

利用曲霉 *sp.*HS-6 发酵玉米秸秆进行固体纤维素酶的制备

薛银婷, 何兴兵*, 林永慧, 黄 诗, 罗永路

(吉首大学生物资源与环境科学学院, 吉首 416000)

摘 要: 以玉米秸秆为原料, 分别以氯化铵、硫酸铵、硝酸铵、硝酸钾和尿素为氮源, 设置了氮源的 3 个浓度梯度: 0.5、1 和 2 g·L⁻¹, 对曲霉 *sp.*HS-6 产纤维素酶条件进行探究, 主要确定了最佳发酵时间、最佳氮源种类和最佳氮源浓度, 再利用得到的最佳条件, 进行盐析, 低温冷冻干燥等技术发酵得到酶制剂。结果表明, 通过测定酶活, 确定了该曲霉的最佳发酵时间为 3 d, 筛选得到最佳的氮源种类为硝酸铵, 硝酸铵最佳的氮源浓度为 0.5 g·L⁻¹。基于此最佳条件, 将 60 g 玉米秸秆粉末发酵培养 3 d, 最终从发酵液中提取得到纤维素酶干品酶制剂 8.0 g, 并计算出酶的回收率为 48.0%。此实验对以后纤维素酶的规模化制备提供了一定的工艺参考。

关键词: 玉米秸秆; 曲霉; 纤维素酶; 氮源; 发酵

中图分类号: TQ92

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)03-0373-05

Production of solid cellulose through fermentation of maize straw by *Aspergillus sp.* HS-6

XUE Yinting, HE Xingbing, LIN Yonghui, HUANG Shi, LUO Yonglu

(College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000)

Abstract: In this paper, we explored the production conditions of cellulase through fermentation of maize straw by *Aspergillus sp.*HS-6 with the addition of NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, KNO₃, and CO(NH₂)₂ as nitrogen sources at three concentrations (0.5, 1 and 2 g·L⁻¹). The optimal fermentation time, the optimal nitrogen source and *Aspergillus sp.*HS-6 concentration were determined. Based on the optimum fermentation conditions, salt-ing-out and freeze-drying techniques were used to produce solid enzymes. The results showed that: the optimal fermentation time was 3 days by determining the enzyme activity and the optimal nitrogen source was NH₄NO₃ at 0.5 g·L⁻¹. Under this condition, we obtained the product of solid cellulase with a recovery rate of 48.0%. This experiment would provide some references for a large-scale production of cellulase in the future.

Key words: *Aspergillus*; cellulose; nitrogen source; maize straw; fermentation

纤维素是地球上分布最广、蕴藏量最丰富的物质, 也是最廉价的可再生资源^[1]。据报道, 我国的纤维素类资源极为丰富, 仅秸秆和皮壳每年可达 7×10⁸t。使用纤维素酶可以把天然纤维素物质降解为可利用的糖液, 再进一步转化为酒精、气体燃料(如氢气)等物质, 这对解决我国乃至世界的粮食短缺、能源危机、环境污染等问题具有深远的意义^[2]。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, 它们协同作用, 分解纤维素产生寡糖和

纤维二糖, 最终水解为葡萄糖。纤维素酶系主要包括内切葡聚糖酶(简称 C₁ 或 EG)、纤维二糖水解酶(简称 C_x 或 CBH)和 β-葡萄糖苷酶(简称 BG)³ 种水解酶^[3]。真菌、细菌、放线菌等在一定条件下均能产生纤维素酶。放线菌产酶量很低, 研究很少。目前, 研究较多的产纤维素酶的微生物多是真菌^[2]。一般用于工业化生产的纤维素酶大多来自于真菌, 比较典型的生产菌株有木霉属 (*Trichoderma*)^[4]、曲霉属 (*Aspergillus*)^[5]、青霉属 (*Penicillium*)^[6]和枝顶

收稿日期: 2015-12-12

基金项目: 国家自然科学基金 (31360135, 31560205, 41501335), 湖南省高校重点实验室平台开放基金 (12K107), 2013 年湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目 (237) 和湖南省战略性新兴产业科技攻关项目 (2014GK1062) 共同资助。

作者简介: 薛银婷, 硕士研究生。E-mail: xueyt2015@163.com

* 通信作者: 何兴兵, 博士, 教授。E-mail: hexb2004@163.com; hexb@jzu.edu.cn

孢霉属 (*Acremonium*)^[7]。纤维素酶的生产方法主要有两种包括固体发酵和液体发酵。固体发酵法是以玉米、稻草等植物秸秆^[8]为主要原料,投资少,工艺简单,产品价格低廉;液体发酵生产工艺过程是将玉米秸秆粉碎至20目以下后进行灭菌处理,送发酵釜内发酵,同时加入纤维素酶菌种,发酵时间约为70 h,温度控制低于60℃,采用净化后的无菌空气从釜底通入进行物料的气流搅拌,发酵完的物料经压滤机压滤、超滤浓缩、喷雾干燥、制得纤维素酶产品。生产纤维素酶的原料有麸皮、秸秆粉、废纸、玉米粉和无机盐等^[9],其预处理方法有物理法、化学法、生物法和联合处理法,常用的是粉碎处理、碱处理、酸处理、微波处理、微波/碱联合处理等^[10]。本研究旨在研究曲霉产纤维素酶的发酵条件,通过对曲霉最佳发酵条件的探究,为纤维素酶的低成本生产提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 玉米秸秆 取自湘西自治州保靖县,粉碎后,在70℃下烘干至恒重备用;脱脂棉:将脱脂棉在70℃下烘干至恒重备用;土豆培养基:称取200 g土豆,切碎煮透,用四层纱布过滤,加入20 g葡萄糖,充分混匀,加无菌水定容至1000 mL,分装在250 mL的锥形瓶中,装液量为100 mL·瓶⁻¹;曲霉 sp. HS-6:曲霉属真菌中的一个常见种,生长适温37℃,是一种重要的发酵工业菌种,主要可生产淀粉酶、纤维素酶等,由吉首大学生物资源与环境科学学院环境微生物实验室提供。

1.1.2 试剂及其配置方法 实验所需试剂包括:Tris(三羟甲基氨基甲烷)、3,5-二硝基水杨酸、结晶酚、CMC-Na(羧甲基纤维素钠)、硫酸铵、尿素、硝酸钾、氯化铵、水杨苷、冰醋酸、盐酸、酒石酸钠、亚硫酸钠,结晶乙酸钠等。

DNS(3,5-二硝基水杨酸)试剂:准确称取3,5-二硝基水杨酸6.3 g,加少量蒸馏水溶解,加入2 mol·L⁻¹ NaOH溶液262 mL后,再加入500 mL含有185 g酒石酸钾钠的热水溶液中,后加5 g结晶酚和5 g亚硫酸钠,玻璃棒搅拌溶解,冷却后加蒸馏水定容至1000 mL。贮于棕色试剂瓶中,放置1周后备用。葡萄糖标准液:取适量葡萄糖,70℃下烘干至恒重,准确称取0.1 g葡萄糖溶于100 mL水中。0.2 M醋酸-醋酸钠缓冲液(pH值4.8):冰醋酸5.7288 g和+结晶乙酸钠14.2340 g,加蒸馏水定容至1000 mL。1%(W/V) CMC-Na醋酸缓冲液0.2 mol·L⁻¹

(pH值4.8):1.0 g CMC-Na(羧甲基纤维素钠)+0.2 M的醋酸-醋酸钠,加蒸馏水定容至100 mL。水杨酸苷溶液:0.7653 g水杨酸苷+150 mL醋酸缓冲液,pH值4.8。Tris(三甲氧基胺基甲烷)缓冲液(pH值8.0):50 mL浓度为0.1 mol·L⁻¹ Tris溶液+29.2 mL浓度为0.1 mol·L⁻¹ HCl,加水定容至100 mL。

1.1.3 实验设备 LGC-18A型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司);AUY120电子分析天平(日本SHIMAOZU(岛津)公司);LDZ5-2低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂);T6新世纪紫外分光光度计等(北京普析通用仪器有限责任公司)等。

1.2 方 法

1.2.1 最佳发酵时间测定方法 将菌种接种到液体土豆培养基上,然后在28℃条件下,120 r·min⁻¹离心培养3 d作为菌液;将菌丝球粉碎后加入15 mL菌液和15 mL水混合均匀,再加入到事先加入2 g玉米秸秆粉末的培养皿中培养,本次试验共设置共5组,每组2个培养皿;每3 d取1次样,每次取2个,做好标记,写上日期和天数,共取5次样,分别对5次取样样品测定酶活,以C_x酶最大活性为标准,确定最佳发酵天数。

1.2.2 酶活测定方法 C_x酶活测定:取3支试管,编号后各加入含1% CMC-Na醋酸缓冲液(0.2 M, pH值4.8)1.5 mL,并向1号试管中加入1.5 mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS)以钝化其酶活性作为空白对照。将各试管同时在50℃水浴中加预热5~10 min,然后各加入酶液0.5 mL,保温30 min。取出后向2号和3号试管中加入1.5 mL DNS试剂以终止酶反应,充分摇匀后在沸水浴中煮沸5 min,加蒸馏水定容至10 mL,摇匀,在波长为540 nm处比色并记录结果。

β -葡萄糖苷酶活测定:取3支试管,编号后各加入1.5 mL醋酸缓冲液0.2 mol·L⁻¹ pH值4.8(内含0.5%水杨酸苷(水杨苷)溶液),并向1号试管中加入1.5 mL DNS试剂以钝化其酶活性,作为空白对照。将各试管同时在50℃下保温5~10 min,向各试管加入0.5 mL酶液,保温30 min。取出后立即向2,3号试管中加入1.5 mL DNS试剂终止酶反应。充分摇匀后在沸水浴中煮沸5 min,冷却后加蒸馏水定容至10 mL。在波长540 nm处比色并记录结果。

C₁酶活测定:取3支试管,编号后加入50 mg脱脂棉和醋酸缓冲液(0.2 mol·L⁻¹, pH值4.8)1.5 mL,并向1号试管加入1.5 mL DNS以钝化其酶活性作为空白对照。将各试管同时在45℃水浴中加热

5~10 min, 然后向各试管加入 0.5 mL 酶液, 45℃ 水浴保温 24 h。取出后向 2, 3 号试管中各加入 1.5 mL DNS 以终止酶反应。充分摇匀后在沸水浴中煮沸 5 min, 取出冷却后加蒸馏水定容至 10 mL, 摇匀。在波长 540 nm 处测其吸光值并记录结果。

1.2.3 标准葡萄糖曲线测定方法 1 mg·mL⁻¹ 葡萄糖标准液: 将葡萄糖于 50℃ 干燥至恒重, 准确称取 100 mg, 加蒸馏水溶解并定容至 100 mL。取 8 支洗净、烘干的试管, 贴上标签按表 1 加入标准葡萄糖

溶液和蒸馏水, 配制一系列不同浓度的葡萄糖溶液。用移液器准确移液于每个试管中, 将溶液摇匀后, 先向各试管加入 1.5 mL 3, 5-二硝基水杨酸溶液, 摇匀后, 沸水浴反应 5 min, 取出试管待其冷却后用蒸馏水定容至 10 mL (充分混匀)。在波长 540 nm 处测定各试管中溶液的吸光值 (以 1 号试管溶液调零), 测定其他各管溶液的吸光度并记录结果。以葡萄糖含量为横坐标, 对应的吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线 (见图 1)。

表 1 不同浓度葡萄糖溶液的配制

Table 1 Preparation of different concentrations of glucose solution

| 试剂 Reagent | 管号 The number of tube | | | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 标准葡萄糖溶液/mL Standard glucose solution | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 1.4 |
| 蒸馏水/mL Distilled water | 2.0 | 1.8 | 1.6 | 1.4 | 1.2 | 1.0 | 0.8 | 0.6 |
| 葡萄糖含量/mg Glucose concentration | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 1.4 |

1.2.4 最佳氮源和最佳氮浓度的测定方法 将培养好的菌种粉碎, 制成菌液。在每个培养皿中加入 2 g 玉米秸秆粉末, 同时, 将 15 mL 菌液, 15 mL 含氮的去离子水充分混匀后加入到培养皿中。初步选定的五种氮源是: 硫酸铵, 氯化铵, 尿素, 硝酸铵, 硝酸钾, 每种氮源分别设置三个梯度, 0.5、1 和 2 g·L⁻¹。放置在培养箱中, 28℃ 培养 3 d, 测定 3 种酶活力, 对比分析吸光值可得最佳氮源和最佳氮浓度。

1.2.5 粗酶液的提取方法 准确称取 2 g 发酵物于离心管, 加 8 mL 水摇匀, 5000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集所得的上清液即为粗酶液。

1.2.6 酶活力单位的计算方法 酶活力单位的定义: 每小时催化纤维素水解生成 1 μmol 葡萄糖的酶量为一个酶活力单位 (U), 计算公式如下:

$$\text{酶活力 (U} \cdot \text{mL}^{-1}) =$$

$$\frac{\text{葡萄糖含量 (mg)} \times \text{稀释倍数} \times 5.56}{\text{反应液中酶液加入量 (mL)} \times \text{时间 (h)}}$$

5.56 为 1 mg 葡萄糖的物质的量 (μmol)。

1.2.7 纤维素酶的提取方法 粗酶液的制备: 利用最佳的发酵条件, 培养得到曲霉的发酵液, 用两层纱布过滤后收集滤液, 4℃, 5000 r·min⁻¹, 离心 10 min, 收集上清液。硫酸铵分级沉淀提取酶: 先加入硫酸铵固体至 30% 饱和, 静置 2 h, 5000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液; 将上清液再加入固体硫酸铵, 达到 80% 饱和度, 4℃ 静置过夜, 5000 r·min⁻¹, 离心 10 min, 收集沉淀, 用适量的缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液, pH 为 8.0), 将沉淀的蛋白质溶解。超滤除盐浓缩: 采用超滤离心技术对硫

酸盐析出的蛋白质进行过滤除盐, 5000 r·min⁻¹, 离心 20 min, 加 Tris-HCl 缓冲液稀释后再离心脱盐, 重复 2 次。冷冻干燥, 本实验采用北京四环科学仪器厂有限公司生产的 LGJ-18A 型冷冻干燥机对所提取的酶液进行冷冻干燥。

1.2.8 数据处理方法说明 采用 Excel 2003 对数据进行处理, 包括对葡萄糖标准曲线方程的拟合, 酶活力单位计算等。采用 SPSS 13.0 对数据进行方差分析, 处理间多重比较分析采用 LSD 法, 差异显著性水平设置为 0.05。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

按照上述 1.2.3 的方法, 配制葡萄糖标准溶液, 测定各葡萄糖浓度溶液的吸光值, 并得到模拟方程。标准曲线和模拟方程如图 1 所示。

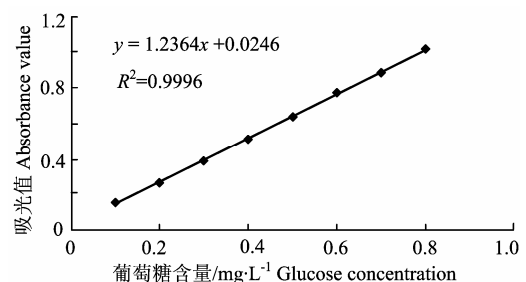


图 1 葡萄糖标准曲线

Figure 1 The standard curve of glucose concentration

2.2 最佳发酵时间的确定

将玉米秸秆用曲霉 sp. HS-6 发酵 3、6、9、12

和 15 d 后, 1 g 稻草秸秆中得到的 Cx 酶、 β -葡萄糖苷酶和 C₁ 酶的酶活力单位分别如图 2 所示。

从图 2-a 中可以看出, 第 3 天, Cx 酶活力最高, 方差分析显示第 3 天测得的酶活力单位数与其他时间测得数据比较存在显著性差异, 因此最佳发酵时间确定为第 3 天; 从图 2-b 中可以看出, β -葡萄糖苷酶活力在第 6 天和第 9 天达到峰值, 因此若以 β -葡萄糖苷酶为选择标准, 则选取第 6 天为最佳发酵时间最为合适; 从图 2-c 中可以看出, C₁ 酶活力较低, 发酵 12 d C₁ 酶的活力最大, 但第 3~12 天的酶活性差异不显著。纤维素酶活力有多种表示方法, 在实际应用中, 人们习惯用 CMC (C_X) 酶活力表征纤维素酶制剂的糖化能力^[11], 由此确定该曲霉最佳发酵时间为 3 d。

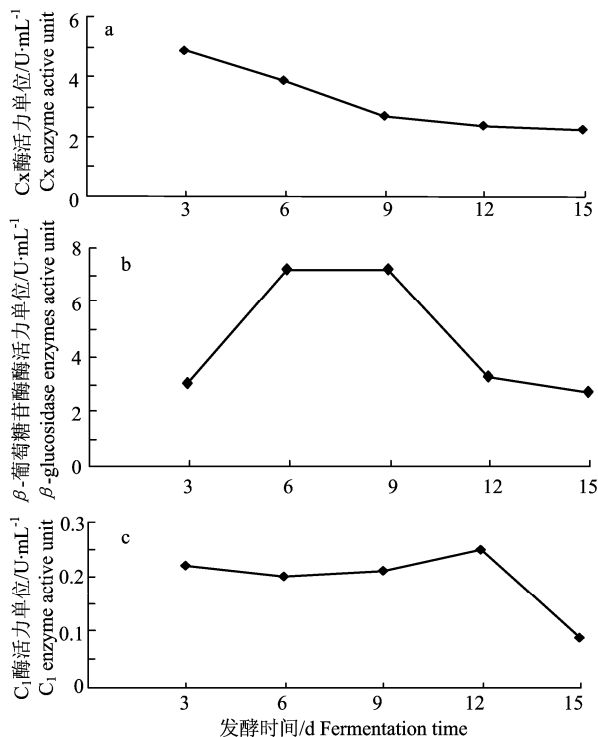


图 2 发酵时间对 Cx、 β -葡萄糖苷酶和 C₁ 酶活力的影响
Figure 2 The influence of fermentation time on Cx, β -glucosidase and C₁ enzyme activity

2.3 最佳氮源和最佳氮源浓度的确定

分别加入五种氮源: 硫酸铵, 氯化铵, 尿素, 硝酸铵, 硝酸钾, 每种氮源分别设置 3 个梯度, 0.5、1 和 2 g·L⁻¹, 测得 3 种酶的酶活, 其结果如图 3。

加入氮源后对 3 种酶活力都起到了一定的促进作用, 通过图 3, 可以看出以 0.5 g·L⁻¹ 的硝酸铵为氮源时, 3 种酶的活力均达到最大值, 方差分析显示, 每一种酶中硝酸铵处理组酶活力与其他四组均存在显著差异, 硝酸铵处理组内 3 个浓度梯度比较时,

浓度为 0.5 g·L⁻¹ 与其他两个浓度之间也均存在显著性差异, 因此, 发酵最佳氮源是硝酸铵, 最佳硝酸铵浓度为 0.5 g·L⁻¹, 因此在实际应用中可以选择 0.5 g·L⁻¹ 硝酸铵作为发酵氮源添加进行纤维素酶生产。

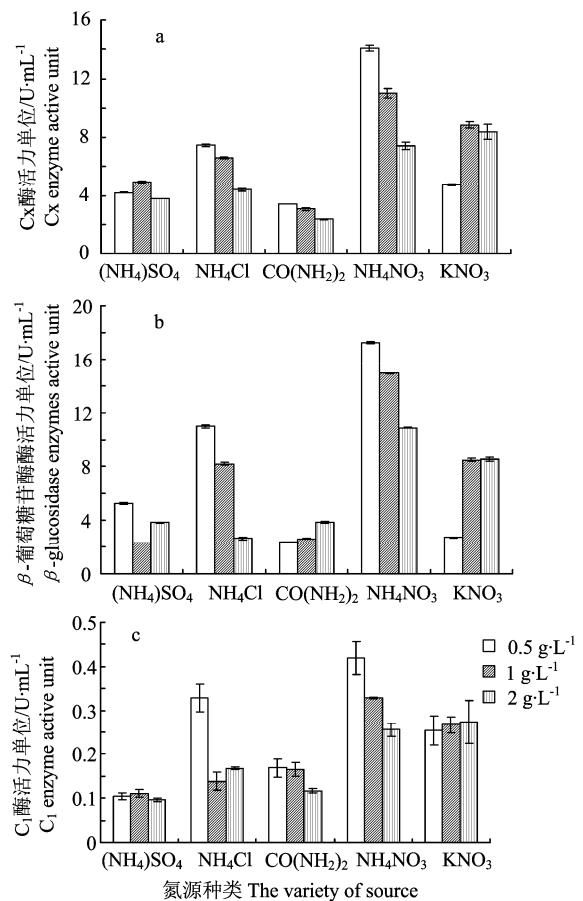


图 3 不同氮源及浓度对 Cx 酶、 β -葡萄糖苷酶和 C₁ 酶活力的影响

Figure 3 The influence of different nitrogen source and concentration on Cx enzyme, β -glucosidase enzymes and C₁ enzyme activity

2.4 酶干品制备及回收率

利用玉米秸秆作为唯一碳源进行发酵, 在 500 mL 锥形瓶中加入玉米秸秆粉末, 用量为 5 g·瓶⁻¹, 菌液 75 mL, 与硝酸铵溶液充分混匀后, 加入锥形瓶中, 硝酸铵浓度为 0.5 g·L⁻¹, 共 12 瓶。置于摇床中培养, 28℃, 120 r·min⁻¹, 发酵 3 天后, 提取粗酶液。采用双层纱布过滤的方法, 将发酵产物过滤, 得到 1770 mL 粗酶液。按照 1.2.7 纤维素酶的提取方法中所示的操作步骤, 提取得到酶制剂 (干品), 总重量为 8.0 g。称取 0.1 g 酶制剂, 溶于 8 mL 水中, 测定其 Cx 酶活力, 通过计算, 得到每毫升该酶液中含有的酶活力单位是 18.7 U, 从而折算得到提取后总酶活力为 11968.0 U。粗酶液的总活力是 24921.6 U, 从而得到酶的回收率为 48.0%。

3 讨论与结论

目前, 瑞氏木霉是世界上研究和应用最广泛的纤维素酶工业微生物。国际两大酶制剂巨头——诺维信和杰能科公司从美国能源部获得了数千万美元的资助, 在瑞氏木霉的纤维素酶生产研发领域均取得了突出的研究成果, 申请了许多专利保护^[11]。山东大学曲音波等早于 1979 年就从腐烂的纤维素样品中筛选出来一株纤维素酶高产的斜卧青霉 *Penicillium decumbens* 菌株^[6], 经过了长期的育种改良和发酵工艺优化, 斜卧青霉变异菌株的最高滤纸酶活达到了 $18.9 \text{ FPU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 纤维素酶生产速率达到了 $160.0 \text{ FPU}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ (结果未发表)^[11]。张宁、蒋剑春等在 2014 年应用实验室诱变筛选得到的纤维素酶高产突变株 T.reesei150-1-1 发酵制备纤维素酶固体曲, 研究固态发酵条件对产酶的影响并对其进行优化, 应用里氏木霉 150-1-1 制备纤维素酶固体曲的最优发酵条件为发酵温度 31°C , 发酵时间 120 h, 发酵起始 pH 值 5.5, 在此条件下发酵得到的纤维素酶固体曲酶活力达到 $423.6 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[12]。

本实验通过利用曲霉发酵玉米秸秆制备纤维素酶, 在发酵前, 未对玉米秸秆进行灭菌处理, 这一步骤与传统的发酵生产相比, 减少了大量的能源消耗, 同时该曲霉发酵达到的最佳发酵时间较短, 缩短了生产周期, 有利于降低生产成本。在发酵过程中, 氮源对酶产量有很大的影响, 但是氮源的量不是越多越好, 从最佳氮源——硝酸铵所需要的浓度来看, 氮源浓度过大, 反而会降低酶的产量。实验最终得到以下结果: 测定得出曲霉 sp.HS-6 在第 3 天时 Cx 酶的活力达到了最高, 故认为 3 天为最佳发酵时间。在进行最佳氮源和最佳氮源浓度测定时发现, 加入氮源对曲霉 sp.HS-6 纤维素酶系的 3 种酶活性都有一定的提升作用, 纤维素酶硝酸铵质量浓度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下活性最大。最后经过硫酸铵分级沉淀和冷冻干燥后的酶液, 其 Cx 酶活力为 11968.0 U 。

本实验最终得到了纤维素酶的酶制剂, 但从实验结果来看, 酶的回收率较低, 同时单位重量酶活力较低, 归咎起来可能有以下几个方面的原因: 在粗酶液提取过程中, 玉米秸秆发酵残渣中含有部分发酵液导致酶液的损失^[13]; 其次, 在利用硫酸铵溶液盐析的过程中, 酶蛋白还有部分溶于硫酸铵溶液中; 然后, 部分杂蛋白掺杂在酶制剂中, 直接影响单位重量酶的活力; 再次, 在离心过程中, 随着离心次数的增加, 离心机温度上升, 影响了纤维素酶

在硫酸铵溶液中的溶解度, 减少了酶蛋白从硫酸铵溶液中的析出量, 同时温度的提高, 可能影响到酶的活力; 最后, 在酶转移过程中, 损失掉部分酶。

总体来说, 本实验中纤维素酶的活性较低, 酶干品回收率低。未来制备纤维素酶时, 应该注重发酵工艺方面的改善, 着重研究产酶菌种发酵时各项生理生化指标的最佳值, 以便为纤维素酶的生产提供更加完善的发酵条件, 提高酶的产量。同时, 提取酶干品时, 利用低温冷冻离心技术, 可以减少酶的失活。再次, 对于纤维素酶の利用, 可以采用酶的固定化技术^[14], 通过改变酶的某些生理特性, 提高酶的活力。

参考文献:

- [1] 顾方媛, 陈朝银, 石家骥, 等. 纤维素酶的研究进展与发展趋势[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(1): 83-87.
- [2] 杜文娟, 王家东, 侯红萍. 纤维素酶的制备及其应用研究[J]. 酿酒, 2007, 34(3): 60-62.
- [3] 窦全林, 陈刚. 纤维素酶的研究进展及应用前景[J]. 畜牧与饲料科学, 2006(5): 58-60.
- [4] IKE M, PARK J Y, TABUSE M, et al. Cellulase production on glucose-based media by the UV-irradiated mutants of *Trichoderma reesei* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(6): 2059-2066.
- [5] NORMA N, GAMARRA, GRETTEY K, et al. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(2): 545-551.
- [6] CHENG Y F, SONG X, QIN Y B, et al. Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* JU-A10[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(6): 1837-1846.
- [7] 谢天文, 刘晓, 袁月祥, 等. 真菌产纤维素酶的诱导物及其调控机理研究进展[J]. 应用与环境生物, 2010, 16(3): 440-444.
- [8] OLOFSSON K, BERTILSSON M, LIDÉN G. A short review on SSF-an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks[J]. Biotechnology for Biofuels, 2008, 1(7): 1-14.
- [9] 刘桂荣, 张鑫, 郑明珠. 纤维素酶的生产及应用前景[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(1): 15-16.
- [10] 任恒星, 冷云伟, 李浩, 等. 纤维素酶的生产及研究进展[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(15): 63-64.
- [11] 方翊, 秦玉琪, 李雪芝, 等. 纤维素酶与木质纤维素生物降解转化的研究进展[J]. 生物工程学报, 2010(7): 864-869.
- [12] 张宁, 蒋剑春, 杨静, 等. 应用里氏木霉发酵制备纤维素酶固体曲的研究[J]. 生物质化学工程, 2014, 49(5): 7-10.
- [13] LEVER M, HO G, CORD-RUWISCH R. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 7083-7087.
- [14] GYALAI-KORPOS M, MANGEL R, ALVIRA P, et al. Cellulase production using different streams of wheat grain-and wheat straw-based ethanol processes[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(7): 791-802.