

覃益民,张静茹,叶 锦,等. 康氏木霉内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):40-43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.012

康氏木霉内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质

覃益民,张静茹,叶 锦,甘冠萍,覃振央

(广西大学化学化工学院,广西南宁 530004)

摘要:康氏木霉 GIMP3.444 经摇瓶发酵,获得分泌到胞外的纤维素酶,粗酶液经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀、Sephacryl S200 凝胶过滤层析、DEAE Sepharose FF 离子交换层析及 Octyl Sepharose CL-4B 疏水层析分离纯化出一种内切型的 β -葡聚糖苷酶,SDS-PAGE 电泳鉴定为单一条带,BIO-RAD 分析相对分子量为 61.8 ku。该内切 β -葡聚糖苷酶的最适反应温度为 55 $^{\circ}\text{C}$,最适反应 pH 值为 4.4,作用于羧甲基纤维素钠时,Lineweaver-Burk 法求得 K_m 、 V_{\max} 分别为 4.81 mg/mL、2.48 mg/(min·mL)。

关键词:康氏木霉;内切 β -葡聚糖苷酶;分离纯化;酶学性质

中图分类号: Q556 $^{+}.2$ **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0040-04

植物纤维由纤维素、半纤维素和木质素三大部分组成并共同构成了植物细胞壁的主要成分,是最丰富的天然可再生生物资源,纤维素通过纤维素酶水解转化为可发酵性糖,继而转化为燃料乙醇及相关化学品的研究越来越引起人们的关注^[1]。纤维素酶是一类能够将纤维素降解为葡萄糖的多组分酶系的总称,由内切 β -葡聚糖苷酶(EG)、外切 β -葡聚糖苷酶(CBH)和 β -葡萄糖苷酶 3 类酶组成。尽管大量研究已表明,只有在这 3 种主要成分酶的协同作用下,纤维素分子最终才能被降解成葡萄糖。但是各成分酶是如何协同起作

用的,学者们的看法还不尽相同^[2],近来人们还发现了一些不具有纤维素酶活性的蛋白也能与纤维素酶起协同作用,并最终促进纤维素的降解^[3-5]。因此,无论是对纤维素酶系各成分酶的协同作用机理,还是对纤维素酶系与其他非酶蛋白的协同增效作用的更深入了解,都将会为提高纤维素酶的催化效率提供重要理论基础。康氏木霉 GIMP 3.444 是一株产纤维素酶系的真菌菌株^[6],笔者从该菌株中分离纯化出一种纤维素酶协同增效蛋白。为进一步研究该增效蛋白对纤维素酶各成分酶的协同作用机理,需获得该菌株产的纤维素酶系各组分纯酶。因此,本研究对康氏木霉 GIMP3.444 分泌的内切 β -葡聚糖苷酶进行分离纯化,并研究其酶学性质。

1 材料与方法

1.1 菌株

康氏木霉(*Trichoderma koningii*) GIMP 3.444 购于广东省微生物菌种保藏中心,现保存于广西大学化学化工学院生物

收稿日期:2014-03-27

项目基金:国家自然科学基金(编号:21276053);广西壮族自治区生物炼制重点实验室培育基地开放课题(编号:GXBF11-04)。

作者简介:覃益民(1962—),男,广西贵港人,博士,副教授,主要从事生物加工与分离方面的研究。Tel:(0771)3233718;E-mail:qym6289@sina.com。

- [10] Kanost M R, Prasad S V, Huang Y, et al. Regulation of serpin gene-1 in *Manduca sexta* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 25(2): 285-291.
- [11] An Chunju, Budd A, Kanost M R, et al. Characterization of a regulatory unit that controls melanization and affects longevity of mosquitoes [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(11): 1929-1939.
- [12] Scherfer C, Tang H P, Kambris Z, et al. Drosophila serpin-28D regulates hemolymph phenoloxidase activity and adult pigmentation [J]. Developmental Biology, 2008, 323(2): 189-196.
- [13] Nappi A J, Christensen B M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(5): 443-459.
- [14] Green C, Levashina E, Mckimmie C, et al. The necrotic gene in *Drosophila* corresponds to one of a cluster of three serpin transcripts mapping at 43A1.2 [J]. Genetics, 2000, 156(3): 1117-1127.
- [15] Levashina E A, Langley E, Green C, et al. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*

[J]. Science, 1999, 285(5435): 1917-1919.

- [16] Danielli A, Kafatos F C, Loukeris T G. Cloning and characterization of four *Anopheles gambiae* serpin isoforms, differentially induced in the midgut by *Plasmodium berghei* invasion [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(6): 4184-4193.
- [17] 刘衬丽,王 东,李 兵,等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *serpin-6* 的克隆、序列分析和组织表达 [J]. 昆虫学报, 2009, 52(1): 1-9.
- [18] 董照明,赵 萍,王凌燕,等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 *serpin16* 的表达规律及体外重组表达 [J]. 蚕业科学, 2010, 36(2): 236-242.
- [19] 查宏贤. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 *Serpin4* 的基因克隆、表达及多克隆抗体制备 [D]. 苏州:苏州大学, 2011.
- [20] 王彦云,何浙鸣,李国胜,等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 *Bmscrpin-6* 的特异性表达分析 [J]. 蚕业科学, 2013, 39(2): 257-260.
- [21] 李国胜,王彦云,王明慧,等. 家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 5 的多克隆抗体制备及组织表达分析 [J]. 蚕业科学, 2013, 39(2): 261-265.

化工实验室。

1.2 培养基和试剂

(1) 斜面活化培养基: 200.0 g 马铃薯、20.0 g 葡萄糖、3.0 g KH_2PO_4 、1.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、20.0 g 琼脂粉, 加自来水至 1 000 mL, 调 pH 值至 6.0, 121 °C 灭菌 20 min。(2) 摇瓶种子培养基: 200.0 g 马铃薯、20.0 g 葡萄糖、3.0 g KH_2PO_4 、1.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 加自来水至 1 000 mL, 调 pH 值至 6.0, 121 °C 灭菌 20 min。(3) 液体发酵培养基: 15.0 g 甘蔗渣(过 80 目筛)、8.0 g 麦麸粉、4.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、3.0 g KH_2PO_4 、1.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 加自来水至 1 000 mL, 调 pH 值至 6.0, 121 °C 灭菌 20 min。(4) DNS 试剂: 称取 6.3 g 3,5-二硝基水杨酸、20.96 g NaOH、182.0 g 酒石酸钾钠、5.0 g 苯酚、5.0 g 亚硫酸钠, 分别用去离子水溶解后混合, 待混合液冷却至室温定容至 1 000 mL。保存在棕色瓶中, 在室温下放置 7 d 即可使用。(5) 考马斯亮蓝 G-250 溶液: 称取考马斯亮蓝 G-250 100 mg, 溶于 50 mL 95% 乙醇中, 再加入 100 mL 85% 磷酸, 混合均匀后用去离子水定容至 1 000 mL。

1.3 菌种的培养

取保存的康氏木霉接种于斜面活化培养基, 28 °C 条件下活化培养 3~7 d, 刮取平面孢子, 用无菌水制成孢子悬浮液, 按 1% 体积比(V/V)接种至种子培养液中, 于 180 r/min、28 °C 下培养 30~36 h。将摇瓶种子按 5% 体积比(V/V)接种量接种至装有 150 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 于 180 r/min、28 °C 下培养 120 h。

1.4 内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化

1.4.1 发酵液的预处理 取“1.3”节培养好的发酵液, 用 4 层纱布过滤, 在 4 °C、6 000 r/min 条件下离心 20 min, 收集上清液, 用截留分子量为 10 000 Da 的 VIVA FLOW 200 平板超滤膜浓缩 20 倍左右, 得到粗酶液。粗酶液先用 20% 饱和度的硫酸铵沉淀, 4 °C 下静置过夜; 6 000 r/min 离心 20 min, 取上清液继续加入硫酸铵至饱和度为 80%, 4 °C 下静置过夜; 离心得沉淀, 用 0.05 mol/L pH 值 7.0 的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液复溶, 再次离心后, 去除不溶物, 复溶酶液 4 °C 冰箱保存。

1.4.2 Sephacryl S-200 凝胶过滤层析 取 2.0 mL 的盐析复溶液, 上样于 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤柱(10 mm × 700 mm)中, 用 0.05 mol/L pH 值 7.0 的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液(含 NaCl 0.2 mol/L)洗脱, 用自动收集器按 2.0 mL/(管 · 10 min) 收集组分, 测定每管内切 β -葡聚糖酶活力, 收集有内切 β -葡聚糖酶活性洗脱峰, 4 °C 保存备用。

1.4.3 DEAE Sepharose FF 离子交换层析 取“1.4.2”节收集的蛋白样, 用 VIVA FLOW 50 平板超滤膜浓缩, 并用 0.05 mol/L pH 值 7.0 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液置换, 上样至 DEAE Sepharose FF 阴离子交换柱(16 mm × 200 mm)中, 0~0.8 mol/L NaCl 浓度梯度洗脱, 自动收集器 5 mL/(管 · 5 min) 收集组分, 测定各峰的内切 β -葡聚糖酶活力, 收集内切 β -葡聚糖酶活性峰, 4 °C 条件保存备用。

1.4.4 Octyl Separose CL-4B 疏水层析 取“1.4.3”节中收集的内切 β -葡聚糖酶活性峰, 超滤浓缩并用含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 mol/L 的 0.05 mol/L pH 值 7.0 磷酸二氢钠-磷酸氢二

钠缓冲液置换, 上样至 Octyl Separose CL-4B 疏水层析柱(10 mm × 400 mm)中, 2.0~0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度梯度洗脱, 自动收集器 3 mL/(管 · 10 min) 收集组分, 测定各峰的内切 β -葡聚糖酶活力, 收集内切 β -葡聚糖酶活性峰, 4 °C 条件保存备用。

1.5 测定方法

1.5.1 蛋白浓度的测定 以牛血清白蛋白为标准, 用考马斯亮蓝 G-250 法^[7]测蛋白液浓度。

1.5.2 内切 β -葡聚糖苷酶活力(EG)测定 采用 DNS 法^[8]测定内切酶活性。向试管中加入 1.5 mL 10 g/L 的羧甲基纤维素钠柠檬酸-柠檬酸钠溶液(0.1 mol/L, pH 值 4.8)及 0.5 mL 酶液, 50 °C 水浴中保温 30 min, 取出后加入 3.0 mL DNS 试剂终止反应, 沸水浴 5 min, 取出流水冷却, 定容至 25 mL, 在 540 nm 波长处测定吸光度。以每分钟催化底物生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个活力单位, 单位用 IU/mL 表示。

1.5.3 蛋白质纯度鉴定及相对分子量测定 采用 SDS-PAGE 法^[9]。聚丙烯酰胺凝胶质量分数为 12%, 蛋白标准品的分子质量范围 $1.44 \times 10^4 \sim 9.74 \times 10^4$ ku。

1.5.4 最适反应温度测定 将纯酶稀释后, 在 pH 值 4.8 条件下, 于不同温度(25 °C~80 °C)水浴中与底物保温 30 min, 测定内切 β -葡聚糖苷酶活力, 以最大酶活力为 100%, 确定酶的最适反应温度。

1.5.5 最适反应 pH 值测定 分别用不同 pH 值(2.6~8.0)的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配置 1% 的羧甲基纤维素钠悬浮液, 作为不同 pH 值条件下的酶作用底物, 加入用相应 pH 值缓冲液稀释的纯酶, 在 50 °C 水浴中保温 30 min, 测定不同 pH 值下的内切 β -葡聚糖苷酶活力, 以最大酶活力为 100%, 确定酶的最适反应温度。

1.5.6 底物动力学参数测定 分别配置浓度为 0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35% 的羧甲基纤维素钠悬浮液(pH 值 4.8), 加入适当稀释纯酶液, 在 50 °C 水浴中保温 30 min, DNS 法测定各不同浓度底物时产生的还原糖, 然后按照 Lineweaver-Burk 双倒数作图法^[10]作图, 计算出该酶作用于羧甲基纤维素钠时的 K_m 值和 V_{\max} 值。

2 结果与分析

2.1 内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化及分析

康氏木霉发酵液经 20~80% 硫酸铵分级沉淀, 上样至 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤层析柱, 洗脱流速为 0.2 mL/min, 洗脱结果如图 1 所示, 共有 3 个蛋白峰。酶活测定发现第 3 个蛋白峰没有纤维素酶活性, 为杂蛋白, 而峰 I、峰 II 均具有较高的内切 β -葡聚糖苷酶活性, 说明康氏木霉的发酵液中至少含有 2 种内切酶。本研究仅介绍对第 1 个蛋白峰的分离纯化。

收集图 1 中的峰 I 蛋白, 超滤法浓缩并进行缓冲液置换后, 上样至用 0.05 mol/L pH 值 7.0 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液平衡的 DEAE Sepharose FF 离子交换层析柱, 分别用 3 倍柱体积的含 NaCl 0.1、0.2、0.3、0.8 mol/L 的缓冲液进行洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 结果如图 2 所示, 共有 5 个蛋白吸收峰, 经测定内切酶活主要集中在峰 3 中。

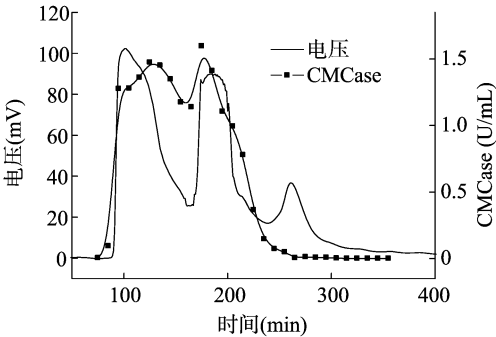


图1 内切β-葡聚糖酶Sephacryl S-200 HR凝胶过滤层析

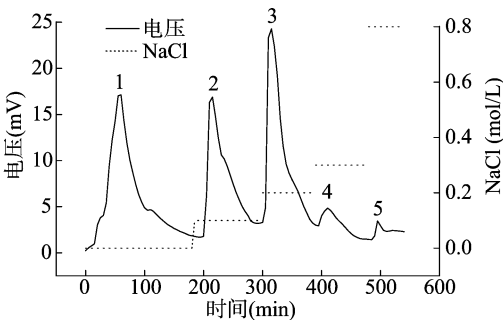


图2 内切β-葡聚糖酶DEAE Sepharose FF阴离子交换层析图谱

合并图2峰3蛋白,超滤浓缩用含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 mol/L的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液置换,上样至平衡的Octyl Separose CL-4B疏水层析柱,分别用3倍柱体积的含1.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 缓冲液和无 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的缓冲液洗脱,流速为0.3 mL/min,如图3所示,得到3个蛋白峰,经酶活测定,发现只有第3个峰具有内切酶活性(图中记为EG)。

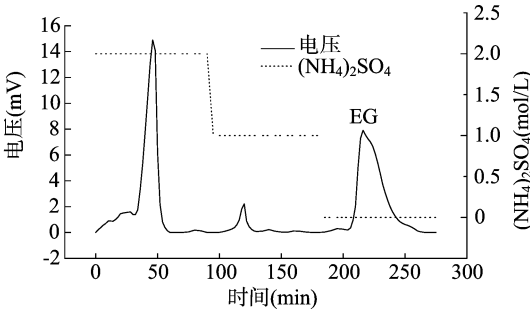
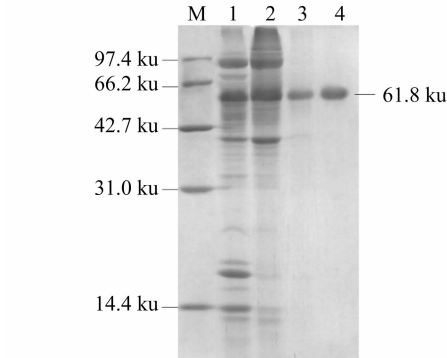


图3 内切β-葡聚糖酶Octyl Separose CL-4B疏水层析图谱

取经硫酸铵分级沉淀、Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤层析、DEAE Sepharose FF 离子交换层析、Octyl Separose CL-4B 疏水层析纯化的内切β-葡聚糖酶进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,结果见图4。图4表明,通过以上4步纯化过程,内切β-葡聚糖酶的纯度逐步提高,且经疏水层析后的酶组分在 SDS-PAGE 电泳胶上显示为单一条带,表明该组分已达电泳纯,凝胶成像系统分析内切β-葡聚糖酶的相对分子量约为61.8 ku,比文献[11-14]报道的康氏木霉内切葡聚糖酶大,也偏大于里氏木霉^[15-16]内切葡聚糖酶,而与绿色木霉^[17]和拟康氏木霉^[18]中的内切葡聚糖酶相近。

内切β-葡聚糖酶的分离纯化过程如表1。表1表明硫酸铵分级沉淀去除了部分的非酶杂蛋白,纯度提高了1.32倍。而 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤层析对内切β-葡聚糖



M—蛋白marker; Lane1—Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤层析峰1蛋白; 2—DEAE Sepharose FF 阴离子交换层析峰3蛋白; 3—Octyl Separose CL-4B疏水层析峰EG蛋白

图4 内切β-葡聚糖酶 SDS-PAGE 电泳图谱

酶的提纯效果不太理想,在盐析的基础上内切酶只被纯化了1.34倍,这是因为在盐析样中有多种内切酶共存,此时测得的内切酶活力会高于凝胶过滤层析后得到的内切β-葡聚糖酶活力。DEAE Sepharose FF 离子交换层析也能去除较多的杂蛋白和多糖物质,内切β-葡聚糖酶的比活力达到9.83 IU/mL,纯化了2.98倍。经过 Octyl Separose CL-4B 疏水层析,内切葡聚糖酶最终达到电泳纯,此时比活力为24.91 IU/mg,与粗酶液相比,提高了7.55倍,回收率为3.72%。

表1 康氏木霉内切β-葡聚糖酶的分离纯化

| 纯化过程 | 总蛋白 (mg) | 总活力 (IU) | 比活力 (IU/mg) | 回收率 (%) | 纯化 倍数 |
|--------------------------------------|-------------|-------------|----------------|------------|----------|
| 粗酶液 | 496.72 | 1 639.18 | 3.30 | 100.00 | 1.00 |
| 20%~80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 332.80 | 1 451.01 | 4.36 | 88.52 | 1.32 |
| Sephacryl S-200 HR | 162.93 | 953.14 | 5.85 | 58.15 | 1.77 |
| DEAE Sepharose FF | 24.82 | 243.98 | 9.83 | 14.88 | 2.98 |
| Octyl Separose CL-4B | 2.45 | 61.03 | 24.91 | 3.72 | 7.55 |

2.2 内切β-葡聚糖酶的酶学性质

2.2.1 内切酶的最适反应温度 为了测定反应温度对内切β-葡聚糖酶活性的影响,确定酶的最适反应温度,在同一pH值条件下,分别测定不同反应温度时的酶活力,以最大酶活力为100%,计算相对酶活力,结果如图5。图5表明,在25~55℃范围内,内切酶活力随着温度升高而增加,在55℃时酶活力最大,说明内切酶的最适反应温度为55℃;温度继续升高,内切酶活力逐渐降低,80℃时,酶活力仅有最高活力的16.3%。在55~75℃范围内,酶活力随温度升高而降低的斜率的绝对值大于低温范围内酶活力随着温度升高而增加的斜率,说明该内切酶对高温更敏感。

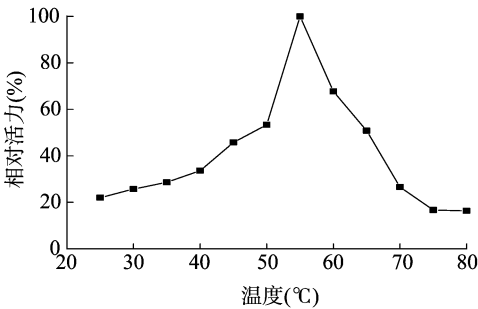


图5 反应温度对内切β-葡聚糖酶活力的影响

2.2.2 内切酶的最适反应 pH 值 用不同 pH 值的缓冲液配置酶反应底物,测定 pH 值对内切 β -葡聚糖苷酶活性的影响,以确定酶的最适反应 pH 值,分别将该酶与上述底物在 50 °C 条件下反应,测定内切 β -葡聚糖苷酶活力,以最大酶活力为 100%,计算相对酶活力,结果如图 6。可见,当 pH 值小于 4.4 时,内切酶活力随着 pH 值的增大而增加,至 pH 值 4.4 时酶活力达最大值,故该内切酶的最适 pH 值为 4.4;pH 值 4.4~8.0 范围内,内切酶活力随着 pH 值的继续增大而降低,但在 pH 值为 6.2 时,酶活力仍有最大值的 75.8%,这可能是因为该内切酶在 pH 值 4.4~6.2 之间活性较稳定。

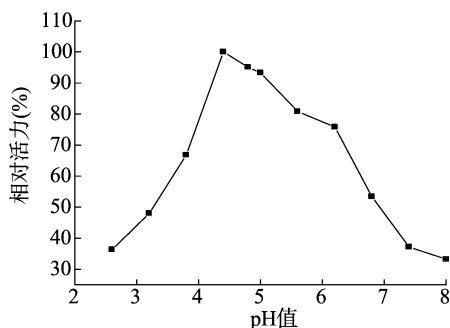


图6 pH值对内切 β -葡聚糖苷酶活力的影响

2.2.3 内切酶的底物动力学性质 将稀释的纯酶液分别与不同浓度底物反应,测定生成的还原糖量,然后按照 Lineweaver-Burk 双倒数作图法作图,结果如图 7。回归得出标准方程为 $1/v = 1.9421(1/[S]) + 0.4039$,求得以羧甲基纤维素钠为底物时,内切 β -葡聚糖苷酶的 K_m 值为 4.81 mg/mL, V_{max} 值为 2.48 mg/(min · mL)。

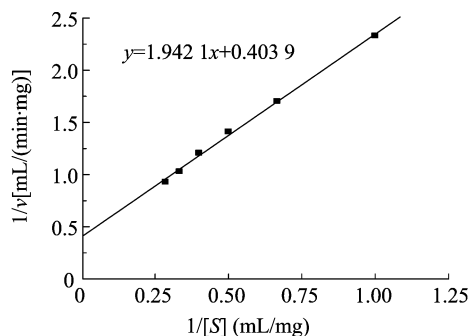


图7 内切 β -葡聚糖苷酶的Lineweaver-Burk 方程

3 结论

本研究从康氏木霉液态摇瓶发酵液中分离纯化得到一种电泳纯的内切 β -葡聚糖苷酶,比活力为 24.91 IU/mg,相对分子量为 61.8 ku。酶学性质测定结果显示,纯化的内切 β -葡聚糖苷酶无外切 β -葡聚糖苷酶及 β -葡萄糖苷酶活性,作用于羧甲基纤维素钠时, K_m 为 4.81 mg/mL, V_{max} 为 2.48 mg/(min · mL),最适反应温度为 55 °C,最适反应 pH 值为 4.4,可用来分析纤维素酶系蛋白之间的协同水解作用。

本研究结果还表明,康氏木霉分泌的内切 β -葡聚糖苷酶不止一种,因此,在研究纤维素酶系各成分酶的协同作用机理或研究纤维素酶系与其他非酶蛋白的协同增效作用时,须考虑同功酶存在的影响。

参考文献:

- [1] Menon V, Rao M L. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept[J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2012, 38(4): 522-550.
- [2] Van Dyk J S, Pletschke B I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - factors affecting enzymes, conversion and synergy[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1458-1480.
- [3] 卢迪, 陈洪章, 马润宇. 秸秆质体蛋白对纤维素酶活力的影响[J]. 生物工程学报, 2006, 22(2): 257-262.
- [4] Kim E S, Lee H J, Bang W G, et al. Functional characterization of a bacterial expansin from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102(5): 1342-1353.
- [5] Han Ye Jun, Chen Hong Zhang. Synergism between hydrophobic proteins of corn stover and cellulase in lignocellulose hydrolysis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 48(2): 218-224.
- [6] 覃益民, 高进, 刘幽燕, 等. 一种来源于康氏木霉的纤维素酶增效蛋白的分离纯化[J]. 化工学报, 2011, 62(10): 2893-2897.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [8] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Biochemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-100.
- [10] Shyamala S, Ravikumar S, Vikramathithan J, et al. Isolation, purification, and characterization of two thermostable endo-1,4- β -D-glucanase forms from *Opuntia vulgaris*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165(7/8): 1597-1610.
- [11] Wood T M, McCrae S I. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase[J]. Biochemical Journal, 1978, 171(1): 61-72.
- [12] Fujii M, Mori J I, Homma T, et al. Synergy between an endoglucanase and cellobiohydrolases from *Trichoderma koningii*[J]. The Chemical Engineering Journal, 1995, 59(3): 315-319.
- [13] 那安, 马建华, 崔福绵, 等. 康氏木霉纤维素酶系中 C_x 酶多分子型的分离纯化及某些性质[J]. 真菌学报, 1983, 2(1): 50-58, 66.
- [14] 黄艳, 凌敏, 覃拥灵, 等. 康氏木霉内切葡聚糖酶(EG I)基因的克隆及表达[J]. 生物技术, 2008, 18(2): 10-13.
- [15] Samanta S, Basu A, Halder U C, et al. Characterization of trichoderma reesei endoglucanase II expressed heterologously in pichia pastoris for better biofinishing and biostoning[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(3): 518-525.
- [16] 朱年青, 夏文静, 勇强. 里氏木霉纤维素酶的分离纯化及酶学性质[J]. 生物加工过程, 2010, 8(3): 40-43.
- [17] 杨树林, 孟广荣, 李校堃, 等. 绿色木霉 MJ1 产内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2006, 33(5): 75-79.
- [18] 阎伯旭, 高培基. 内切葡聚糖苷水解酶的分离纯化和内源荧光性质[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(5): 89-94.