* var. *levisporus*

2.2.6 不同金属离子对酶活性的影响

在酶与底物反应的条件下,加入不同的金属离子,使其终浓度为 0.05 mol·L⁻¹,以不加金属离子的酶活为 100%,测定酶活。结果见表 2。Ca²⁺、Ba²⁺对酶有激活作用;Fe³⁺、Cu²⁺、Ag⁺对酶有显著的抑制作用;K⁺、Na⁺、Mn²⁺对酶活的影响不大,Mg²⁺、Zn²⁺对酶活有不同程度的抑制作用。

2.2.7 酶的底物特异性

在标准反应条件下,用浓度为 1%的不同物质(羧甲基纤维素钠、滤纸、脱脂棉、微晶纤维素、水杨苷)与酶液进行反应,测定酶活,用 OD₅₄₀ 值表示。结果如表 3 所示。β-葡萄糖苷酶对水杨苷活性最高,滤纸次之;对脱脂棉、羧甲基纤维素钠有很少的水解作用;对微晶纤维素没有水解能力。说明 β-葡萄糖苷酶对底物

表 2 金属离子对 *T. aurantiacus* var. *levisporus*β-葡萄糖苷酶活性影响

Table 2 Effects of different metallic ions on the activity of β-glucosidase from *T. aurantiacus* var. *levisporu*

金属离子	相对酶活 I/%	金属离子	相对酶活 I/%
Cu ²⁺	5.22	Mn ²⁺	71.47
Ba ²⁺	103.6	K ⁺	80.73
Mg ²⁺	53.1	Na ⁺	90.52
Ca ²⁺	131.8	Ag ⁺	2.1
Zn ²⁺	32.5	H ₂ O	100
Fe ³⁺	1.24		

表 3 *T. aurantiacus* var. *levisporus*β-葡萄糖苷酶的底物特异性

Table 3 Substrate specificities of β-glucosidase from *T. aurantiacus* var. *levisporus*

底物	酶活（OD ₅₄₀ ）
水杨酸	0.895
滤纸	0.285
羧甲基纤维素	0.093
脱脂棉	0.132
结晶纤维素	0.00

有很强的特异性。

3 讨论

3.1 结果讨论

纤维素酶系是一个动态变化的复合酶体系,同一起来源的纤维素酶系在不同的培养时期各组分间的酶活性很不一致,β-葡萄糖苷酶的活力在产酶的初期上升很慢,到产酶后期才开始明显上升,波动较大^[10],本试验采用第 7 d 的培养液,效果较为理想。根据目前已报道纯化出的 β-葡萄糖苷酶,发现 β-葡萄糖苷酶不同于纤维素酶系的内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶,因其来源不同,其性质有很大区别,分子量的变化范围也是很广的。本试验从嗜热子囊菌光孢变种中纯化出的 β-葡萄糖苷酶分子量大,在 350 KDa 左右,与其它真菌分泌的胞外 β-葡萄糖苷酶分子量相似^[11~14]。通过对其性质进行研究发现,该酶的最适反应 pH 为 4.5~5.0,并且在酸性环境下性质稳定;该酶反应的最适温度为 80 ℃,高于已报道的从 *T. aurantiacus* 中纯化的 β-葡萄糖苷酶^[15,16]及其它真菌中的纤维素酶^[17,18];另外,该酶比从中温真菌和其它嗜热真菌中纯化的 β-葡萄糖苷酶具有较高的耐热性^[18~21],80 ℃下保温 30 min 仍具有约 15%的活性。

3.2 前景

纤维素是世界上最丰富的可再生资源,约占地球

生物总量的 40%,占植物总干重的 30%~50%^[22,23]。纤维素的利用和生物转化对解决世界能源危机、环境污染等问题具重大意义。纤维素酶在饲料工业、食品加工、医药、环保、纺织品处理与洗涤剂等领域用途非常广泛。本试验纯化出的 β-葡萄糖苷酶具有多数中温酶所不具备的特点,即较好的耐酸性和较高的热稳定性,这预示着该酶有稳定的蛋白质高级结构,将是研究蛋白质耐热机制的良好材料;同时,β-葡萄糖苷酶在纤维素酶系中的存在还对内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶有明显的促进作用^[4];另外,β-葡萄糖苷酶在纤维素降解中的应用极大地降低了化学试剂和化工用品对环境可能造成的污染。β-葡萄糖苷酶也将被应用于食品、饲料、加工工业和医药等更为广泛的领域,有着非常好的应用前景。

参考文献:

[1] Bhat M K, S Bhat. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications.Biotechnol[J]. *Adv*, 1997,15: 583-620.

[2] Koibe J, Kubicek C P.Quantification of the main components of the Trichoderma cellulose complex with monoclonal antibodies using an enzymelinked immunosorbent assay(ELISA) [J].*J Appl Microbiol Biotechnol*, 1990,34: 26-30.

[3] 阎伯旭、高培基.纤维素酶的分子结构与功能研究[J]. 生命科学, 1995,7(5): 22-25.

[4] Sternberg D.β-Glucosidase of Tricoderma: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1976,31: 648-654.

[5] Bhat K M,J S Gaikwad,R Maheshwari.Purification and characterization of an extracellularβ -glucosidase from the thermophilic fungus Sporotrichum thermophile and its influence on cellulose activity [J].*J Gen Microbiol*, 1997,139: 2825-2832.

[6] Marcy R M, Engelhardt T C, Upadhyay.Islation,partial purification,and some properties of protease I from a thermophilic mold Thermoascus aurantiacus var. levisporus[J]. *Mycopathologia*, 1984, 87: 57-65.

[7] 施特尔马赫著,钱嘉渊译.酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社,1992.102-119.

[8] 李如亮,王延枝,张楚富,等.生物化学实验[M]. 武汉:武汉大学出版社, 1998.79-84.

[9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the priciples of proteins-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*,1976,72: 248-259.

[10] 戴四发,贺淹才.黑曲霉产纤维素酶各组分特性及酶解条件[J].华侨大学学报(自然科学版),2001,22(1): 65-69.

[11] Bhat K M, Gaikwad J S, Maheshwari R. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the thermophilic fungus Sporotrichum thermophile and its influence on cellulase activity [J]. *J Gen Microbiol*,1993,139: 2825-2832.

[12] Kempton J B, Withers S G. Mechanism of Agrobacterium β-glucosidase

:kinetic studies[J]. *Biochemistry*, 1992, 31: 9961–9969.

- [13] Himmel M E, Adney W S, Fox J W, et al. Isolation and characterisation of two forms of β -glucosidase from *Aspergillus niger*[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1993, 40: 213–225.
- [14] Kuriyama k, Tsuchiya k, Murui T. Some properties of transglycosylation activity of sesame β -glucosidase[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59: 1142–1143.
- [15] Tong C, Cole A L, Shepherd M G. Production and properties of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* [J]. *Biochem J*, 1980, 191: 83–94.
- [16] Bedino S, Testore G, Obert F. Comparative study of glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* miehe. Purification and characterisation of intracellular β -glucosidase[J]. *Ital J Biochem*, 1985, 40: 341–355.
- [17] Wood T M, Mc,Crae S I, Wilson C, et al. Aerobic and anaerobic fungal cellulases with special reference to their mode of attack on crystalline cellulose[J]. *FEMS Symp*, 1988, 43: 31–52.
- [18] Bhat K M, McCrae S I, Wood T M. The endo-(1–4)- β -D-glu-
canase system of *Penicillium pinophilum* cellulase: isolation, purification, and characterization of five major endoglucanase components[J]. *Carbohydr Res*, 1989, 190: 279–297.
- [19] Khandke K M, Vithayathil P J, Murthy S K. Purification of xylanase, β -glucosidase, endocellulase and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 274: 491–500.
- [20] Cao W, Crawford D L. Purification and some properties of β -glucosidase from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF 1 [J]. *Can J Microbiol*, 1993, 39:125–129.
- [21] Christakopoulos P, Goodenough P W, Kekos D, et al. Purification and characterisation of an extracellular β -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*[J]. *Eur J Biochem*, 1994, 224: 379–385.
- [22] 王建平, 陈小娥. 纤维素酶的研究进展概况 [J]. 浙江水产学院学报, 1996, 15(2):140–144.
- [23] 刘纯强, 王祖农. 纤维素酶基因克隆及应用前景 [J]. 生物工程进展, 1991, 8–15.