

酸性纤维素酶 *CBH II* 基因与非抗性穿梭表达载体的重组及在乳酸杆菌的表达及其活性检测

赵莹^{1,2}, 孙哲^{1*}, 刘燕³, 胡后银⁴, 陈大芳⁵, 娄玉杰², 张宏福^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室,

北京 100193; 2. 吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118;

3. 内蒙古农业大学动物科技学院, 呼和浩特 010018;

4. 济南市畜牧兽医研究所, 济南 250002; 5. 贵州省畜禽良种场, 贵阳 550018)

摘要: 以 *SmaI* 和 *SphI* 双酶切 pMD18-T-*CBH II* 和以胸苷酸合成酶基因 (thymidylate synthase, *thyA*) 为选择压力的非抗生素抗性的穿梭表达载体 pW425t, 胶回收酸性纤维素酶 *CBH II* 基因和载体大片段, 并将纯化的 *CBH II* 基因和表达载体 pW425t 大片段进行连接, 构建出可以在乳酸菌与大肠杆菌之间穿梭表达的原核表达重组质粒 pW425t-*CBH II*。将 pW425t-*CBH II* 转化至 *thyA* 基因缺陷型的乳酸杆菌感受态细胞中, 通过质粒提取、酶切鉴定、PCR 鉴定、测序分析和生长功能弥补筛选阳性克隆。SDS-PAGE 分析, 可见约 49.6 ku 的蛋白, 并且刚果红染色显示重组乳酸杆菌可产生明显的水解圈。

关键词: 纤维素酶; *CBH II* 基因; 乳酸杆菌; 表达

中图分类号: Q784; Q786

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)05-0670-06

Recombination of *CBH II* Gene with Non-antibiotic Selected Vector and Expression and Activity Detection in *Lactobacillus*

ZHAO Ying^{1,2}, SUN Zhe^{1*}, LIU Yan³, HU Hou-ying⁴,
CHEN Da-fang⁵, LOU Yu-jie², ZHANG Hong-fu^{1*}

(1. State Key Lab of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 4. Institute of Animal Science and Veterinarian of Jinan, Jinan 250002, China; 5. Guizhou Province Livestock and Poultry Seedstock Breeding, Guiyang 550018, China)

Abstract: Recombinant plasmids pMD18-T-*CBH II* and pW425t, prokaryotic expression shuttle vector between *E. coli* and *Lactobacillus*, were digested with *SmaI* and *SphI* enzymes respectively. The purified *CBH II* gene was subcloned into the expression vector pW425t. Thus, the recombinant pW425t-*CBH II* was constructed, and then was transformed into the competence *thyA* gene-mutant *Lactobacillus* DOMLaS107. Treated lysates of bacterium were loaded directly on SDS-PAGE, and approximately 49.6 kD protein was observed, and recombinant *Lactobacillus* can produced clear hydrolysis halos on the Congo-Red-CMC plate.

Key words: cellulase; *CBH II* gene; *Lactobacillus*; expression

瘤胃纤维的分解与吸收是反刍动物的重要营养来源之一,而瘤胃纤维水解菌是分解瘤胃纤维的重要微生物基础。大量证据显示纤维水解不受纤维水解微生物数量和活力的限制,而与微生物可获得的纤维数量和所处环境的pH值有关^[1]。已知低pH值通过阻止纤维水解细菌/真菌生长抑制瘤胃纤维消化(细菌/真菌生长要求的最低pH值为5.9)^[2]。通过遗传工程对耐受低pH值的瘤胃细菌引入纤维水解功能可能是增强酸性条件下纤维水解能力的途径^[3],尤其改善高精料日粮产生的酸性瘤胃条件下纤维消化更具有前途。

本研究将能降解纤维素酶系中的纤维二糖水解酶CBH II基因在非抗生素抗性表达载体中进行重组后,再转化至能够耐受消化道前段酸性条件下的细菌(乳酸菌杆菌)中并进行表达,旨在验证重组质粒经转化后所形成的转基因乳酸杆菌是否可以赋予乳酸菌分泌纤维素酶的功能,为下一步验证重组质粒经转化后所形成的转基因乳酸杆菌是否可以回归消化道并定植其中、检测转基因工程乳酸菌在消化道内的消涨规律,以及将能降解纤维素的酶系在此非抗性表达载体及共生乳酸菌中共表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体 载体pMD18-T-CBH II甘油菌和以thyA基因为选择压力的载体pW425t^[4],thyA基因缺陷型的大肠杆菌和乳酸杆菌均由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物营养学国家重点实验室保存。

1.1.2 引物 根据GenBank中Trichoderma koningii AS3.2774(DQ504304)CBH II基因序列设计的1对引物由上海生工合成,上游引物:5'-ATAC-CCGGATGATTGTCGGCATTCTCACC-3';下游引物:5'-TCGGCATGCTTACAGGAACGAT-GGGTTTGC-3'。

1.1.3 主要试剂 Agarose Gel DNA Purification Kit(琼脂糖DNA纯化试剂盒)、Ex Taq DNA聚合酶、T4DNA ligase、Sma I、Sph I、dNTP均为TaKaRa产品;溶菌酶、质粒提取试剂盒为Tiangen产品;DL-苏氨酸、对硝基酚(p-NPH)、对硝基酚-β-D-纤维二糖苷(p-NPC)为Sigma产品。

1.2 方法

1.2.1 原核表达重组质粒pW425t-CBH II的构建

重组质粒pMD18-T-CBH II和以thyA基因为选择压力的载体pW425t均以Sma I和Sph I双酶切,切胶回收纯化后,以T4 DNA连接酶连接,做成10 μL反应体系:pW425t 2 μL,CBH II 6 μL,10×T4 DNA Ligase Buffer 1 μL,T4 DNA Ligase 1 μL,加ddH₂O至10 μL。

将上述反应液混匀,16℃过夜连接,做好的反应液最好直接进行转化试验,如果试验条件不允许,可放于-20℃保存。连接产物应用电击转化法^[5]转化至thyA基因缺陷型的乳酸杆菌感受态DOMLaS107中,之后将转化产物在普通的MRS固体培养基(未添加胸腺嘧啶核苷)上培养、观察。

1.2.2 重组质粒用Sma I和Sph I双酶切鉴定 将经过生长功能弥补获得的菌落在普通MRS液体培养基(未添加外源的胸腺嘧啶核苷)中培养,对筛选的菌落进行质粒提取^[6],将pW425t-CBH II质粒用1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定后,将重组质粒用Sma I和Sph I双酶切,验证其是否含有酸性纤维素酶CBH II基因和非抗性穿梭表达载体大片段。做成20 μL的反应体系:10×T Buffer 1 μL,BSA 1 μL,Sph I 1 μL,Sma I 1 μL,重组质粒8 μL,加ddH₂O至20 μL。

做成的反应液混匀后,30℃作用1 h,之后37℃作用2 h。反应结束后,取5 μL反应产物于1%琼脂糖凝胶上进行电泳,观察并对重组质粒进行PCR鉴定。

1.2.3 重组质粒PCR鉴定 将上述鉴定的质粒用灭菌二馏水稀释100倍,以此作为模板,用EX-Taq DNA聚合酶进行PCR扩增,反应体系为:5×PCR Buffer 5 μL,EX-Taq 0.25 μL,上下游引物各0.5 μL,dNTP DNA聚合酶3 μL,质粒2 μL,加ddH₂O至25 μL。

混匀反应液,反应条件为:95℃预变性4 min;94℃变性45 s,53℃退火45 s,72℃延伸90 s,30个循环;72℃延伸5 min。反应结束后,取5 μL PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,紫外观察。

1.2.4 测序鉴定 根据pW425t-CBH II重组质粒设计1对引物,上游引物:5'-AACTTCTGGT-CAATATCCTT-3';下游引物:5'-TGA ACTATA-AGCAAAGGCA-3'。由北京六合通经贸有限公司进行测序,并用BioTool软件进行分析。

1.2.5 CBH II基因在乳酸杆菌中的表达 将经过生长功能弥补获得的含有pW425t-CBH II重组质

粒的阳性菌株接种在普通 MRS 液体培养基(未添加外源的胸腺嘧啶核苷)中,37 °C 250 r·min⁻¹ 培养过夜。取 5 mL 接种于 100 mL 新配制的 MRS 液体培养基中,37 °C 200 r·min⁻¹ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8,在培养基中添加 40 mmol·L⁻¹ DL-苏氨酸。每隔 1 h 取 1 次菌液,取至 7 h。以同样的方法诱导 7 h 含空载体 pW425t 的乳酸杆菌 DOMLaS107 作对照。

1.2.6 SDS-PAGE 分析 将各个时间诱导收获的菌液 OD₆₀₀ 均调至 0.7,取菌液 1.5 mL,4 °C 离心收集菌体,用生理盐水洗涤 2 次,在沉淀菌体中加入 80 μL 二馏水,加入终浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的溶菌酶,37 °C 放置 1 h,使细菌裂解,再加入等量的 2× SDS 凝胶上样缓冲液,混匀后于沸水中煮沸 10 min,15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清 15 μL 参考文献[7]的方法进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.7 重组乳酸杆菌中 CBH II 酶活的平皿检测 采用刚果红染色法,参照官家发等的方法[8]。

1.2.8 最适 CBH II 酶解温度和 pH 值的测定 用 pNPC 法[9],检测 CBH II 的酶活性,以及对最适酶解温度和 pH 值进行测定,试验中用高温、高压灭活的待测粗酶液代替待测粗酶液作为对照,3 次重复,每个重复测 3 次,最终取其平均数值并做标准差。

1.2.9 酸性纤维素酶活力的测定 采用 pNPC 法进行 CBH II 活力的测定。以 50 mmol·L⁻¹ pH 5.0 的醋酸钠缓冲液配制 2.5 mmol·L⁻¹ 的 pNPC 溶液,取 1 mL 加入 1 mL 粗酶液,50 °C 保温 30 min,以 1% 的 Na₂CO₃ 1 mL 终止反应,410 nm 比色。以对硝基酚的生成量表示酶活力,一个酶活力单位定义为每分钟水解 pNPC 产生 1 μmol 对硝基酚所需要的酶量[9]。

2 结果

2.1 生长恢复鉴定结果

thyA 基因缺陷型乳酸杆菌 DOMLaS107 在普通的 MRS 培养基上不能生长或生长不良,必须在加有外源的胸腺嘧啶核苷(50 μg·mL⁻¹)的条件下才能恢复生长。在本试验中含 thyA 基因的重组质粒 pW425t-CBH II 的转入能使 thyA 基因缺陷型乳酸杆菌 DOMLaS107 在普通的 MRS 平板上恢复生长,见图 1。

2.2 重组质粒 pW425t-CBH II 的构建与鉴定

将经过生长功能弥补获得的菌落在普通 MRS

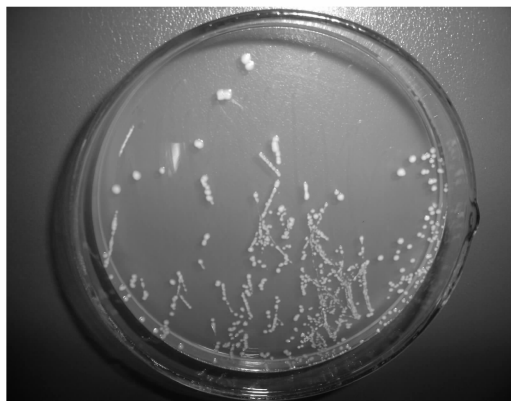
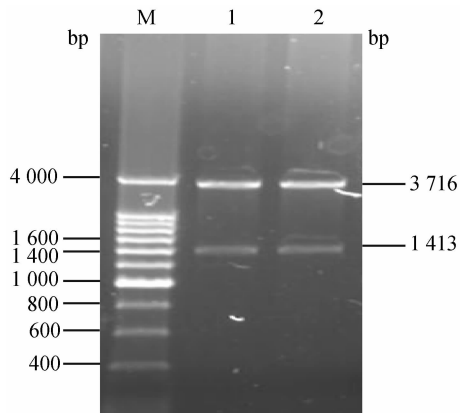


图 1 重组大肠杆菌阳性菌筛选

Fig. 1 Screening positive bacteria of recombinant *Lactobacillus*

液体培养基(未添加外源的胸腺嘧啶核苷)中培养,对筛选的 7 个菌落进行质粒提取,将重组质粒用 *Sma* I 和 *Sph* I 双酶切,其中(6)号菌株酶切后得到了约 3 700 bp 的 pW425t 线性片段和 1 413 bp 的 CBH II 插入片段,表明已构建出含酸性纤维素酶 CBH II 基因的非抗性穿梭表达载体的重组质粒 pW425t-CBH II (图 2)。



M. 200 bp DNA marker; 1-2. *Sma* I 和 *Sph* I 双酶切

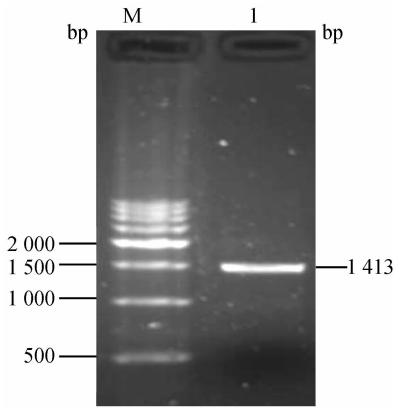
M. 200 bp DNA marker; 1-2. Identification with *Sma* I and *Sph* I

图 2 重组克隆质粒 pW425t-CBH II 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pW425t-CBH II with restrictive enzyme digestion

2.3 重组质粒 pW425t-CBH II 的 PCR 鉴定

用重组质粒载体 DNA 作为模板经 PCR 扩增得到目的片段大小的条带,如图 3,证明重组质粒内确实含有目的基因。



M. 500 bp DNA marker; 1. *CBH II* 基因 PCR 阳性结果

M. 500 bp DNA marker; 1. Positive plasmid of *CBH II* gene by PCR

图3 PCR 鉴定重组质粒 pW425t-CBH II

Fig. 3 PCR identification of recombinant plasmid of pW425t-CBH II

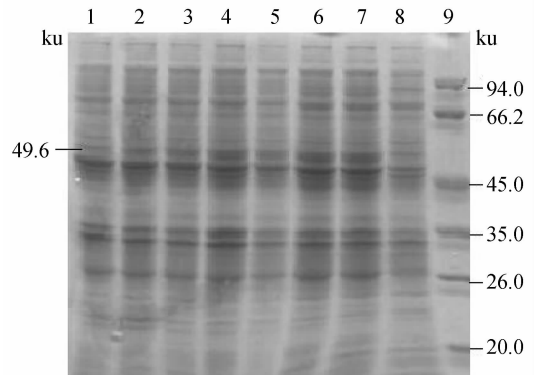
2.4 测序鉴定

经过 BioTool 软件分析,测序结果与 GenBank 发表的标准序列相比同源性达到 99.79%,其中有 3 个碱基发生变异,它们分别是 *CBH II* 基因序列上的第 31 位的 ACG-GCG,第 89 位的 GCC-GTC,第 960 位的 CGC-CGT,使其编码的第 11 个氨基酸由 Thr-Ala,第 30 个氨基酸由 Ala-Val,而第 320 个氨基酸并没有发生改变,CGC 与 CGT 编码同一个氨基酸 Arg(测序分析图略)。

2.5 SDS-PAGE 分析

分析上述经过鉴定为阳性的克隆菌株在各时间的表达情况。由图 4 可知,*CBH II* 基因获得了表达,在 1~4 h 内,蛋白表达量是随着时间而逐渐增

加,4 h 基本达到稳定不变,相对分子质量约为 49.6 ku,与预期 *CBH II* 蛋白的相对分子质量一致。而含空载体 pW425t 的乳酸杆菌 DOMLaS107 作对照则未见该蛋白质表达。



1-7. pW425t-CBH II 在 *Lactobacillus* DOMLaS107 中 1,2,3,4,5,6,7 h 后的表达产物;8. 空载体 pW425t 在 *Lactobacillus* DOMLaS107 中 7 h 后的表达产物;9. 低分子量蛋白质标准

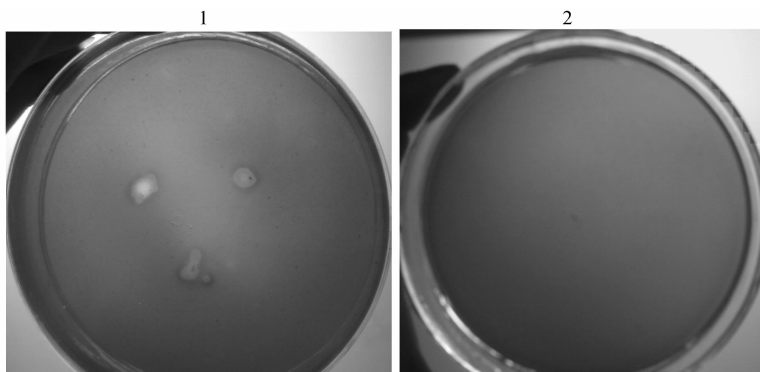
1-7. pW425t-CBH II expression products in *Lactobacillus* DOMLaS107 after 1-7 h respectively, as negative control; 8. Empty pW425t expression products in *Lactobacillus* DOMLaS107 after 7 h; 9. Low molecular weight protein marker

图4 SDS-PAGE 电泳检测 *CBH II* 基因表达产物

Fig. 4 Detection of the *CBH II* protein with SDS-PAGE

2.6 重组乳酸杆菌中 *CBH II* 酶活的平皿检测

将平板上的重组菌用 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的刚果红溶液染色 1 h,弃去染液,再用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液洗涤 1 h 后,发现菌落的周围出现了清晰的透明圈,纤维素酶的活性可凭借清晰透明圈的出现来判断,如图 5。



1. 重组乳酸杆菌;2. 乳酸杆菌

1. Recombinant *Lactobacillus*; 2. *Lactobacillus* as negative control

图5 重组乳酸杆菌刚果红染色产生的水解圈

Fig. 5 Hydrolysis halos produced on Congo-Red-CMC plate by recombinant *Lactobacillus*

2.7 最适 CBH II 酶解温度和 pH 值的测定

温度对纤维素酶 CBH II 酶活影响的研究结果表明,在转基因工程菌中 CBH II 最适的酶活反应温度为 50 °C,温度从 30 °C 降到 50 °C 时纤维素酶 CBH II 的相对酶活逐渐升高,在 50 °C 时达到最高,随着温度继续提高相对酶活逐渐下降(图 6)。

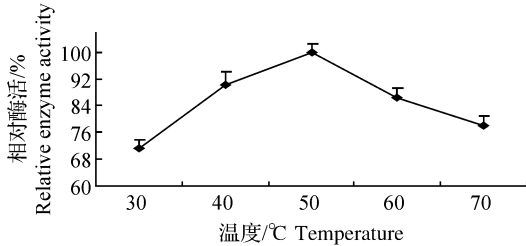


图 6 温度对 CBH II 酶活的影响

Fig. 6 Effect of temperature on CBH II relative enzyme activity

pH 对纤维素酶 CBH II 酶活影响的研究结果表明,在转基因工程菌中 CBH II 的最适酶活反应 pH 为 5.0, pH 从 3.0 降到 5.0 时纤维素酶 CBH II 的相对酶活逐渐升高,在 pH 为 5.0 时达到最高,随着温度继续提高相对酶活逐渐下降(图 7)。温度 50 °C, pH 5.0 时重组乳酸杆菌的 CBH II 的酶活力达到 0.156 2 U · mL⁻¹。

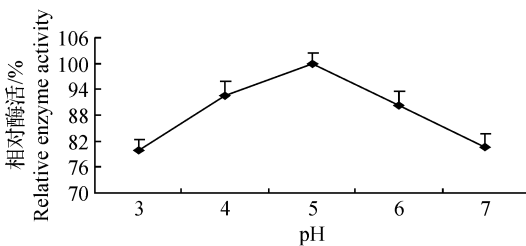


图 7 pH 对 CBH II 酶活的影响

Fig. 7 Effect of pH on CBH II relative enzyme activity

3 讨论

3.1 酸性纤维素酶 CBH II 基因的选择

纤维素酶是一种重要的工业用酶,已经被广泛地应用于饲料添加剂、棉麻纺织品的处理和加酶洗涤剂等的生产中。纤维素降解酶系包括:(1)内切葡萄糖苷酶(EG)。这类酶随机水解 β-1,4-糖苷键,将长链纤维素分子(羧甲基纤维素钠(CMC)即为人工合成的一种线形纤维素钠盐)截短。(2)外切葡萄糖苷酶,又称纤维二糖水解酶(cellobiohydrolase,

CBH 或 CBH II);也有文献报道还包括外切葡萄糖苷酶(cellobiohydrolases)^[10]。这类酶作用于 β-1,4-糖苷键,每次切下 1 个纤维二糖分子。(3)β-葡萄糖苷酶(BG),这类酶将纤维二糖(葡萄糖苷键连接的纤维二糖)水解成葡萄糖分子。目前人们对纤维素酶的研究多以葡聚糖内切酶为主,而葡萄糖外切酶是纤维素水解酶系中唯一可以作用于结晶纤维素的酶组分,其中 CBH II 基因对整个纤维素酶系的表达起着重要作用。由于动物消化道内纤维素消化发生的(胃/瘤胃、小肠)环境大多呈弱酸性,据此推断酸性纤维素酶在动物营养上更具意义。

3.2 乳酸杆菌的选择

乳酸菌作为活菌制剂及人和动物体内正常菌群的重要成员之一,与人类及动物的生命息息相关,它在生命科学中的应用日益受到人们的关注和广泛开发利用。乳酸杆菌是相对安全的共生菌,乳酸杆菌作为一种良好的表达外源基因且安全的受体菌株可通过定居于人或哺乳动物粘膜表面而持续发挥作用,以乳酸杆菌作为表达外源保护性抗原基因的受体菌株,就可以将乳酸菌的生物学功能和外源功能抗原基因的特异性免疫相结合^[11-13]。同时乳酸菌作为正常生理性细菌,又符合可食性、安全性等优点。

3.3 乳酸菌的表达量

由于乳酸菌的研究相对较晚,对乳酸菌进行基因操作也比较难,所以有关乳酸菌表达的报道较少,而且由于乳酸乳球菌较乳酸乳杆菌的表达效率高,所以多数为乳酸乳球菌方面的报道。虽然乳酸乳球菌较乳酸乳杆菌的整体表达效率高,但由于乳酸乳球菌不适于表达分泌型抗原,更不能在人或动物的消化道内定植,仅一过性地通过肠道^[14],所以其应用受到了限制。而乳酸乳杆菌可以定植于人或动物的消化道,所以乳酸乳杆菌更适于表达分泌型抗原。本试验中所用的表达载体的启动子为 P32^[15],是在乳酸菌中表达的一种非常强的启动子。但影响外源基因乳酸菌中表达效率的因素除了启动子外,还有很多因素,包括培养条件的控制,cDNA 密码子的选用,mRNA 的一、二级结构和表达产物的后加工处理等等。

3.4 温度、pH 值及其互作

温度与 pH 值的确是酶促反应中的两个关键影响因素,而且两者之间也的确存在互作问题。虽然何平等^[16]在实验室条件下测得的外切 β-葡聚糖苷酶 CBH 的反应最适温度为 60 °C,最适 pH 为 6.0,

与本研究得出的结论CBH II的反应最适温度为50℃,最适pH为5.0有一定出入,但所有发表的关于测定纤维素酶的条件均为50℃,pH为5.0,所以分别假定在50℃和pH 5.0特定前提下的另一个因素对固定条件的反应(互作),最后确定酸性纤维素酶CBH II基因最适温度和pH值。

3.5 具体应用

基因工程菌的有效性,构建的基因工程菌能否遗传,它的目的功能是否稳定,在加工过程中转基因工程菌活力的损失以及能否高效地到达肠道而不被胃酸过多杀死等方面都是急需解决的问题;转基因工程菌的货期,转基因工程菌多数存在保存期短,活性不稳定的缺点,给实际应用带来很多困难,因为转基因微生态制剂在制备过程中不可避免的要经历某些高温条件或特殊pH的给喂环节;转基因工程菌的实际应用环境包括其本身生存环境、与其它物质混合时其它物质的性质、给动物应用的同时动物是否应用了对转基因工程菌不利的其它物质(如抗生素等)等因素。

微生态制剂诞生之初就是要用其取代抗生素的应用,而在实际应用过程中微生态制剂的最大障碍也是抗生素的滥用。虽然含有非抗生素抗性表达载体的转基因工程乳酸菌具有广阔的应用前景,但距离实际应用还有一段很长的距离,除了严格执行抗生素类添加剂的应用外,还有许多限制其应用的瓶颈问题需要我们去逐一解决,相信在广大科研工作者的共同努力下定会迎来其辉煌的益生时代。

参考文献:

- [1] 冯仰廉. 反刍动物营养学[M]. 北京:科学出版社, 2004: 84-93.
- [2] RUSSEL J B, DOMBROWSKI D B. Effect of pH on the efficiency of growth of rumen bacteria in pure culture[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1980, 39: 604-610.
- [3] RUSSELL J B, WILSON D B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH[J]. *J Diry Sci*, 1996, 79:1503-1509.
- [4] 王春风. 以ThyA基因为选择压力的非抗性表达载体的构建及艾美耳球虫SO7基因的表达[D]. 北京:中国农业大学, 2001.
- [5] 贾士芳, 王荫榆, 郭兴华, 等. 乳杆菌电转化条件的研究[J]. *生物工程学报*, 1998, 14(4): 429-433.
- [6] ANDERSON D G, MCKAY L B. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from Lactic streptococci[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46: 549-552.
- [7] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 第3版. 北京:科学出版社, 2002.
- [8] 官家发, 范成英, 吴庆恰, 等. 耐热芽胞杆菌E2菌株纤维素酶基因克隆的研究[J]. *遗传学报*, 1995, 22(4): 322-328.
- [9] DESPHAUDE M V, ERIKSSON K E, PETTERSSON L G, et al. An assay for selective determination of exo-1,4- β -glucanase in a mixture of cellulolytic enzyme[J]. *Anal Biochem*, 1984, 138:481-487.
- [10] LYND L R, WEIMER P J, VAN ZYL W H, et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(3): 506-577.
- [11] 孙哲. 分泌型以 β -Gal为选择标记乳酸菌表达载体构建及柔嫩艾美耳球虫SO7基因的表达[D]. 北京:中国农业大学, 2003.
- [12] CHRISTIAENS H, LEER R J, POUWELS P H, et al. Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 3792-3798.
- [13] FU X, XU J G. Development of a chromosome plasmid balanced lethal system for *Lactobacillus acidophilus* with thyA gene as selective marker[J]. *Microbiol Immunol*, 2000, 44(7):551-556.
- [14] GRUZZA M, FONS M, OURIET M F, et al. Study of gene transfer *in vitro* and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus lactis* strains to various strains belonging to human intestinal flora[J]. *Microb Releasea*, 1994, 2: 183-189.
- [15] VOSSSEN J M B M, LELIE D, VENEMA G. Isolation and characterization of streptococcus cremoris Wg2-Specific promoters[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53(10): 2452-2457.
- [16] 何平, 吴文能, 张敬璇, 等. 一株绿色木霉产外切 β -葡聚糖苷酶条件及其纯化与性质的研究[J]. *华南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, 26(3):69-73.