

低温纤维素酶的研究进展

董硕^{1,2} 迟乃玉^{1,2} 王鑫^{1,2} 张庆芳^{1,2}

(¹大连大学生物工程学院, 大连 116622 ²辽宁省海洋微生物工程研究中心, 大连 116622)

摘要: 低温纤维素酶在低温下仍具有较高酶活力及较高催化效率, 在应用中能够缩短处理工艺时间, 节省加热或冷却费用, 且易失活, 有着中高温纤维素酶无法比拟的优势。现针对微生物低温纤维素酶的研究现状, 包括菌种来源、分离鉴定、酶学性质、适冷结构及机理研究和基因工程等方面进行综述。

关键词: 低温纤维素酶 结构机理 基因工程

Research Progress of Cold-adapted Cellulase

Dong Shuo^{1,2} Chi Naiyu^{1,2} Wang Xin^{1,2} Zhang Qingfang^{1,2}

(¹College of Bioengineering, Dalian University, Dalian 116622 ²Liaoning Marine Microbiological Engineering Research Center, Dalian 116622)

Abstract Cold-adapted cellulase can reserve high activity and higher catalytic efficiency even at low temperature. It can reduce the treatment process time and costs for heating or cooling in the application process with the advantage of high temperature cellulase can not compare. In this paper, the research progress on microbial cold-adapted cellulase was summarized, including the sources of microorganism, isolation and identification, enzymatic properties, structure and mechanism of cold-adapted, and genetic engineering.

Key words Cold-adapted cellulase Structural mechanism Genetic engineering

纤维素是自然界中公认的含量最丰富的天然再生生物资源。利用廉价的可再生纤维素材料生产生物基产品和生物能对人类的可持续发展至关重要。研究纤维素酶, 从而降低纤维素酶生产成本, 改进纤维素酶活性, 对于减少应用成本具有重要意义。纤维素酶 (cellulase) 是一种复合酶, 能水解纤维素以获取葡萄糖, 包括内切葡聚糖酶 (endo-1, 4- β -D-glucanase, EC3.2.1.4), CMC 酶; 外切葡聚糖酶 (exo-1, 4- β -D-glucanase, EC3.2.1.91), 即纤维二糖水解酶, CBH; β -葡萄糖苷酶 (β -1, 4-D-glucosidase, EC3.2.1.21), BG, 此 3 种酶之间存在协同降解纤维素的作用^[1-3]。

低温纤维素酶与中温酶相比在应用上更具优势和潜力。其在自然条件下具有较高酶活力及较高催化效率, 可大大缩短处理过程的时间并节省昂贵的加热或冷却费用, 经过温和的热处理即可使其活力丧失, 不会影响产品品质。因此, 鉴于低温纤维素酶

在减少工艺流程、降低生产成本以及节能方面的巨大优势, 对其研究正逐步深入。

1 低温纤维素酶产生菌的分离鉴定

低温环境是地球表面最丰富的环境, 存在着众多生物体, 特别是细菌、酵母菌、单细胞藻类和真菌。因为这些生物体不需要温度调节, 其内部温度与周围环境接近。尽管生化反应在低温下的负效应强烈, 但是这些生物与常温环境中物种一样繁殖、生长和迁移^[4]。目前发现的大多数低温纤维素酶都是由低温微生物产生的, 这些微生物主要分布于两极区域 (土壤、海水、海泥和探险队遗迹)、冰川、海底盆地、纬度较高的冻土区或特殊的低温环境等。

已报道的低温纤维素酶产生菌既有嗜冷菌又有耐冷菌, 一般最适生长温度在 10–25℃, 多数不能在超过 37℃ 的条件下生长。但据报道^[5], 一些常温菌株也可以产生低温纤维素酶。经过形态观察、生理生化试验、及 16S rDNA 或 18S rDNA 序列分析的

收稿日期: 2010-08-17

基金项目: 国家“863”计划项目 (2007AA091505 2007AA021306)

作者简介: 董硕, 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物与发酵工程; E-mail: skyho@163.com

通讯作者: 张庆芳, 女, 副教授, 博士, 研究方向: 微生物与发酵工程; E-mail: zqf7561@126.com

©1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结果表明,菌株来源包括近年来研究比较多的交替假单胞菌 (*Pseudoalteromonas*), 1995年根据 16S rDNA 序列的特点将它从交替单胞菌属 (*Alteromonas*) 中独立出来^[5]。其他还包括: 芽孢杆菌 (*Paenibacillus*)、担子菌 (*Basidiomycetes*)、瘤胃细菌 (*Fibrobacter succinogenes*)、噬纤维菌 (*Cytophaga fuscicola*)、纤维弧菌 (*Cellvibrio*)、 α - γ 变形菌纲 (α - γ -proteobacteria)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、噬胞菌属 (*Cytophage*)、纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*)、小核属 (*Sclerotium*)、木霉 (*Trichoderma*)、青霉 (*Penicillium*)、小孢霉属 (*Syzygites ehrenberg*) 以及根霉属 (*Rhizopus ehrenberg*)。

2 低温纤维素酶酶学性质

2.1 低温纤维素酶最适作用温度及其稳定性

嗜冷菌和适冷菌能在低温环境中生长繁殖的关键在于其为适应低温带来的有害影响,在细胞膜、结构蛋白质和酶等方面发生细微的结构变化,从而产生适应低温环境的酶蛋白。Margensin等^[6]定义适冷酶为最适反应温度在 30℃左右,并且在 0℃左右具有一定的催化效率的酶。Feller等^[7]认为,低温酶在低温下具有比较高的转化系数、生理系数和较低的热稳定性。现在研究的低温纤维素酶的最适反应温度普遍较低,大部分在 5–40℃,并在 0–5℃存在较高的酶活力,对温度比较敏感,并具有热不稳定性。曾胤新等^[8]在北极楚科奇海分离到交替假单胞菌 (*Pseudoalteromonas* sp.) BSw 20308 其低温纤维素酶最适作用温度为 35℃,在 5℃酶活力达到最大酶活的 50%左右,酶对热敏感,在 35℃半衰期为 3 h 25℃下酶活稳定。来自海洋芽孢细菌 BME-14 的低温纤维素酶最适 35℃,在 5℃时酶活为最大酶活的 65%^[9]。来自瘤胃细菌 (*Fibrobacter succinogenes*) S85 的低温纤维素酶最适温度为 25℃,在 0℃保持最大酶活的 70%^[10]。而低温酶并非只来自低温微生物,刘秀华^[5]自腐殖质土样中分离得到中温纤维弧菌 2-3-a 其产酶的最适反应温度为 40℃,在 0℃时的残留酶活力为最大酶活的 60%,属于典型的低温酶,为低温酶类的来源扩展了思路。

2.2 离子对于酶活性的影响

来源不同的低温纤维素酶,离子对其影响各异。金属离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 对来自海洋芽孢杆菌

BME-14 的低温纤维素酶活性具有激活作用,而汞、铜和 EDTA 对其具有抑制作用。 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 对噬纤维菌 (*Cytophaga fuscicola*) 菌株 QM 11 的低温酶有促进作用,而 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 对酶反应具有抑制作用。 Na^{+} 离子对瘤胃细菌 (*Fibrobacter succinogenes*) 菌株 S85 的酶活性有着显著的激活作用^[9–11]。

2.3 低温纤维素酶最适作用 pH 及其稳定性

常温纤维素酶的酶活对环境 pH 值很敏感,已报道的低温纤维素酶最适 pH 范围较广 (4–9),且 pH 稳定性范围比较宽。来源于真菌的低温纤维素酶 pH 普遍较低,如青霉 (*Penicillium*) 菌株 FS010441 的最适 pH 值为 4.2 产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 菌株 FS010 最适 pH 为 5.5^[12]。纤维弧菌 2-3-a 的酶最适 pH 为 5.0 且在 pH 4–10 时稳定性良好,能保持 90% 以上的最高酶活力,具有很好的耐碱性^[5]。研究最多的交替假单胞菌 (*Pseudoalteromonas*),其低温纤维素酶最适 pH 集中在 6–8 的范围内,如菌株 RB cell 最适 pH 为 6.7,菌株 MB1 最适 pH 为 7.2 菌株 Z6 BSw 20308 IHG-C-9 最适 pH 均为 8^[8, 13–16]。而噬纤维菌 (*Cytophaga fuscicola*) 菌株 QM 11 最适 pH 为 9.0 且在碱性条件下具有较高的酶活性和较好的稳定性^[11]。

3 低温纤维素酶结构及适冷机理的研究

3.1 结构研究

一般来说,酶的结构决定了酶的性质,对于不同来源、不同结构的酶,其具有的酶学性质也是不同的。近年来,通过基因技术和计算机比对技术的发展,对糖苷水解酶的氨基酸序列分析相关性,可将其分为 82 个家族,其中包括纤维素酶的 13 个家族。到目前为止,国内外已克隆得到包括 5、6、7、8、9、12、26、44、45 和 48 家族在内的 10 个家族。已经通过蛋白质工程技术研究了其中的 5、6、7、8、9 和 45 家族^[17, 18],而低温纤维素酶的研究主要集中在 5、7 和 9 三个家族。

第 5 家族的纤维素酶都属于内切葡萄糖苷酶,它们的三维构象是一个 (β/α)₈ 的折叠桶,在异头碳原子位通过构型保留来完成催化反应^[19]。交替假单胞菌的 *ceK* 基因编码一种胞外低温纤维素酶。其编码一个 1 479 bp 492 个氨基酸组成的蛋白质,分子量为 52.7 kD。该 *CeK* 蛋白包括一个属于糖

苷水解酶家族 5 的 N 末端催化结构域和一个属于糖基结合模块家族 5 的 C 末端纤维素结合结构域。连接两个区域的连接序列由 105 个残基组成。酶谱活性分析表明, CeK 由单一酶组分组成。CeK 主要的水解产物是纤维二糖^[20]。

第 7 家族纤维素酶分子的三维构象是由两个 β 折叠片面对面形成一个 β -sandwich。Hou 等^[12] 自产黄青霉 FS010 中克隆到外切纤维素酶 1 (cbh1) 基因。cbh1 有 1 590 bp 的开放阅读框, 编码 529 个氨基酸, 约为 56 kD 的蛋白质。氨基酸序列中含有 3 个潜在的 N-乙酰糖基化位点, 且连接区域富含苏氨酸。对氨基酸序列同源性分析表明, 该蛋白属于糖苷水解酶第 7 家族, 与构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) cbh1 相似性最高 (79%)。

第 9 家族的酶分子三维构象是一个 $(\alpha/\alpha)_6$ 的折叠桶。Fu 等^[9] 通过构建基因文库, 将来自海洋的芽孢杆菌 BME-14 中的内切葡聚糖酶基因 CeDP 克隆出来。研究表明, 该酶具有一个 1 629 bp 的开放阅读框, 编码一个 60 kD 的分子量的 542 个氨基酸的多肽。通过比对发现, 这种酶与其他已知的内切酶的氨基酸相似性最高只有 52%, 具有一个属于糖苷水解酶家族 9 的 C 末端催化域。

3.2 适冷机理研究

纤维素的酶分子由催化区 (catalytic domain, CD)、纤维素结合区 (cellulose binding domain, CBD) 和一个连接序列 (linker sequence, LS) 组成。目前, 对于低温酶适冷机制的研究认为, 低温纤维素酶的 CD 区域和 CBD 区域与常温纤维素酶相似, 都是依靠 CBD 与纤维素分子链结合, 然后依靠连接区的柔性, 使 CD 区域可以有机会接触到纤维素链产生作用。而低温纤维素酶主要是通过氢键和盐键的修饰, 增加连接区的柔性, 极大地扩大可以结合酶分子的纤维素的表面积, 从而使其在低温环境下亦具有较强的酶活^[21]。

Garsoux 等^[22] 的研究表明, 来自交替假单胞菌 (*Pseudoalteromonas haloplanktis*) 的嗜冷纤维素酶 (Cel5G), 连接 CD 和 CBD 的是一个具有 3 个二硫键形成的 3 个环的、超长的、延伸的以及柔韧的连接区 (LS)。其 CD 和 CBD 均属于糖苷水解酶第 5 家族, 但其 LS 具有 107 个氨基, 是已经发现的纤维素

酶中最长的。其中以二硫键为基础形成的环状结构可以增加大部分扩展结构的稳定性。

Sonan 等^[23] 进一步通过蛋白质工程将 LS 连续缩短, 先后删去这个模型中的第 1 和第 2 个环, 再通过用两个丙氨酸取代两个半胱氨酸将剩余的二硫键桥抑制。后将突变体与全长酶、独立的适冷 CD 区域和中温菊欧文菌的同源酶 Cel5A 进行了动力和热力学性质比较发现, LS 的连续缩短导致对大分子底物比活力的下降及相对的柔性下降, 并同时提高了缩短后酶的热稳定性。这表明, 完整长度的低温酶的长 LS 区域对低温和中温的催化活力有利, 在适冷纤维素酶的适冷机制中发挥了至关重要的作用。

同时, 与常温酶一样, 低温纤维素酶也并非必须具有 CBD 区域。Berlont 等^[13] 自施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) Pst_2494 中分离到属于糖苷水解酶第 5 家族的适冷蛋白 RBcell, 其不具备 CBD 区域。RBcell 表现出内切葡聚糖酶的活性, 能以羧甲基纤维素作为底物产生纤维二糖和纤维三糖。并且, RBcell 能够以纤维二糖为底物分解非网状的纤维素, 估计可能与其没有 CBD 区域有关。

另一方面普遍认为, 低温酶是因为其在低温下酶促反应的热力学特性, 即较高的 K_{cat} 值和较低的活化能。Xiao 等^[24] 采用定向进化方法随机变异常温纤维素酶, 里氏木霉的内切葡聚糖酶 III (EG III), 并获得了低温突变株 W-3。进一步研究酶反应动力学及热稳定性表明, 突变的 W-3 具有较高的 K_{cat} 值, 并较其亲代具有更强的热不稳定性。按照阿仓尼乌斯方程计算突变体和原始蛋白的活化能分别是 13.3 kJ/mol 和 26.2 kJ/mol。Iyo 等^[10] 自瘤胃细菌 (*Fibrobacter succinogenes*) S85 中得到两个内切酶, 即 CelG 和 EGD。当在 4℃ 时测定, CelG 比 EGD 的 K_{cat} 值高 33 倍, K_{cat}/K_m 值高 73 倍, 且 CelG 热稳定性差。

但是 Garsoux 等^[22] 研究认为动态参数具有温度适应性, 其研究来自交替假单胞菌 (*Pseudoalteromonas haloplanktis*) 的低温纤维素酶 Cel5G, 其在 4℃ 时的 K_m 和 K_{cat}/K_m 值与 35℃ 时是相似的。因此, 对于是否低温酶具有更高的 K_{cat} 值和更低的活化能还有待进一步研究。

4 基因克隆和表达

对于常温纤维素酶的基因克隆和表达的研究已经很多。目前大部分纤维素酶基因的表达水平较低,纤维素酶基因工程的主要难题是如何实现不同组分的有效表达和提高表达量。而对真菌中低温纤维素酶的基因研究发现多个增强子结合位点,为今后的提高蛋白表达量提供了依据。

侯运华等^[25]2006年首次采用热不对称嵌套PCR方法克隆了适冷产黄青霉FS010的cbh1基因,以单拷贝在基因组中存在。研究碳源对于cbh1基因表达的影响,在用RT-PCR分析的9种碳源中纤维二糖和龙胆二糖为强诱导物,而乳糖和木糖也能在不同程度上诱导cbh1基因表达。将其进一步将cbh1 cDNA在酿酒酵母中表达,重组CBH1分子量为62 kD,酶活性达到102.4 U/mg,最适作用温度为45℃,最适pH为5.5。其采用TAIL-PCR克隆了产黄青霉cbh1基因的1316 bp的5'调控区得到一个新的启动子。经分析发现,存在CRE1 ACE1 ACE2和CCAAT增强子结合基序,对启动子5'定向缺失。以uidA为报告基因,构建了全长及3个不同长度缺失启动子的表达载体pebh1, pebh1d1, pebh1d2和pebh1d3。将4种报告质粒分别与携带乙酰胺酶基因的载体p3S2共转化出发菌株FS010,4种表达质粒转化子均有GUS活性。证明启动子的-200 bp-1316 bp区域内存在多个转录激活因子靶位点。随着启动子缺失长度的增加,GUS活性逐步降低。GUS活性最高。全长启动子、缺失715 bp,915 bp和1115 bp的启动子GUS活性分别为最高活性(316.8 U/mg)的100%、66.7%、49.3%和9.0%。

对于细菌中低温纤维素酶的基因融合表达研究表明,融合得到的酶最适温度不变,而pH的耐受性得到优化。游银伟等^[26]采用PCR技术克隆了编码交替单胞菌MB-1的适冷内切 β -1,4葡聚糖酶基因ceA。将ceA基因连入质粒pGEX-4T-1,构建了表达质粒pGEX-ceA,在大肠杆菌BL21中进行表达。经37℃培养和18℃诱导,使ceA基因在大肠杆菌BL21中表达。在菌体破碎后的发酵液上清中,表达的融合蛋白GST-CeA大约占总蛋白含量的4%,浓度大约为0.572 mg/mL,进一步分析融合酶GST-CeA的性质并与野生型酶进行比较,发现其最

适反应温度仍为35℃,最适反应pH值由6.0升高到7.2变成了中性酶,而且融合酶GST-CeA更耐酸碱性的变化。

5 展望

面对目前低温纤维素酶产量较低,酶活性不高的现状,如何提高酶的产量将是未来研究的重点之一。主要在以下几个方面需进一步研究:

(1)产纤维素酶菌自然选育。菌种的选育是纤维素酶生产的基础性工作,为了生产高质量的低温纤维素酶产品,仍需要进行大量研究。

(2)诱变育种。其能够大幅度改变菌种的遗传特性,是得到高产菌株的一种简单、快速、收效显著的方法。如陈亮等^[27,28]通过UV、DES等诱变绿色木霉(*Trichoderma viride*) CNY086,使酶活力提高了40%。

(3)工程菌的构建。随着各种预处理方法的采用和下游产物的提取技术的应用,低温纤维素酶基因克隆和工程菌的构建将成为低温纤维素酶研究的热点。

(4)多菌株混合发酵。由于纤维素酶的多样性和纤维素分子的复杂性,微生物混合培养或混合发酵将会越来越受重视。张丹^[29]经液体拮抗试验和两两复配试验,筛选到高效降解纤维素菌株组合F3F17和F21F5,CMC酶的活性分别达到1.91 U/mL和2.04 U/mL,纤维素降解率3w内均达到33.3%。

总之,低温纤维素酶由于其低温下的高催化特性,使之能够在洗涤工业、食品工业、医药纺织和畜牧业中广泛应用,简化了工艺、节约了成本和能源,相信随着对其研究的逐步深入,必将在工业上有着广阔的前景。

参考文献

- [1] Percival Zhang YH, Himmel ME, Mienzen R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 2006; 24(5): 452-481.
- [2] 李鸿玉,厉重先.有机复合物H对纤维素酶促反应动力学特性的影响. *生物技术通报*, 2009(12): 188-192.
- [3] 厉重先,李鸿玉,刘雪峥.纤维素酶促进剂在饲料中的应用初探. *生物技术通报*, 2006(4): 126-132.
- [4] Cavicchioli Ricardo, Siddiqui KS, Andrews D. Low-temperature ex-

- trophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(3): 253-261.
- [5] 刘秀华. 纤维弧菌低温纤维素酶的分离纯化及性质探讨 [D]. 济南: 山东大学, 2007.
- [6] 岳贤田, 高桂枝. 低温微生物脂肪酶的研究进展. *中国油脂*, 2008, 33(7): 44-48.
- [7] Margesin R, Schnner F. Low temperature bioremediation of a water contaminated with anionic surfactants and fuel oil. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998, 49: 482-486.
- [8] 曾胤新, 俞勇, 陈波, 等. 低温纤维素酶产生菌的筛选、鉴定、生长特性及酶学性质. *高技术通讯*, 2005, 15(4): 98-104.
- [9] Fu Xiaoyu, Liu Pengfu, Lin Ling, et al. A novel endoglucanase (Cel9P) from a marine bacterium *Paenibacillus* sp. BME-14. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(3): 1627-1636.
- [10] Iyo AH, Forsberg CW. A cold active glucanase from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 995-998.
- [11] 徐庆强, 张志明, 王延明, 等. 产碱性纤维素酶海洋细菌的筛选、鉴定及酶学性质研究. *海洋科学*, 2009, 33(7): 1-5.
- [12] Hou YH, Wang TH, Long H, et al. Cloning, sequencing and expression analysis of the first cellulase gene encoding cellobiohydrolase I from a cold adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007, 39(2): 101-107.
- [13] Berlemont R, Delsaute M, Pipers D, et al. Insights into bacterial cellulose biosynthesis by functional metagenomics on Antarctic soil samples. *ISME Journal* 2009, 3(9): 1070-1081.
- [14] 王玢, 汪天虹. 冷活性纤维素酶性质研究. *海洋科学*, 2004, 28(2): 40-42.
- [15] 张淑红, 刘秀花, 梁峰, 等. 低温纤维素降解菌的筛选及其酶学性质初步研究. *微生物学杂志*, 2009, 29(3): 97-100.
- [16] 吕明生, 吕凤霞, 房耀维, 等. 低温纤维素酶产生菌的筛选、鉴定及酶学性质初步研究. *食品科学*, 2007, 28(12): 235-239.
- [17] 张晓勇, 陈秀霞, 高向阳. 纤维素酶的蛋白质工程. *纤维素科学与技术*, 2006, 6(14): 55-58.
- [18] 韩笑, 陈介南, 王义强, 等. β -葡萄糖苷酶基因的克隆与表达研究进展. *生物技术通报*, 2008(3): 8-12.
- [19] 李雯, 洪艳, 侯红萍. 纤维素酶高产菌株的研究进展. *酿酒科技*, 2009, 8(182): 105-111.
- [20] Zeng RY, Xiong PJ, Wen JJ. Characterization and gene cloning of a cold active cellulase from a deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. DY3. *Extremophiles* 2006, 10(1): 79-82.
- [21] Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends* 2008, 3(18): 103-107.
- [22] Garsoux G, Lamotte J, Gerday C, et al. Kinetic and structural optimization to catalysis at low temperatures in a psychrophilic cellulase from the Antarctic bacterium *Pseudomonas haloplanktis*. *Biochemical Journal* 2004, 384(P2): 247-253.
- [23] Sonan GK, Receveur-Brechot V, Duez C. The linker region plays a key role in the adaptation to cold of the cellulase from an Antarctic bacterium. *Biochemical Journal* 2007, 407(P2): 293-302.
- [24] Xiao ZZ, Wang P, Qu YB, et al. Cold adaptation of a mesophilic cellulase, EG III from *Trichoderma reesei* by directed evolution. *Science in China Series C-Life Sciences* 2002, 45(4): 337-343.
- [25] 侯运华. 适冷海洋青霉纤维素酶和半纤维素酶的分子生物学研究 [D]. 济南: 山东大学, 2006.
- [26] You YW, Wang TH. Cloning and expression of endoglucanase of marine cold-adapted bacteria *Pseudomonas* sp. MB-1. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2005, 45(1): 142-144.
- [27] 陈亮, 迟乃玉, 张庆芳. 低温纤维素酶菌株 CNY086 选育及发酵培养基优化 (I). *微生物学通报*, 2009, 36(10): 1547-1552.
- [28] 陈亮, 迟乃玉, 张庆芳. 低温纤维素酶菌株 CNY086 发酵条件优化 (II). *微生物学通报*, 2009, 36(10): 1553-1557.
- [29] 张丹. 低温降解纤维素菌的筛选 [D]. 沈阳: 东北农业大学, 2007.

(责任编辑 狄艳红)