

文章编号: 1673 1689(2010)05-0687-06

棘孢木霉胞外 β 糖苷水解酶的产生条件及基本特征

王剑锋, 李江, 杨红, 谭可, 张浩, 刘亚洁

(东华理工大学 生物系, 抚州 344000)

摘要: 分离自煤炭样品的菌株 *Trichoderma asperellum* W03 在液态培养条件下能同时分泌产生 3 种酶学性质相近的 β 糖苷水解酶: 木聚糖酶、羧甲基纤维素酶和几丁质酶, 3 种酶的最适反应温度分别为 45、45 和 40 $^{\circ}\text{C}$, 最适反应 pH 值为 4.5 并且在 pH 值 2.5~5.0 的条件下酶活稳定; 3 种活性酶的合成与菌体生长偶联, 对碳源、氮源、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、pH 值和发酵时间等培养因素的响应趋势一致。优化的产酶培养基为 (g/L): 土豆 200、羧甲基纤维素钠 2.0、葡萄糖 5.0、 KNO_3 1.0、蛋白胨 1.0、 KH_2PO_4 1.0、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5、pH 6.0; 在 33 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 和 50 mL/250 mL 的摇瓶培养条件下发酵 72 h, 木聚糖酶、CMC 酶和几丁质酶的酶活分别达到 87 u/mL, 58 u/mL 和 30 u/mL, 该菌株在生物防治和饲料加工方面具有潜在应用价值。

关键词: 木聚糖酶; CMC 酶; 几丁质酶; 生物防治

中图分类号: R 915

文献标识码: A

Production and Characterization of Extracellular β -glycoside Hydrolase from *Trichoderma Asperellum* W03

WANG Jian-feng, LI Jiang, YANG Hong, TAN Ke, ZHANG Hao, LIU Ya-jie

(Department of Biology, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000, China)

Abstract: The strain of *Trichoderma asperellum* W03 was isolated from the peat and exhibited the potential to produce xylanase, CMCase and chitinase under the submerged culture. Those three kinds enzymes achieved at a highest activity at the conditions: pH 4.5, temperature 40 $^{\circ}\text{C}$ –45 $^{\circ}\text{C}$ and acidic condition. Moreover, the optimum nutrient and culture conditions were determined and listed as follows: 200.00 potato, 2.0 sodium carboxymethyl cellulose, 5.0 glucose, 1.0 KNO_3 , 1.0 peptone, 1.0 KH_2PO_4 , 0.5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and pH 6.0. with the optimum conditions, xylanase, CMCase and chitinase reached at 87 u/mL, 58 u/mL and 30 u/mL, respectively, after 72 h with 33 $^{\circ}\text{C}$ and 180 r/min.

Key words: xylanase, CMCase, chitinase, biocontrol

木霉 (*Trichoderma* spp.) 是具有重要经济意义的一类半知真菌, 是真菌中最具潜力的生防菌株,

可用来防治多种土传植物病害^[1]; 同时, 木霉也是多种水解酶类的优良生产菌株, 如 *Trichoderma*

收稿日期: 2009-11-30

基金项目: 江西省教育厅科技项目 (GJJ08309)。

作者简介: 王剑锋 (1968-), 男, 陕西眉县人, 理学硕士, 讲师, 主要从事微生物酶工程研究。Email: wangjianfeng68@126.com

virid 能产生纤维素酶、几丁质酶、木聚糖酶等^[2], 这些酶类被广泛用于农业、工业和环境保护等领域。

棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 是国内发现的新记录种^[3], 在固态发酵条件下可以产生纤维素酶、木聚糖酶^[4]; 对镰刀赤霉病^[5]、疫霉病^[6] 等植物病害具有显著的拮抗作用, 国外已进入了商业化开发利用阶段; 实验室从低阶煤炭中分离到一株木霉菌 W03, 依据菌体形态和分子特征鉴定为棘孢木霉 *Trichoderma asperellum*, 实验发现菌株 *Trichoderma asperellum* W03 的发酵液具有漆酶活性并能氧化 I¹ 为碘单质, 同时还具有纤维素酶、木聚糖酶和几丁质酶等 β -糖苷水解酶活性。文中对液态发酵棘孢木霉产纤维素酶、木聚糖酶和几丁质酶等 β -糖苷水解酶的产酶特征和酶的部分酶学性质进行了实验研究, 为棘孢木霉生防机制的理解和菌株的开发利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种

棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* W03 由作者所在实验室分离自低阶煤炭并保藏。

1.2 培养基

菌种保藏及种子培养基: PDA; 基础产酶培养基(g/L): 土豆 200、米糠 10、(NH₄)₂SO₄ 2.0、KH₂PO₄ 2.0、MgSO₄·7H₂O 1.0、pH 值 6.5。

1.3 菌株产酶的液态发酵

将 PDA 平板表面刮取的孢子用无菌玻璃珠打散、无菌水稀释至 10⁷ 个/mL, 接种于装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 33 °C、180 r/min 震荡培养, 每种培养条件进行 3 次平行重复。

1.4 酶活力测定

DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定酶活: 取 0.5 mL 酶液、1 mL 含 0.5% 底物(分别为羧甲基纤维素钠 CMC、玉米木聚糖、胶体几丁质)的柠檬酸磷酸氢二钠缓冲液(100 mmol/L、pH 值 4.5), 混匀后 45 °C 水浴反应 60 min。加 1 mL DNS 终止反应, 混匀后沸水浴 4 min、流水速冷、加适量水稀释混匀后在 490 nm 处比色。一个酶活单位(U)定义为 1 min 产生 1 μ g 还原糖所需酶量。

1.5 酶的初步纯化

经尼龙丝网过滤的发酵液在 4 °C 下 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液为粗酶液; 粗酶液经超滤(截留相对分子质量 5 000)浓缩至 1/10 体积得酶液, 用于酶学性质分析。

1.6 酶学性质分析

1.6.1 酶促反应最适温度及最适 pH 值 在不同温度或 pH 值下按标准方法测定酶活力, 以酶活力最大时的反应温度(pH)为酶活的最适温度或 pH 值。

1.6.2 酶的热稳定性及 pH 值稳定性 酶液分别在 45、50 和 60 °C 下 pH 值 4.5 的缓冲液中保温不同时间, 按标准方法测定相同条件下的酶活力, 以未保温酶液的酶活为 100%, 测定相应温度下酶活的半衰期; 酶液在不同 pH 的缓冲液中 25 °C 保温 12 h, 按标准方法测定残余酶活, 以未保温酶液的酶活为 100%。

1.7 数据分析

采用统计软件 DPS v3.01 专业版。

2 结果与分析

2.1 棘孢木霉 β -糖苷水解酶的酶学性质

2.1.1 温度对 β -糖苷水解酶活性和稳定性的影响

实验分别以羧甲基纤维素钠、玉米木聚糖、胶体几丁质为底物分析了棘孢木霉 *T. asperellum* W03 木聚糖酶(Xyn)、CMC 酶(Cmc)和几丁质酶(Chi)3 种 β -糖苷水解酶活性的部分酶学性质。温度对 Xyn、Cmc、Chi 3 种酶催化活性的影响(图 1)趋势相似, 反应温度在 45~65 °C 时, Xyn、Chi 活性变化趋势几近相同; Xyn、Cmc 的最适反应温度均为 45 °C, 而 Chi 的最适反应温度为 40 °C。Xyn、Cmc、Chi 3 种酶在 45 °C 保温 60 min(图 2-4), 酶活几乎没有损失; 酶液在 50 °C 保温 60 min(图 2-4), Xyn 和 Chi 具有良好的热稳定性, Xyn 优于 Chi, Cmc 热稳定性较差、半衰期约 40 min; Xyn 在 60 °C 热稳定性优于 Chi, 半衰期约 30 min。Xyn 相对于 Cmc、Chi 具有较好的热稳定性。

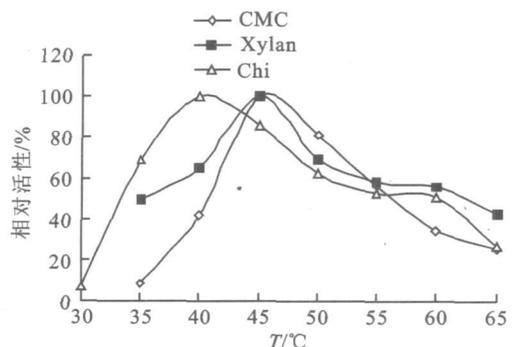


图 1 温度对酶促反应活性的影响

Fig. 1 Effect of temperature on laccase activity

2.1.2 pH 值对 β -糖苷水解酶活性和稳定性的影响 实验表明(图 5), Xyn、Cmc 和 Chi 的最适反应 pH 值都为 4.5; Xyn 和 Cmc 活性随 pH 值变化的

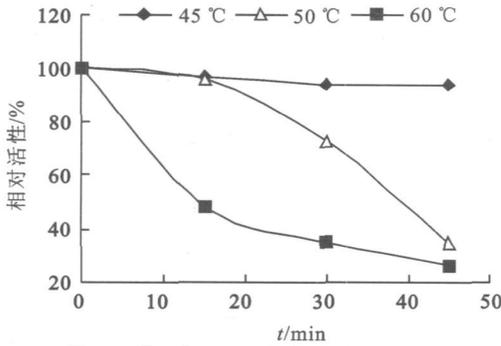


图 2 温度对 CMC 酶稳定性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on CMC enzyme stability

趋势相同, pH 值大于 4.5 时, 酶活性快速下降, 而 Chi 的活性却缓慢下降; pH 值显著影响 Xyn 和 Cmc 的稳定性, 两者均在 pH 值 2.5~5.0 的酸性条件下较稳定, 有利于在酸性环境中的应用。

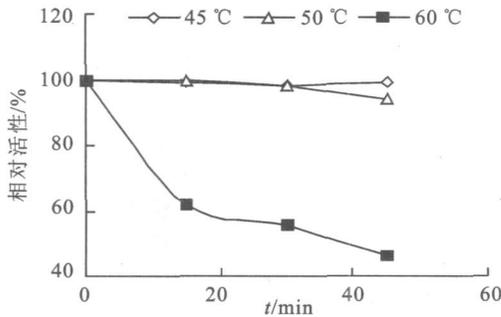


图 3 温度对 Xyn 稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on xylanase stability

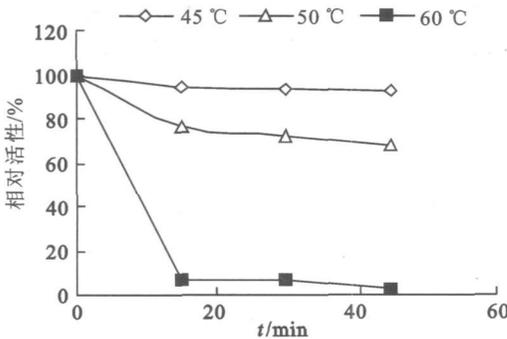


图 4 温度对 Chi 稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on chitinase stability

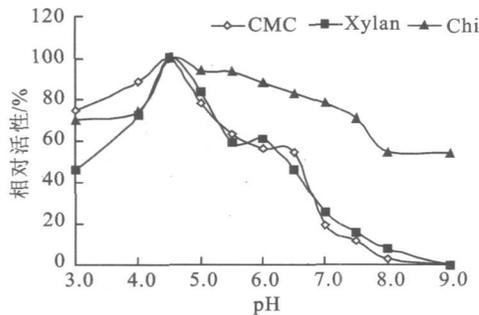


图 5 pH 对酶促反应活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on β glycoside hydrolase

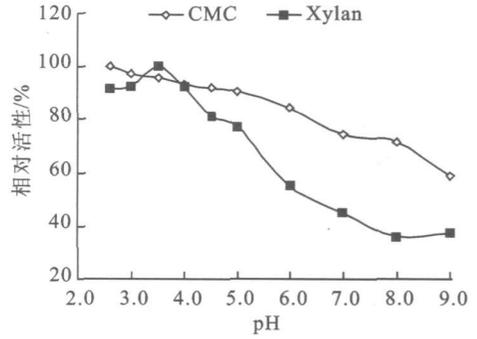


图 6 pH 对酶促反应活性及酶稳定性的影响

Fig. 6 Effect of pH on stability of both xylanase and CMC enzyme

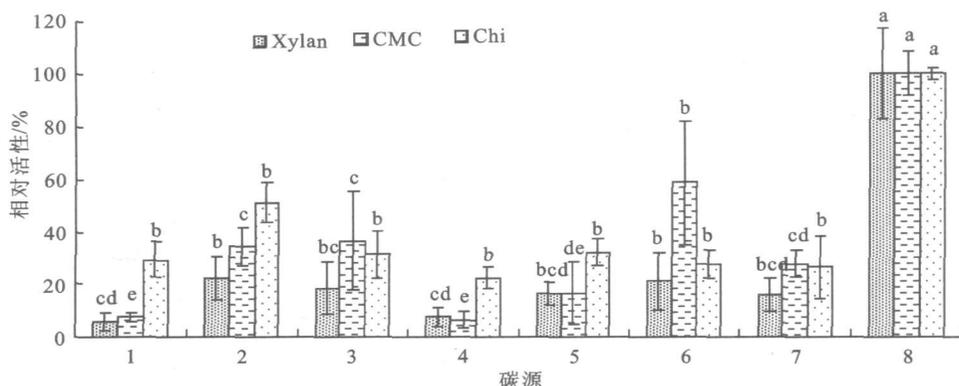
2.2 棘孢木霉产 β 糖苷水解酶的产酶特性

2.2.1 碳源对棘孢木霉产酶的影响 分别以蔗渣 (10 g/L)、乳糖 (10 g/L)、羧甲基纤维素 (2 g/L)、粗木聚糖 (4 g/L)、米糠 (10 g/L)、葡萄糖 (5 g/L)、蔗渣 (10 g/L)、葡萄糖 (5 g/L)、羧甲基纤维素钠 (2 g/L)、葡萄糖 (5 g/L) 替代基础产酶培养基中的米糠作碳源, 考察不同碳源对 *T. asperellum* W03 产 Xyn、Cmc 和 Chi 的影响。结果显示 (图 7), Xyn、Cmc 和 Chi 的酶活产量受不同碳源的影响趋势相同, 所加碳源均为有效碳源, 含 β 糖苷键的乳糖也能有效促进菌体产酶, 羧甲基纤维素钠 (2 g/L) 葡萄糖 (5 g/L) 复合碳源是菌体产酶的最适碳源; 当羧甲基纤维素钠中添加葡萄糖时, 能明显促进菌体产 Xyn、Cmc 和 Chi, 米糠中补加葡萄糖, 能明显促进菌体产 Xyn 和 Cmc, 而对 Chi 的产生无明显影响; 蔗渣中添加葡萄糖对菌体产酶无明显影响; 胶体几丁质对菌体产 Chi 酶活性的影响实验 (结果未列) 表明, 以胶体几丁质为唯一碳源, 菌体不能生长, 补加葡萄糖后菌体产 Chi 的活性与以羧甲基纤维素钠 (2 g/L) 葡萄糖 (5 g/L) 作碳源无显著性差异; 因而, 菌体产 β 糖苷水解酶以菌体的生长为前提, 所产 Xyn、Cmc 和 Chi 对诱导物的专一性不高, 几丁质、CMC、乳糖均能有效诱导上述 3 种 β 糖苷水解酶的产生, 其中 CMC 的效果优于其他诱导物。

2.2.2 氮源对棘孢木霉产酶的影响 以羧甲基纤维素钠 (2 g/L) 葡萄糖 (5 g/L) 作碳源, 分别以 NH_4NO_3 (2 g/L)、 KNO_3 (2 g/L)、蛋白胨 (2 g/L)、酵母粉 (2 g/L)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L) 蛋白胨 (1 g/L)、 KNO_3 (1 g/L) 蛋白胨 (1 g/L) 为氮源替代基础产酶培养基中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L) 实验分析不同氮源对产酶的影响。结果 (图 8) 表明, Xyn、Cmc 和 Chi 的酶活产量对不同氮源的响应趋势相近, Xyn 和 Cmc 的响应趋势相同, 硝态氮、有机氮相对于铵态氮均有利于 3 种 β 糖苷水解酶的产生; KNO_3 和蛋

白脉对 Cmc 的产生具有正协同效应,对 Xyn 的产生无正协同效应,对 Chi 的产生与 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2$

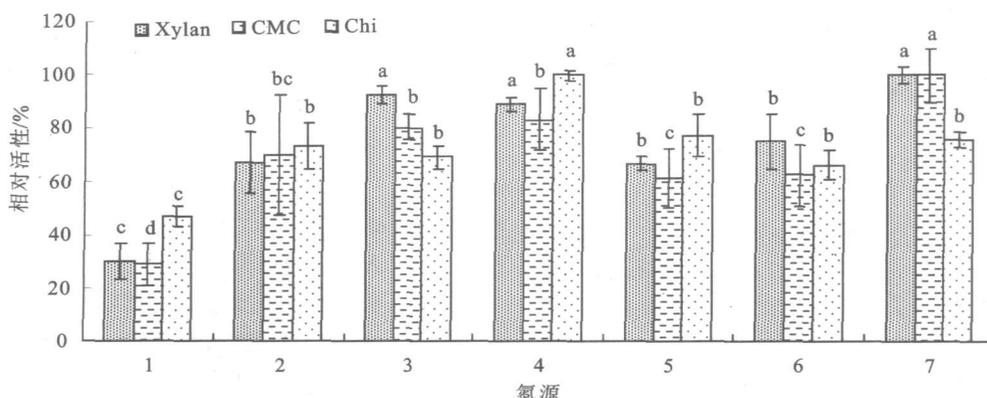
SO_4 和 NH_4NO_3 无显著性差异而劣于蛋白脉。



成分(g/L): 1. 米糠 10、2. 蔗渣 10、3. 乳糖 10、4. 羧甲基纤维素 2、5. 粗木聚糖(4)、6. 米糠 10、葡萄糖 5、7. 蔗渣 10、葡萄糖 5、8. 羧甲基纤维素钠 2、葡萄糖 5、SSR($\alpha=0.05$)

图7 碳源对 *T. asperellum* W03 产酶的影响

Fig. 7 Effect of carbon source on productivity of β glycoside hydrolase from *T. asperellum* W03



成分(g/L): 1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2、2. NH_4NO_3 2、3. KNO_3 2、4. 蛋白脉 2、5. 酵母粉 2、6. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1、蛋白脉 1、7. KNO_3 1、蛋白脉 1 g/L SSR($\alpha=0.05$)

图8 氮源对 *T. asperellum* W03 产酶的影响

Fig. 8 Effect of nitrogen source on productivity of β glycoside hydrolase from *T. asperellum* W03

2.2.3 无机盐、pH 对棘孢木霉产酶的影响 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验分析了 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 CaCl_2 和培养基起始 pH 对 *T. asperellum* W03 产 Xyn、Cmc 和 Chi 酶活性的影响(表 1), 正交试验的方差分析结果(表 2)表明, 各实验因素均极显著($\alpha < 0.01$)地影响 Xyn、Cmc 和 Chi 酶活的产生; 影响因素的重要性次序分别如下, Xyn: $\text{CaCl}_2 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{pH}$; Cmc: $\text{CaCl}_2 > \text{pH} > \text{MgSO}_4 > \text{KH}_2\text{PO}_4$; Chi: $\text{MgSO}_4 > \text{CaCl}_2 > \text{pH} > \text{KH}_2\text{PO}_4$ 。从影响因素各水平间差异显著性 SSR($\alpha = 0.05$) 检验结果(表 3)可知, Xyn、Cmc 和 Chi 对影响因素各水平的响应趋势相同, 随培养基中 KH_2PO_4 、 MgSO_4 和 CaCl_2 浓度的增大, Xyn、Cmc 和 Chi 的酶活力逐渐降低, 所

以低浓度的无机盐有利于产酶活力的提高; 培养基中添加无机盐(g/L): KH_2PO_4 1.0、 MgSO_4 0.5、pH 6.0 时, 3 种 β 糖苷水解酶的活力均达到最高(表 1); 综合正交试验优化结果(表 1)及方差分析(表 2、3)可知, 同样无机盐浓度下, pH 8.0 有可能产酶量更高, 但验证实验(结果未列)显示, 起始 pH 6.0 更有利于产酶活力的提高, 这可能与酶在较高 pH 条件下稳定性差有关。

综合上述各因素对 *T. asperellum* W03 液体发酵产酶的影响, 初步优化的产酶培养基为(g/L): 土豆 200、羧甲基纤维素钠 2.0、葡萄糖 5.0、 KNO_3 1.0、蛋白脉 1.0、 KH_2PO_4 1.0、 MgSO_4 0.5、pH 6.0。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果

Tab. 1 Orthogonal experimental design $L_9(3^4)$

处理	KH_2PO_4 / (g/L)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ / (g/L)	$CaCl_2$ / (g/L)	pH	木聚糖酶/ (u/mL) SSR ($\alpha = 0.05$)	羧甲基纤维素 酶/ (u/mL) SSR ($\alpha = 0.05$)	几丁质酶/ (u/mL) SSR ($\alpha = 0.05$)
1	1.0	0.5	0.0	6.0	(65.8 ± 13.43) ^a	(44.64 ± 19.19) ^a	(23.0 ± 5.15) ^a
2	1.0	1.0	0.5	7.0	(34.1 ± 7.25) ^c	(11.93 ± 5.48) ^c	(11.0 ± 2.17) ^{cd}
3	1.0	1.5	1.0	8.0	(26.4 ± 4.68) ^c	(6.87 ± 4.05) ^{cd}	(3.7 ± 2.10) ^e
4	2.0	0.5	0.5	8.0	(49.9 ± 5.10) ^b	(27.33 ± 14.71) ^b	(20.2 ± 4.80) ^{ab}
5	2.0	1.0	1.0	6.0	(12.6 ± 10.42) ^d	(7.19 ± 1.89) ^{cd}	(4.5 ± 4.13) ^{de}
6	2.0	1.5	0.0	7.0	(29.6 ± 12.50) ^c	(21.52 ± 3.66) ^b	(7.1 ± 6.78) ^{de}
7	3.0	0.5	1.0	7.0	(4.5 ± 4.51) ^e	(6.07 ± 4.97) ^{cd}	(8.2 ± 3.87) ^{de}
8	3.0	1.0	0.0	8.0	(47.9 ± 2.09) ^b	(29.07 ± 8.47) ^b	(15.7 ± 5.45) ^{bc}
9	3.0	1.5	0.5	6.0	(2.6 ± 1.16) ^e	(1.94 ± 1.02) ^d	(4.1 ± 2.30) ^e

表 2 $L_9(3^4)$ 方差分析结果

Tab. 2 Variance analysis of orthogonal experimental design $L_9(3^4)$

变异来源	木聚糖酶		羧甲基纤维素酶		几丁质酶	
	F 值	显著性水平	F 值	显著性水平	F 值	显著性水平
KH_2PO_4	59.929 46	0	6.697 37	0.002 15	3.780 68	0.027 46
$MgSO_4$	45.225 21	0	21.042 29	0	52.662 89	0
$CaCl_2$	118.525 35	0	54.346 95	0	34.851 78	0
pH	40.608 91	0	5.172 62	0.007 96	7.047 73	0.001 60

表 3 影响因素各水平间差异显著性 SSR($\alpha = 0.05$)

Tab. 3 Significance test of difference among levels of influencing factors: SSR($\alpha = 0.05$)

因素	水平	木聚糖酶/ (u/mL)	羧甲基纤维素 酶/ (u/mL)	几丁质 酶/ (u/mL)
KH_2PO_4	1.0	42.08 ^a	21.15 ^a	12.57 ^a
	2.0	30.70 ^b	18.68 ^a	10.61 ^{ab}
	3.0	18.34 ^c	12.36 ^b	9.33 ^b
$MgSO_4$	0.5	40.06 ^a	26.01 ^a	17.15 ^a
	1.0	31.53 ^b	16.06 ^b	10.38 ^b
	1.5	19.53 ^c	10.11 ^c	4.98 ^c
$CaCl_2$	0.0	47.77 ^a	31.74 ^a	15.26 ^a
	0.5	28.86 ^b	13.74 ^b	11.78 ^b
	1.5	14.49 ^c	6.71 ^c	5.47 ^c
pH	8.0	41.39 ^a	21.09 ^a	13.21 ^a
	6.0	26.97 ^b	17.93 ^{ab}	10.51 ^{ab}
	7.0	22.76 ^b	13.17 ^b	8.79 ^b

2.3 棘孢木霉产酶的时间历程

利用优化培养基实验分析了 *T. asperellum* W03 的产酶过程。结果(图 9)显示, Xyn、Cmc 和 Chi 的酶活产量随发酵时间的变化趋势几乎相同, 均与菌体的生长相偶联, 菌体生长越快产酶越多,

停止生长时酶活产量随之下降, 产酶高峰都出现在接种培养 72 h; 产酶活力在发酵 72 h 后有较大幅度下降, 除了菌体生长停滞外, 还可能受发酵液 pH 的升高影响, Xyn、Cmc 和 Chi 在 pH > 7.0 时稳定性较差; 还原糖通过影响菌体的生长速率而影响产酶, 在菌体的快速生长期, 还原糖的消耗速率越大, 产酶量越大, 而还原糖的浓度对菌体产酶无明显影响; Xyn、Cmc 和 Chi 酶活比例在整个产酶过程中相对恒定, Xyn/Cmc = 1.20, Chi/Cmc = 0.53。

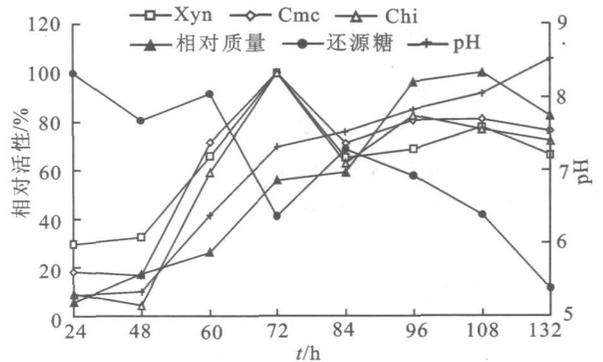


图 9 优化产酶培养基上 *T. asperellum* W03 的产酶时间历程

Fig. 9 Time history of production of β -glycoside hydrolase from *T. asperellum* W03 on optimized medium

3 结 语

木霉 *Trichoderma* spp 作为生防菌株被广泛应用于农作物土传致病真菌的控制,其生化机理的研究集中在木霉对细胞壁的酶解活性及抗真菌抗生素的产生能力^[1], *Trichoderma asperellum* 对植物病害具有显著的生防作用,分离自低阶煤炭样品的 *Trichoderma asperellum* W03 在液态培养条件下能同时分泌合成木聚糖酶 Xyn、羧甲基纤维素酶 Cmc 和几丁质酶 Chi,这 3 种 β 糖苷水解酶的合成对碳源、氮源、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、pH 和发酵时间等培养因素的响应趋势基本相同, Xyn、Cmc 和 Chi 酶活比例在整个产酶过程中相对恒定,3 种酶的酶活对反应 pH、温度变化的响应亦相似。1 种可

能情况是 *T. asperellum* W03 分泌产生了同 1 种酶蛋白,该酶蛋白具有 3 种 β 糖苷水解酶活性即木聚糖酶、羧甲基纤维素酶和几丁质酶,其他菌株也能产生具有交叉活性的木质纤维素水解酶,如 *Clostridium acetobutylicum*^[7] 和 *Trichoderma viride*^[8] 产生的木聚糖酶兼有 CMC 酶活性,但未见到同时兼有几丁质酶活性的报道。它们相近的酶学性质类似于 *Trichoderma reesei* 木聚糖酶^[9],最适反应 pH 4.5 并且在酸性条件下酶活稳定,最适反应温度 40℃-45℃。该菌株在同一生长过程中同时产生了 3 种 β 糖苷水解酶活性,这为理解 *Trichoderma asperellum* 的生防机理提供了参考,另外,在提高饲料中木质纤维素的降解率方面,该菌株具有潜在的应用价值。

参考文献(References):

- [1] Chanikul Chutrakul, John F. Peberdy. Isolation and characterization of a partial peptide synthetase gene from *Trichoderma asperellum*[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2005, 252 (2): 257- 265.
- [2] 王建荣, 张曼夫, 黄涛. 绿色木霉纤维素酶 CBH II 基因的结构研究[J]. 遗传学报, 1995, 22 (1): 74- 80.
Wang Jiarr rong, Zhang Man fu, Huang Tao. Structural analysis of the gene coding for cellobiohydrazase II of *Trichoderma viride*[J]. **Acta Genetica Sinica**, 1995, 22 (1): 74- 80. (in Chinese)
- [3] 章初龙 徐同. 我国河北、浙江、云南及西藏木霉种记述[J]. 菌物学报, 2005, 24(2): 184- 192.
Zhang Chur long, Xu Tong. Records of trichoderma species from Hebei, Zhejiang, Yunan and Tibet of China[J]. **Mycosys tema**, 2005, 24 (2): 184- 192. (in Chinese)
- [4] 袁宏伟, 黄俊生. 产木聚糖酶菌株 JF8 的鉴定及固态发酵条件研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27 (5): 2086- 2090.
Yuan Hong wei, HUANG Jur sheng. Identification and solid fermentation conditions of high xylanase producing strain JF8[J]. **Journal of Agro Environment Science**, 2008, 27 (5): 2086- 2090. (in Chinese)
- [5] Kolombet L, Zhigletsova S, Kosareva N, et al. Development of an extended shelf life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum*[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2008, 24 (1): 123- 131.
- [6] Deberdt P, Mfegue CV, Tondje PR, et al. Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon[J]. **Biological Control**, 2008, 44 (2): 149- 159.
- [7] Lee SF, Forsberg CW, Rattray JB. Purification and endo xylanases from *Clostridium acetobutylicum* AT CC824[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1987, 53: 644- 650.
- [8] Shikata S, Nisizawa K. Purification and properties of an exo cellulase component of novel type from *Trichoderma viride* [J]. **The Journal of Biochemistry**, 1975, 78 (3): 499- 512.
- [9] 周晨妍, 邬敏辰. 木聚糖酶的酶学特性与分子生物学[J]. 生物技术, 2005, 15 (3): 89- 92.
ZHOU Cheng yan, WU Mir chen. Property and molecular biology of xylanase[J]. **Biotechnology**, 2005, 15 (3): 89- 92. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)