

产黄纤维单胞菌 CR-14 菌株诱变选育及发酵条件优化

杨继业, 崔冠慧, 习彦花, 李亚冰, 张根伟, 张丽萍, 程辉彩*

(河北省科学院生物研究所, 河北 石家庄 050081)

摘要:为提高产黄纤维单胞菌 CR-14 纤维素酶活力,对菌株进行亚硝酸、紫外线及复合诱变处理,筛选产纤维素酶活较高的突变株,并对其发酵条件进行优化。结果表明,经亚硝酸和紫外线复合诱变得得到一株产纤维素酶活较高的菌株 Y-UA-18,其酶活力为 10.57 U,为原菌株产酶活力的 1.67 倍。通过正交试验得到菌株 Y-UA-18 产酶最佳培养基为:秸秆粉 1.0%、复合氮源 0.6%、 KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.1%、 NaCl 0.08%;最佳培养条件为:初始 pH 值 7.0、培养温度 30℃、发酵时间 3 d。通气量对菌株 Y-UA-18 产酶影响不明显,但在厌氧条件下发酵液酶活显著降低,0.1% TW-80 对菌株 Y-UA-18 的产酶没有影响。

关键词:产黄纤维单胞菌;纤维素酶;诱变;发酵条件

中图分类号:X172

文献标志码:A

文章编号:2095-6819(2016)03-0262-06

doi: 10.13254/j.jare.2015.0269

引用格式:

杨继业, 崔冠慧, 习彦花, 等. 产黄纤维单胞菌 CR-14 菌株诱变选育及发酵条件优化[J]. 农业资源与环境学报, 2016, 33(3):262-267.

YANG Ji-ye, CUI Guan-hui, XI Yan-hua, et al. Screening and Mutation Breeding of the *Cellulomonas flavigena* CR-14 and Optimization of Its Fermentation Conditions[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2016, 33(3):262-267.

Screening and Mutation Breeding of the *Cellulomonas flavigena* CR-14 and Optimization of Its Fermentation Conditions

YANG Ji-ye, CUI Guan-hui, XI Yan-hua, LI Ya-bing, ZHANG Gen-wei, ZHANG Li-ping, CHENG Hui-cai*

(Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050081, China)

Abstract: The *Cellulomonas flavigena* CR-14 was screened from the rumen of cattle, which had the ability of producing cellulose and was stored in our laboratory. In order to improve the cellulose activity of the CR-14, it was treated with nitrite, ultraviolet (UV) and complex mutagenesis. Initial selection identified 6 cellulase-producing strains, as demonstrated by their ability to turn Congo red plates yellow. These 6 strains were then rescreened by determining the cellulase activity of broth. Finally, through nitrite and UV mutagenesis, Y-UA-18 strain with the high cellulose yield and stable characteristics, which enzymatic activity was 10.57 U, 1.67 times of starting strain CR-14, was screened out. In order to provide a theoretical reference to the industrial production of the strain Y-UA-18, we conducted the single factor test and orthogonal test to the fermentation medium components and the fermentation conditions. The results showed that the best medium of strain Y-UA-18 enzyme production was as followed: straw powder 1.0%, nitrogen source 0.6%, MgSO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, NaCl 0.08%. The optimum fermentation conditions were: initial pH 7.0, incubation temperature 30℃, fermentation time 3 d, the effect of ventilation for strain Y-UA-18 enzyme production was not obvious, but under the condition of anaerobic, the enzyme activity of fermentation liquor was reduced, 0.1% TW-80 had no effect for enzyme production.

Keywords: *cellulomonas flavigena*; cellulase; mutation; fermentation conditions

我国每年产生秸秆约 6 亿 t, 约占全世界总量的 25%, 大部分秸秆被焚烧, 不仅污染环境, 同时也造成

了资源浪费^[1]。目前利用秸秆厌氧发酵产沼气, 可以回收高达 52% 的能源, 既高效利用资源又减少了环境污染, 因此具有较高的发展潜力^[2]。秸秆直接发酵产气效率比较慢, 这与秸秆中纤维素含量较高有关, 纤维素只有被纤维素酶水解成小分子糖才能充分利用^[3-5]。产黄纤维单胞菌 CR-14 是课题组从牛瘤胃中筛选的一株兼性厌氧纤维素酶产生菌, 其纤维素酶

收稿日期: 2015-11-11

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(14222901D, 14273801D, 15293805D);
河北省财政预算项目(13334-14334-15302)

作者简介: 杨继业(1989—), 女, 河北衡水人, 硕士, 研究方向为应用微生物。E-mail: 695819348@qq.com

* 通信作者: 程辉彩 E-mail: huicaicheng@163.com

活为 6.31 U,可以显著促进秸秆厌氧发酵水解效率^[6]。为了进一步提高菌株 CR-14 产纤维素酶活力,对菌株进行诱变处理,目前诱变方法主要是化学诱变、物理诱变。本文采用亚硝酸、紫外线诱变^[7]及复合诱变对 CR-14 进行菌种改良。为了对后续产业化生产提供理论依据,本文并对诱变选育出的高效菌株进行发酵条件优化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

产黄纤维单胞菌 CR-14 菌株:河北省科学院生物研究所微生物室保藏。

1.1.2 培养基

初筛培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)^[6]:刚果红 1.5、CMC-Na 5.0、 MgSO_4 0.5、 K_2HPO_4 10.0、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0、NaCl 0.5、琼脂 15.0,pH7.2~7.4。

种子培养基:PB 培养基。

发酵培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)^[6]:CMC-Na 10.0、蛋白胨 5.0、牛肉膏 2.5、 MgSO_4 0.5、 K_2HPO_4 10.0、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0、NaCl 2.5,pH7.2~7.4。

1.1.3 药品及溶液配制

羧甲基纤维素钠购于天津市巴斯夫化工有限公司,其他药品均为国产分析纯。(pH 4.6 乙酸-乙酸钠缓冲液; $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠溶液; $0.07\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 8.6 Na_2HPO_4 缓冲液)。

1.1.4 仪器设备

MLS-3020 型全自动高压灭菌锅;VS-1300U 型超净工作台;SPX-250B-Z 型生化培养箱;WFZ752 型可见紫外分光光度计;YP-502 型电子天平。

1.2 试验方法

1.2.1 CR-14 菌株的诱变

1.2.1.1 菌悬液的制备

将 CR-14 菌株接于种子培养基,32 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 12 h 后,用 0.9% 的生理盐水洗涤 2 次后,制备成菌悬液,调节菌液浓度约 $1.0\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.1.2 亚硝酸诱变

吸取 1 mL 上述菌悬液于 9 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.6)中,然后按 1:9 的比例与亚硝酸钠溶液($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)混匀,室温放置,每 5 min 取 1 mL 菌悬液加入 9 mL Na_2HPO_4 ($0.07\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 8.6)缓冲液中,终止反应,以未经亚硝酸钠处理的菌悬液作为对

照。稀释涂布,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养,每个处理 3 次重复,计算致死率和正突变率^[8]。

1.2.1.3 紫外诱变

吸取 5 mL 1.2.1.1 中菌悬液于无菌培养皿中。选用 20 W 紫外灯,预热 30 min 后,分别照射 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 s,照射距离为 30 cm。然后对各个照射时间的菌悬液进行稀释涂布,避光培养,每个处理 3 次重复,计算致死率以及正突变率。

1.2.1.4 亚硝酸-紫外复合诱变

先选取亚硝酸诱变致死率为 70%~75%的时间,对 CR-14 菌株进行处理,再选取紫外诱变致死率为 70%~80%的时间,再对其进行紫外线照射处理,然后将处理后的菌悬液进行稀释涂布,每个处理 3 次重复,计算致死率和正突变率。

1.2.2 菌株的选育

1.2.2.1 初筛

将诱变处理的菌株涂布于刚果红平板上,培养 2 d 后,挑选菌落透明圈与直径比值较大的菌株,接种于半固体穿刺培养基中。

1.2.2.2 复筛

将初筛所得菌株和初始菌株 CR-14 分别接种于种子培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 36 h 后,接种于发酵培养基中,经 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 60 h 后,将其发酵液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,然后测定上清液纤维素酶活力,试验设置 3 次重复^[9]。

酶活测定:按照中华人民共和国农业行业标准 GB 20287—2006,对菌株发酵液中纤维素酶活力进行测定。将发酵液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液,作为粗酶液。取 4 支大试管,1 支作空白对照,其余作为 3 个平行。样品管中加 1.0 mL 的粗酶液,然后 4 支试管分别加入 4.0 mL 已预热至 60 $^{\circ}\text{C}$ 的 CMC 缓冲液,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中反应 20 min 后,立即加入 3.0 mL DNS 显色剂,摇匀,向对照管中加 1.0 mL 的粗酶液。4 支试管放在沸水浴中显色 5 min 后立即取出,流水冷却,以空白对照调零点,在 490 nm 波长下测定样品管的 OD 值并记录结果。

酶活力定义:1 mL 酶液在一定条件下 1 min 水解羧甲基纤维素产生 1 μg 葡萄糖为 1 个纤维素酶活力单位(U)。

1.2.2.3 突变株遗传稳定性

将筛选所得菌株进行连续传种 8 代,同时测定每代发酵液的纤维素酶活性,检验菌株产酶性状遗传的稳定性,每代实验均设 3 次重复。

1.2.3 培养基组成优化

前期本实验室在适宜工业生产的基础上,已对合适的碳源和氮源做了大量研究,选定 1.0% 秸秆粉为碳源,0.15% 蛋白胨+0.15% 豆粕粉为氮源,然后按正交试验表 $L_9(3^4)$ 对氮源、 $MgSO_4$ 、 KH_2PO_4 和 NaCl 进行 4 因素 3 水平试验,同时设计 3 次重复^[10],以确定培养基最佳成分配比,如表 1 所示。

表 1 发酵培养基 4 因素 3 水平试验设计(%)

Table 1 The experimental design of 4 factors and 3 levels of fermentation medium(%)

水平	因素			
	豆粕粉+蛋白胨(A)	$MgSO_4$ (B)	KH_2PO_4 (C)	NaCl(D)
1	0.3	0.1	0.05	0.02
2	0.6	0.2	0.10	0.05
3	0.9	0.3	0.15	0.08

1.2.4 发酵条件优化

由于前期对菌株 CR-14 的发酵条件进行过大量实验,诱变选育后,Y-UA-18 菌株的分类地位没有改变,仍是产黄纤维单胞菌,通过正交实验确定突变菌株培养基主要成分和含量后,采用单因素实验,即可确定温度、时间、通气量以及表面活性剂 Tween80 等因素对菌株发酵水平的影响。因此为了简单、快捷,这里不再考虑正交实验设计。

1.2.4.1 温度和时间对产酶的影响

按 5% 接种量接种于上述优化的培养基中,分别于 20、25、30、37 °C 摇床培养 24 h,每个处理 3 次重复,测定发酵液中的纤维素酶活。

1.2.4.2 初始 pH 值对产酶的影响

按 5% 接种量接种于初始 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的培养基中,30 °C 摇床培养 72 h,每个处理 3 次重复,测定发酵液中纤维素酶活。

1.2.4.3 通气量对产酶的影响

按 5% 接种量分别接种于瓶装量为 50、100、150 mL 三角瓶中,同时按相同的接种量接种于 100 mL 的厌氧瓶中,充抽氮气 6 次后灭菌,30 °C 摇床培养 72 h,每个处理 3 次重复,测定发酵液中纤维素酶活。

1.2.4.4 Tween80 对产酶的影响

按 5% 接种量分别接种不添加 Tween80 (空白对照)、添加 0.1% Tween80,瓶装量为 150 mL 培养基中,30 °C 摇床培养 72 h,每个处理 3 次重复,测定发酵液中纤维素酶活。

1.2.5 数据处理

试验数据采用 SPSS Statistics 17.0 软件,Duncan's 检验进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 CR-14 菌株的诱变时间确定

由图 1、图 2 可知,随着亚硝酸诱变和紫外诱变时间的延长,菌株的致死率也随之增高,最终达到 100%。菌株的正突变率随时间延长呈现先增加后降低的趋势,在亚硝酸诱变和紫外线诱变的时间分别为 15 min、50 s,正突变率达到最高,分别为 9.77%、9.25%,此时菌株的致死率也较高,分别为 74.71%、82.43%,这与许多研究结果一致,诱变致死率在 70%~80% 范围内,菌株正突变率最高,便于筛选^[11],所以选取这两个时间作为复合诱变的处理时间。

2.2 诱变菌株的选育

2.2.1 菌株的筛选

如表 2 所示,通过初筛比较透明圈直径/菌落直径的方法,共选育出 6 株突变株,然后对这 6 株突变株进行发酵,通过测定发酵液的酶活进行复筛,得到

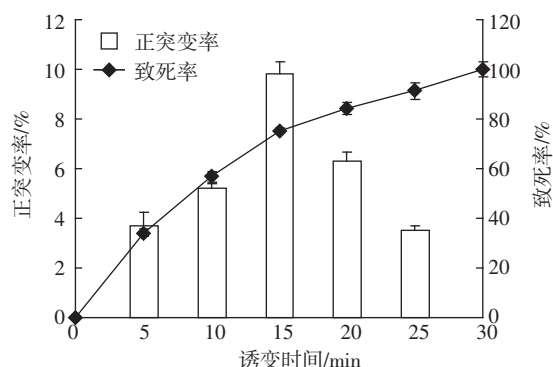


图 1 亚硝酸诱变

Figure 1 The mutation effect of HNO_2

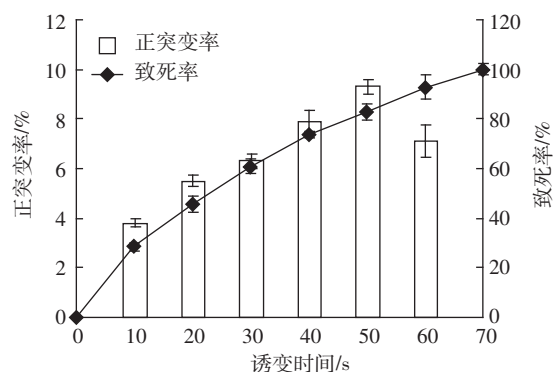


图 2 紫外线诱变

Figure 2 The mutation effect of UV irradiation

突变株 Y-UA-18 产酶活力最高达 10.57 U,为原菌株 CR-14 产酶活力的 1.67 倍。

2.2.2 突变株 Y-UA-18 的遗传稳定性

为测定突变株 Y-UA-18 的遗传稳定性,对其进行连续传种 8 代,然后 8 代同时发酵培养,测定发酵液酶活,通过对 8 代发酵液酶活进行方差分析,其差异均不显著($P>0.05$),如表 3 所示,说明菌株的遗传性能稳定,可以作为后续试验菌株。

2.3 培养基组成优化

从表 4 中可以看出,各因素对菌株发酵影响的主要顺序为 $B>A>C>D$,即 $MgSO_4$ 对菌株 Y-UA-18 发酵产酶影响最为显著,这可能由于 Mg^{2+} 一方面是酶的激活剂,另一方面可以维持蛋白质结构的完整性,因此对菌株的代谢具有促进作用。培养基成分最优配比为 $B_1A_2C_2D_3$,即复合氮源 0.6%、 $MgSO_4$ 0.1%、NaCl 0.08%、 KH_2PO_4 0.1%、秸秆粉 1.0%。

2.4 发酵条件优化

2.4.1 温度和时间对产酶的影响

温度对菌株的生长代谢具有很大的影响,所以本试验对菌株在不同温度下进行发酵,并测定酶活,结果如图 3、图 4 所示。从图 3 中可知,菌株 Y-UA-18 在 30℃ 下发酵液酶活最高为 170.29 U,37、25、20℃ 条件下发酵液酶活与之相比显著降低($P<0.05$),分别降低了 17.65%、29.66%、46.77%。由图 4 可知,不同温度条件下,前 3 d 时,菌株发酵液酶活随着发酵时间的延长而增强,第 3 d 时各温度条件下酶活均达到最高,而且发酵温度为 30℃ 的酶活始终高于其他温度,最高达 170.16 U。第 4 d 时,酶活开始降低,这可能由于菌株发生老化,从而产酶能力下降。

2.4.2 初始 pH 值对产酶的影响

将培养基初始 pH 值调至为 5.5~7.5,考察不同起

始 pH 值对菌株发酵产酶的影响。从图 5 中可以看出,初始 pH 值在 6.0~7.5 范围内,菌株的酶活差异不显著($P>0.05$)。初始 pH 值为 7.0 时发酵液的酶活力最高为 172.45 U。初始 pH 值为 5.5 时,发酵液酶活为 148.52 U,显著低于 pH 7.0($P<0.05$)。这可能由于在酸性条件下,菌株一些代谢的酶受到影响,导致菌株无法进行正常的新陈代谢,从而使发酵液中的酶活降低。

2.4.3 通气量对产酶的影响

通气量对菌株代谢产酶的影响如图 6 所示,将菌株分别接种于不同瓶装量的培养基中,结果表明瓶装量为 50、100、150 mL 的发酵液酶活没有显著差异($P>0.05$),其中 150 mL 发酵液酶活略高为 174.30 U。

表 4 正交实验结果及极差分析

Table 4 The result of orthogonal experiment and the analysis of extreme difference

组别	复合氮源	$MgSO_4$	KH_2PO_4	NaCl	酶活/U
	A	B	C	D	
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	136.07±0.41
2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	126.17±1.31
3.00	1.00	3.00	3.00	3.00	120.77±0.22
4.00	2.00	1.00	2.00	3.00	157.39±1.41
5.00	2.00	2.00	3.00	1.00	139.54±2.81
6.00	2.00	3.00	1.00	2.00	134.03±0.59
7.00	3.00	1.00	3.00	2.00	139.94±1.31
8.00	3.00	2.00	1.00	3.00	127.09±0.19
9.00	3.00	3.00	2.00	1.00	125.97±1.31
T1j	383.01	433.40	397.19	401.57	
T2j	430.95	392.80	409.53	400.15	
T3j	393.01	380.77	400.25	405.25	
M1j	127.67	144.47	132.40	133.86	
M2j	143.65	130.93	136.51	133.38	
M3j	131.00	126.92	133.42	135.08	
Rj	12.65	17.54	4.11	1.70	

表 2 各突变株的透明圈与菌落直径之比及酶活

Table 2 The ratio of transparent circle to the diameter of colonies and enzyme activity of each mutant

项目	原种	亚硝酸诱变		紫外诱变		复合诱变	
		Y-17	Y-21	UV-10	UV-42	Y-UA-7	Y-UA-18
D/d	12.38	17.92	20.71	18.45	20.38	20.41	20.82
酶活/U	6.31±0.02	8.05±0.42	9.93±0.01	8.03±0.22	10.21±0.38	10.33±0.09	10.57±0.32

注:D 为透明圈直径,d 为菌落直径。

表 3 Y-UA-18 菌株 8 代的产酶活力

Table 3 The activity of strain Y-UA-18 producing-enzyme of each generation system

项目	G_1	G_2	G_3	G_4	G_5	G_6	G_7	G_8
酶活/U	10.31±0.05a	10.03±0.31a	10.96±0.83a	11.02±0.49a	10.14±0.07a	10.94±0.01a	10.01±0.39a	10.62±0.28a

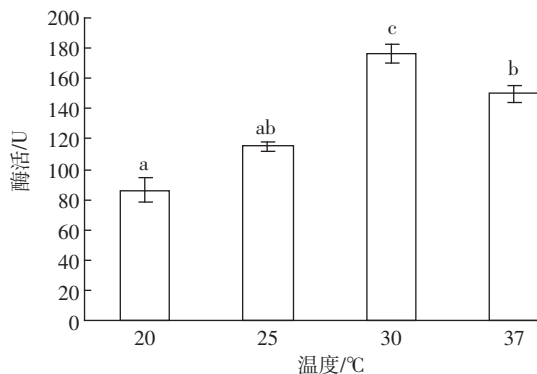


图 3 各温度对产酶的影响

Figure 3 Effect of different temperature on producing-cellulase

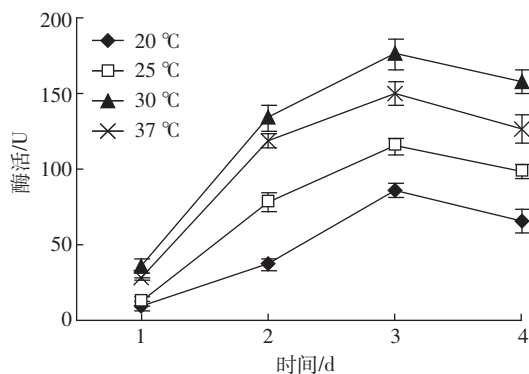


图 4 各温度条件下发酵时间对产酶的影响

Figure 4 Effect of fermentation time on producing-cellulase at different temperature

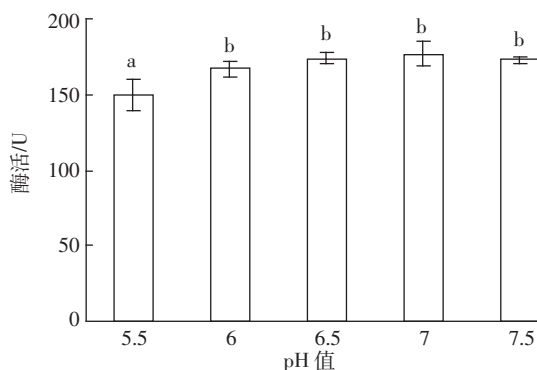


图 5 初始 pH 值对产酶的影响

Figure 5 Effect of initial pH value on producing-cellulase

但在厌氧瓶中发酵液酶活仅为 118.49 U, 显著低于其他 3 组 ($P < 0.05$)。这可能由于菌株 CR-14 在厌氧条件下发酵, 代谢产酸后, 菌株的生长受到抑制进而产酶较低。

2.4.4 Tween80 对产酶的影响

表面活性剂一方面可以改变菌株细胞膜的通透性, 有利于代谢产物排出; 一方面可以使疏水界面压

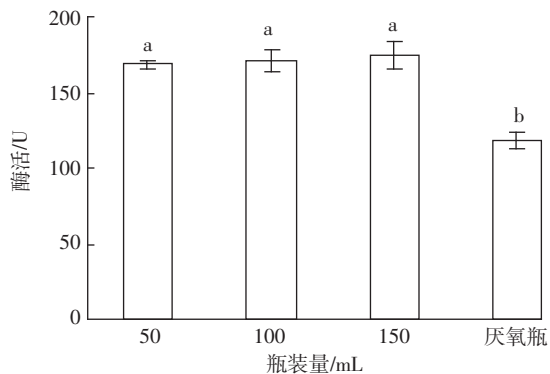


图 6 通气量对产酶的影响

Figure 6 Effect of different ventilation on producing-cellulase

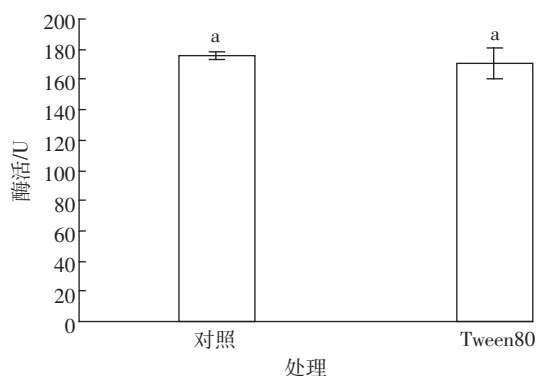


图 7 吐温 80 对产酶的影响

Figure 7 Effect of Tween 80 on producing-cellulase

力降低, 提高氧在气液界面的传输速度。由图 7 可知, 在培养基中添加 0.1% 的 Tween80 发酵液酶活为 170.38 U, 与对照相比没有显著提高 ($P > 0.05$), 反而比对照的酶活略低。这可能由于添加 Tween80 浓度较小, 菌株的细胞膜的通透性没有受到影响, 代谢产物没能及时排出胞外, 这需要进行进一步的试验验证。

3 结论

通过对 CR-14 菌株进行亚硝酸诱变和紫外诱变, 筛选出一株产纤维素酶活较高, 且能够稳定遗传的菌株 Y-UA-18, 其纤维素酶活为 10.57 U, 为原菌株的 1.67 倍。通过单因素试验和正交试验确定了菌株 Y-UA-18 产酶最佳培养基成分配比秸秆粉 1.0%、复合氮源 0.6%、 KH_2PO_4 0.1%、 MgSO_4 0.1%、 NaCl 0.08% 和最佳发酵条件初始 pH 值 7.0, 培养温度 30 °C, 发酵时间 3 d, 为该菌种的工业化生产奠定基础。

参考文献:

- [1] 李飞跃, 汪建飞. 中国粮食作物秸秆焚烧碳排放量及转化生物炭固碳量的估算[J]. 农业工程学报, 2013, 29(14): 1-7.

- LI Fei-yue, WANG Jian-fei. Estimation of carbon emission from burning and carbon sequestration from biochar producing using crop straw in China[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2013, 29(14):1-7. (in Chinese)
- [2] 焦翔翔, 靳红燕, 王明明. 我国秸秆沼气预处理技术的研究及应用进展[J]. 中国沼气, 2011, 29(1):29-33.
- JIAO Xiang-xiang, JI Hong-yan, WANG Ming-ming. The research and application advances of straw gas pretreatment technology[J]. *Chinese Biogas*, 2011, 29(1):29-33. (in Chinese)
- [3] Ma L, Zhang J, Zou G, et al. Improvement of cellulase activity in *trichoderma reesei* by heterologous expression of a Beta-glucosidase gene from *penicillium decumbens*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 49:366-371. (in Chinese)
- [4] 刘振华. 产纤维素酶微生物对低温沼气发酵的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- LIU Zhen-hua. The affect of microorganisms producing cellulase for methane fermentation in low temperature[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [5] 崔海洋, 程仕伟, 黄田红, 等. 产纤维素酶的解淀粉芽孢杆菌分离鉴定及酶学性质研究[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(3):43-47.
- CUI Hai-yang, CHENG Shi-wei, HUANG Tian-hong, et al. The separation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* producing cellulase and the research of characterization[J]. *Food Technology of Science*, 2014, 32(3):43-47. (in Chinese)
- [6] 张丽萍, 李亚冰, 程辉彩, 等. 一株兼性厌氧纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及其酶学性质研究[J]. 华北农学报, 2010, 25(6):139-143.
- ZHANG Li-ping, LI Ya-bing, CHENG Hui-cai, et al. The separation and identification of facultative anaerobic bacteria producing cellulase and the research of characterization[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(6):139-143. (in Chinese)
- [7] 唐雪鹭, 崔春, 雷芬芬, 等. 紫外结合亚硝酸诱变选育中性蛋白酶高产菌株[J]. 食品工业科技, 2015, 7(6):163-166.
- TANG Xue-lu, CUI Chun, LEI Fen-fen, et al. The breeding of strain producing neutral protease by UV combined nitrite[J]. *Food Science & Technology*, 2015, 7(6):163-166. (in Chinese)
- [8] 单夕文. 产纤维素酶菌株的诱变选育及其产酶条件的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2014.
- SHAN Xi-wen. The mutation breeding of strain producing cellulase and the research of conditions for enzyme production[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2014. (in Chinese)
- [9] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业行业标准(GB20287—2006)农业微生物菌剂(第一版)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 14-15.
- Ministry of Agriculture People's Republic of China. People's Republic of China agricultural industry standards(GB 20287—2006)agricultural microbial agents[M]. Beijing: China Standard Press, 2006: 14-15. (in Chinese)
- [10] 孙旭东, 黄晓梅, 陈秀玲, 等. 产纤维素酶菌株的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(6):1281-1287.
- SUN Xu-dong, HUANG Xiao-mei, CHEN Xiu-ling, et al. The separation and identification of strains producing cellulase and optimization of fermentation conditions[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2014, 33(6):1281-1287. (in Chinese)
- [11] 郑哲, 贾翠英, 张玉辉. 一株产纤维素酶细菌紫外诱变研究[J]. 生物学杂志, 2011, 28(3):66-69.
- ZHENG Zhe, JIA Cui-ying, ZHANG Yu-hui. The studies of ultraviolet mutagenesis for a strain of bacteria producing cellulase[J]. *Journal of Biology*, 2011, 28(3):66-69. (in Chinese)