

黑曲霉原生质体诱变选育 β -葡萄糖苷酶高产菌株

王春丽^{1,2}, 武改红², 陈畅¹, 陈树林²

1 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要: 本研究报道了以原生质体诱变技术选育高产 β -葡萄糖苷酶的黑曲霉菌株, 并研究了其发酵特性。以黑曲霉 CGMCC 3.316 为出发菌株, 通过紫外诱变得得到突变株 3-3M。然后以 3-3M 为供试菌株, 研究了其原生质体制备与再生的条件。最后通过原生质体诱变, 选育得到一株 β -葡萄糖苷酶活力较高的突变株 60B-3D。该菌株具有良好的遗传稳定性, 酶活力平均达到 23 IU/mL, 与出发菌株 CGMCC 3.316 相比提高 39%。此外, 该菌株的木聚糖酶活力也有所增加。同时考察了黑曲霉 60B-3D 的发酵特性, 并与 3-3M 和出发菌株进行比较, 结果表明该菌株有较高的蛋白分泌能力。本研究为发酵生产 β -葡萄糖苷酶提供了一株良好的供试菌株。

关键词: 黑曲霉, 原生质体诱变, β -葡萄糖苷酶, 选育, 木聚糖酶

Protoplast mutagenesis for improving β -glucosidase production of *Aspergillus niger*

Chunli Wang^{1,2}, Gaihong Wu², Chang Chen¹, and Shulin Chen²

1 Department of Bioscience and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: The aims of this research were to isolate a *Aspergillus niger* strain with higher β -glucosidase activity. We utilized the β -glucosidase producing strain *Aspergillus niger* CGMCC 3.316 as the original strain to first obtain a mutant 3-3M through ultraviolet irradiation. Then we studied the conditions of protoplast release and regeneration for strain 3-3M. We treated the protoplasts of strain 3-3M via ultraviolet irradiation and obtained another isolated mutant 60B-3D. The strain 60B-3D showed much higher β -glucosidase production than the original strain and 3-3M strain. The β -glucosidase activity of strain 60B-3D was 23.4 IU/mL, with an improvement of 39% compared with the original strain, and 23% compared with strain 3-3M. We also studied the fermentation process of strain 60B-3D, and compared it with the original strain and strain 3-3M. We found the strain 60B-3D exhibited an improvement in xylanase production. The comparison results also showed that the strain 60B-3D secreted more protein. These results were beneficial for producing β -glucosidase through this productive mutant.

Keywords: *Aspergillus niger*, protoplast mutation breeding, β -glucosidase, screening, xylanase

纤维素是植物光合作用的产物, 是地球上最为丰富的可再生资源, 占地球总生物量的 40%左右^[1]。随着能源危机的不断加剧, 人们纷纷把目标转向生物物质能, 即利用纤维素等生物质转化生产生物能

Received: September 24, 2009; **Accepted:** November 17, 2009

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB714304), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program)(No. 2009AA03Z221).

Corresponding author: Shulin Chen. Tel: +86-10-64807798; Fax: +86-10-64807798; E-mail: chens@wsu.edu

国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2007CB714304), 国家高技术研究发展计划 (863 计划)(No. 2009AA03Z221)资助。

源。纤维素可被纤维素酶降解生成葡萄糖。作为纤维素酶组分之一的 β -葡萄糖苷酶可把纤维二糖降解成便于微生物利用的葡萄糖,从而有效地去除纤维二糖对内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶的抑制作用而使纤维素的降解效率提高^[2]。此外,该酶是参与槐糖生成的关键酶,而槐糖是纤维素酶的诱导物^[3],因此,该酶的存在可显著提高纤维素的降解率。

β -葡萄糖苷酶除了被应用于降解纤维素,在其他很多方面也应用广泛,涉及到工农医药各个领域。如利用该酶对糖苷化合物等风味前体物质的作用将其应用于食品增香,如茶叶、果汁和酒类加工等。 β -葡萄糖苷酶在癌症的诊断和治疗中也有很大的应用^[4]。

因此,国内外有很多研究工作都集中于 β -葡萄糖苷酶产酶菌株的诱变选育^[5]。随着原生质体技术的出现,原生质体诱变被广泛应用于菌株的选育。原生质体是脱除了细胞壁的细胞,具有细胞全能性及很强的细胞壁再生能力,是很理想的诱变材料。

原生质体诱变与传统诱变相比,避免了因多次使用同一理化诱变因子而产生的诱变钝性^[6],且去除了细胞壁保护的原生质体对诱变剂更为敏感。此外,该技术操作成本低,利于工业上进行菌株选育等。利用原生质体诱变技术选育高 β -葡萄糖苷酶分泌能力的黑曲霉的菌株仅有很少量的报道^[7-8]。最早的报道在20世纪80年代中期,曹军卫等^[7]以紫外线对黑曲霉原生质体进行诱变,使其 β -葡萄糖苷酶活力提高了18.2%。近几年,李平等^[8]采用原生质体技术,对产 β -葡萄糖苷酶的黑曲霉菌株原生质体直接进行诱变,在较短时间内较大幅度地提高菌株的生产能力。但是,所得菌株产 β -葡萄糖苷酶活力仍较低。

本研究利用黑曲霉的紫外诱变菌株制备原生质体,再对其原生质体进行紫外诱变,取得了很好的诱变效果,所得诱变菌株60B-3D的 β -葡萄糖苷酶活力提高明显,达到23.4 IU/mL。已报道的较高水平产酶菌株的发酵水平如下:张玲^[9]的无花果曲霉诱变菌株在条件优化前,酶活力为20.48 IU/mL;刘敏等^[10]利用黑曲霉NL02发酵其酶活力为19.12 IU/mL;沈加成等^[11]通过对其 N^+ 注入得到的诱变菌NIP35发

酵其产酶能力最高达到16.24 IU/mL。本研究所得原生质体诱变菌株产酶能力处于较优水平,而且木聚糖酶活力也有所增加。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 菌株

黑曲霉 CGMCC 3.316, 购于中国科学院微生物研究所普通菌种保藏中心。

1.1.2 培养基

菌丝生长培养基: PDA 固体平板; PDA 液体培养基。再生培养基: 即高渗查氏培养基(%), NaNO_3 0.3, K_2HPO_4 0.1, KCl 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, 蔗糖 3, 琼脂 0.8, NaCl 0.6 mol/L。筛选平板(g/L): 微晶纤维素 8, 蛋白胨 3, KH_2PO_4 1, 酵母粉 0.5, Triton X-100 0.001, 琼脂 25, 以50 g/L 麸皮汁配制。发酵产酶培养基(g/L): 玉米芯 50, 麸皮 30, 酵母粉 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.8, KH_2PO_4 4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9, CaCl_2 0.9, 调节 pH 为 5.0。

1.1.3 主要试剂

制备原生质体用试剂: 纤维素酶(北京拜尔迪生物技术有限公司), 蜗牛酶(北京拜尔迪生物技术有限公司), 渗透压稳定剂为 0.6 mol/L 的 NH_4Cl , 缓冲液为 0.1 mol/L、pH 6.0 柠檬酸缓冲液。酶溶液以前述缓冲液配制。

测定酶活力所用试剂: 纤维二糖(国药集团化学试剂有限公司)、pH 4.8 的柠檬酸缓冲液。

1.1.4 其他实验材料

紫外诱变光源, 红光灯, 玻璃纸, 遮光布。

1.1.5 主要实验仪器

SBA-40C 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所), TCL-16G 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂), CH-2 型光学显微镜(奥林巴斯), 数码照相机(佳能), 水浴锅, 振荡器: WH-2 微型旋涡混合仪(上海博讯实业有限公司医疗设备厂), 摇床 DZ-900 回转振荡器(江苏太仓实验仪器厂), S-1 型磁力搅拌器(北京金紫光科技发展有限公司)。

1.2 酶活计算方法

β -葡萄糖苷酶活力的测定方法参照文献[12]。测

定所用底物为纤维二糖, 一个酶活力单位规定为 1 min 内转化 1 μmol 纤维二糖所需的酶量。

木聚糖酶的测定方法参考文献[13]。

1.3 实验方法

1.3.1 黑曲霉孢子紫外诱变株的获得

对从 PDA 斜面上冲洗得到的孢子悬液进行紫外诱变, 分别选取 3 min、5 min、7 min 作为诱变时间, 涂布于筛选平板, 通过透明圈大小初筛。

1.3.2 黑曲霉 3-3M 原生质体的制备及再生

菌丝体的培养和收集: 将 3-3M 的孢子涂布于带有玻璃纸的 PDA 平板上。24 h 后收集玻璃纸上的菌丝, 接种于液体培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后离心收集。

酶解体系的确定: 通过预实验得知, 纤维素酶和蜗牛酶对黑曲霉原生质体释放作用效果较好。采用正交试验法, 考察纤维素酶、蜗牛酶浓度和酶解温度对原生质体释放的影响。酶液按照 $W_{\text{mycelium}}/V_{\text{enzyme solution}}=1:10(\text{g/mL})$ 加入。

原生质体的再生: 将释放的原生质体经两次离心洗涤后, 重悬于高渗缓冲液中, 采用倾倒法再生。原生质体的再生率按照如下公式进行计算:

$$\text{再生率} = \frac{\text{再生平板菌落数} - \text{对照平板菌落数}}{\text{原生质体数}}$$

1.3.3 菌株 3-3M 原生质体的释放过程观察

通过正交实验确定的最佳酶配比体系制备酶解溶液, 并向其中加入 0.2% 半胱氨酸作为脱壁促进剂^[14]。将酶液加入菌丝, 显微镜观察原生质体的释放过程。

1.3.4 黑曲霉原生质体的紫外诱变

将悬浮于高渗缓冲液中的 3-3M 原生质体于紫外灯下进行诱变。分别在 0 s、30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s、210 s、240 s、270 s、300 s 各时间点取样, 将取样得到的原生质体稀释至适当浓度并于高渗查氏培养基中再生培养, 同时以水悬浮原生质体作再生对照。

1.3.5 黑曲霉液态发酵条件

黑曲霉发酵方式为液体发酵。刮取一环斜面孢子接种于 250 mL 发酵摇瓶中, 摇瓶装液量为 50 mL。于 28 $^{\circ}\text{C}$ ~29 $^{\circ}\text{C}$, 170 r/min 条件下培养 180~185 h。离心收集上清液进行相关参数测定。

1.3.6 诱变菌株和出发菌株 CGMCC 3.316 的发酵产酶过程比较

将原生质体诱变菌株 60B-3D、紫外诱变菌株 3-3M 和出发菌株分别接种于发酵培养基, 从 60 h 开始, 每 24 h 取样一次, 监测菌株发酵过程中产酶及蛋白和 pH 变化过程。

2 实验结果与讨论

2.1 黑曲霉 3-3M 的获得

对黑曲霉的孢子紫外诱变后, 经过透明圈平板初筛和复筛后得到一株酶活力为 19.4 IU/mL、比出发菌株提高 15% 的菌株 3-3M, 该菌株是在紫外照射时间为 3 min 时所得的突变体, 此时的致死率为 95%。

2.2 原生质体酶解体系的确定

根据 1.3.2 中所设计的正交表(表1), 所得实验结果及分析结果如表 2 所示。

通过极差分析, 在菌株 3-3M 原生质体释放过程中蜗牛酶的浓度影响极其显著, 其最佳浓度为 5 mg/mL。相比较于蜗牛酶, 纤维素酶的浓度和酶解

表 1 酶解体系正交实验因素水平表

Table 1 Orthogonal table of enzyme system

Levels	Snailase (mg/mL)	Cellulase (mg/mL)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Blank
1	0	0	30	
2	5	5	32	
3	10	10	34	

表 2 酶体系配比正交实验分析结果

Table 2 Results of orthogonal design for enzyme system

	Snailase (mg/mL)	Cellulase (mg/mL)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Blank	Number ($10^6/\text{mL}$)
1	0	0	30		0.00
2	0	5	32		0.03
3	0	10	34		0.25
4	5	0	32		2.00
5	5	5	34		1.45
6	5	10	30		1.20
7	10	0	34		0.90
8	10	5	30		1.50
9	10	10	32		1.00
k1	0.093	0.967	0.900	0.817	
k2	1.550	0.993	1.010	0.710	
k3	1.133	0.817	0.867	1.250	
R	1.457	0.176	0.143	0.540	

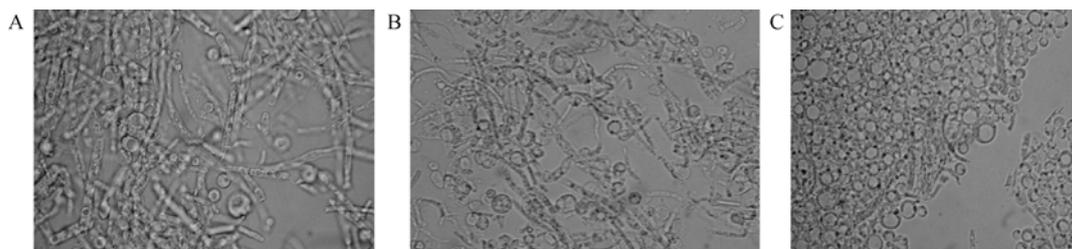


图 1 菌株 3-3M 原生质体释放过程
Fig. 1 Release of protoplasts from the mutant 3-3M.

温度对原生质体释放影响不大。但据报道^[15]，霉菌细胞壁由纤维素和几丁质等组成，因此在酶解体系中加入 5 mg/mL 的纤维素酶。由此确定最佳的酶解体系为 5 mg/mL 蜗牛酶与 5 mg/mL 纤维素酶，于 32°C、150 r/min 摇床上进行酶解。

2.3 原生质体的释放

将酶溶液加入菌丝，经过一段时间的酶解反应后，在显微镜下观察原生质体释放过程。酶解 2 h 后，已经有少量原生质体释放，可看到菌丝粗壮且几乎未被破坏，内部有成串的原生质体，即发生了顶端释放，如图 1A 所示。在酶解 3 h 后，如图 1B 所示，可观察到已经有较多原生质体释放，且原生质体体积较大，但是菌丝仍然细长。酶解 4 h 后，有大量原生质体释放，且原生质体位于许多碎菌丝之间，这与文献中报道的原位释放的方式相一致。如图 1C 所示，体系中已经无太长的菌丝，原生质体释放得比较完全。所以，用上述酶解体系对 3-3M 菌丝细胞壁处理 4 h 便可取得良好的效果。

2.4 原生质体的再生

利用半固体倾倒入法再生菌株 3-3M 的原生质体，其再生率可达 90%，这明显高于一般文献报道的原生质体 30%~40%的再生率。

2.5 原生质体的紫外诱变

紫外诱变原生质体的致死情况如图 2 所示。随着紫外诱变时间的延长，原生质体致死率迅速增加，再生率逐渐降低，未经诱变的原生质体再生率可达到 90%左右。当紫外照射时间为 30 s 时，致死率为 34.8%，当达到 60 s 时，致死率迅速增加到 82.6%，达到 120 s 时，原生质体致死率已经接近 100%，原生质体全部致死则出现在 240 s 以后。3-3M 原生质体致死率在 30 s 到 60 s 的照射时间段内迅速增加，说明此阶段紫外线对其影响最大。

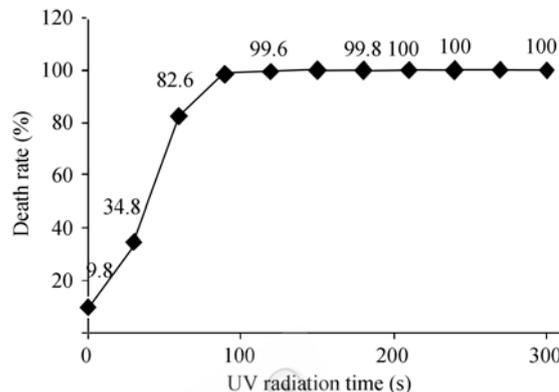


图 2 不同诱变时间原生质体致死率
Fig. 2 Death rate of protoplasts under different mutation time.

2.6 原生质体紫外诱变株的筛选结果

从再生培养平板的单菌落中挑取 37 株诱变株，转接在 PDA 斜面进行培养，3 d 后接入摇瓶培养基进行发酵培养。初筛挑选出了 4 株酶活提高比例较大的菌株 60B-3A、60B-3D、90B-2B 和 90B-2G，对此 4 株菌进行传代培养以验证其遗传稳定性，结果如表 3 所示。

经过 10 代连续培养后，得到了两株 β-葡萄糖苷酶活力提高且活性稳定的菌株 60B-3D 和 60B-3A，其酶活力分别稳定在 23.4 IU/mL 和 21.1 IU/mL。其中，菌株 60B-3D 酶活力提高明显，与出发菌株的 16.8 IU/mL

表 3 传代稳定性验证结果

Table 3 Verification of the mutation strains

Generations	Original strain (IU/mL)	3-3M (IU/mL)	60B-3A (IU/mL)	60B-3D (IU/mL)	90B-2B (IU/mL)	90B-2G (IU/mL)
1	16.62	19.87	21.32	26.37	23.76	22.74
2	17.16	19.58	22.62	22.84	21.26	-
3	16.94	19.51	19.35	22.41	18.99	-
4	16.91	19.10	21.90	23.49	19.28	-
.....						-
10	16.75	18.97	21.14	23.37	19.05	-

The original strain was *Aspergillus niger* 3.316; 3-3M was got from UV mutation; “-” means that the enzyme activities were lower than the original strain.

相比, 提高了约 39%, 比菌株 3-3M 提高 23%。

2.7 诱变菌株与出发菌株的发酵特性比较

通过对原生质体诱变菌株 60B-3D、紫外诱变菌株 3-3M 和出发菌株的产酶过程、pH 变化过程以及发酵过程中蛋白量的变化过程进行监测, 比较了 3 株菌的发酵特性。由图 3、4、5、6 可知在发酵初期 (0~60 h), 3 株菌的 β -葡萄糖苷酶和木聚糖酶酶活较低, 蛋白量和 pH 均开始下降, 这是由初期阶段菌体生长较快造成的; 当发酵进行到 84 h 时, 3 株菌的产酶量以及蛋白量均逐渐增加, 但是诱变菌株的产酶速率较出发菌株快。在 60 h 时出发菌株发酵液中蛋白含量较高, 由此可以看出, 出发菌株利用培养基中的氮源能力不及诱变菌。此后, 培养基中酵母粉利用殆尽, 菌体开始大量分泌酶, 菌株代谢活动旺盛, 这也可以通过由 pH 变化曲线 (图 5) 得到验证, 此阶段为快速产酶期; 108 h 时发酵液的粘度最大, pH 最低, 可见此时菌体正进行剧烈的耗氧呼吸; 108 h 后发酵液粘度逐渐降低, pH 开始回升至发酵结束, 产酶速率逐渐减慢, 此阶段为发酵后期, 即菌体衰亡期。

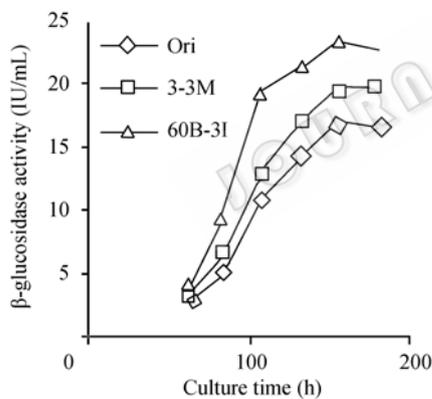


图 3 β -葡萄糖苷酶产酶过程曲线

Fig. 3 Curve of β -glucosidase production.

3 结论与展望

通过对黑曲霉 3.316 紫外诱变, 得到一株酶活提高 15% 的诱变株 3-3M。随后, 利用原生质体诱变技术对 3-3M 进行诱变, 筛选得到一株 β -葡萄糖苷酶活力为 23.4 IU/mL 的诱变株 60B-3D, 其产酶能力比出发菌株提高 39%, 比 3-3M 提高 23%。经验证, 其遗传稳定性良好。同时, 研究了该菌株的发酵特性,

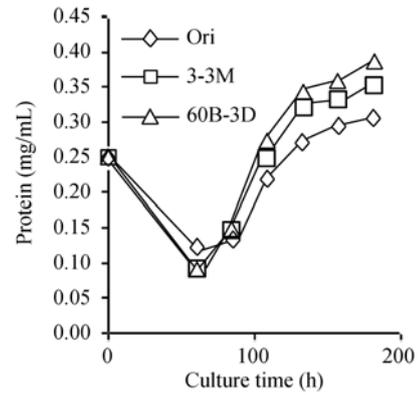


图 4 蛋白含量变化曲线

Fig. 4 Curve of protein concentration.

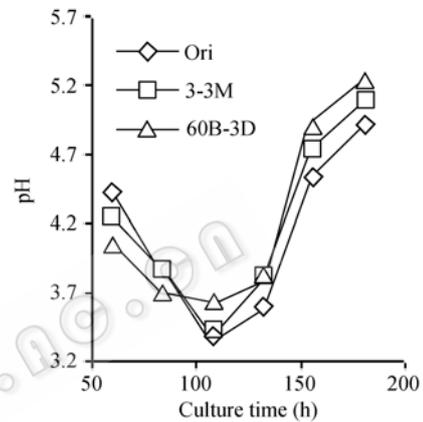


图 5 pH 变化曲线

Fig. 5 Curve of pH.

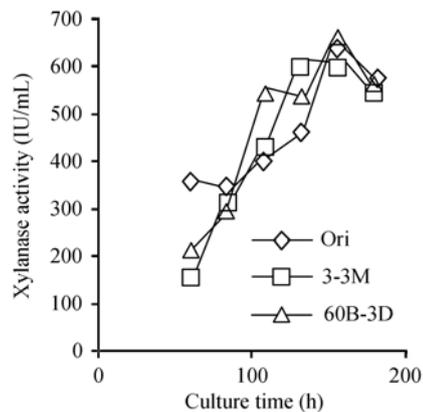


图 6 木聚糖酶产酶过程曲线

Fig. 6 Curve of xylanase production.

并与 3-3M 和出发菌株 CGMCC 3.316 进行比较。由本研究得到的实验结论如下: 黑曲霉 3-3M 原生质体释放的酶解体系为以高渗柠檬酸缓冲液溶解的蜗牛酶和纤维素酶, 其浓度均为 5 mg/mL, 酶解温度为 32°C。且在原生质体释放过程中, 首先是成串的原生质体从菌丝顶端释放出来, 随后菌丝断裂, 原生质

体原位释放, 4 h 左右时原生质体基本释放完毕。3-3M 原生质体再生采用半固体倾倒法, 可得到 90% 的高再生率。

通过对诱变株与出发菌株的发酵特性进行分析, 原生质体诱变株 60B-3D 的优良特性在发酵 60 h 后开始呈现出来, 与出发菌株相比有较强的蛋白分泌能力。该菌株除了在 β -葡萄糖苷酶分泌能力有较大提高外, 其木聚糖酶的分泌能力也有一定幅度的增加, 活力可达到 661 IU/mL, 而出发菌株为 630 IU/mL。

原生质体诱变技术在提高黑曲霉 β -葡萄糖苷酶产量上取得了很好的效果。目前得到的诱变株酶活水平已处于较高水平。预期在经过发酵条件的优化后其产酶能力会有更大幅度的提高。

REFERENCES

- [1] Yan HP, Chen SH, Wu XQ. Review of the study on β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Chin J Cellulose Sci Tech*, 2007, **15**(1): 59-63.
闫会平, 陈士华, 吴兴泉. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的研究进展. *纤维素科学与技术*, 2007, **15**(1): 59-63.
- [2] Brumbauer A, Reczey K. β -glucosidase production of two different *Aspergillus* strains. *Acta Aliment*, 1999, **28**(4): 361-370.
- [3] Bahia A, Ali G. Characterization of a novel β -glucosidase from a *Stachybotrys* strain. *Biochem Eng J*, 2006, **32**(3): 191-197.
- [4] Shao JH, Han JX, Zhu YM, *et al.* Applications of β -glucosidase in the fields of industry, agriculture and medicine. *Chin Chem Life*, 2005, **25**(1): 22-24.
邵金辉, 韩金祥, 朱有名, 等. β -葡萄糖苷酶在工农医领域的应用. *生命的化学*, 2005, **25**(1): 22-24.
- [5] Kovács K, Megyeri L, Szakacs G. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β -glucosidase on pretreated willow. *Enz Microbiol Tech*, 2008, **43**(1): 48-55.
- [6] Li XZ, Yang PP, Wang Y. Development of mutation breeding technology of *Aspergillus niger* protoplast. *Chin Brew*, 2007, (12): 1-5.
李秀珍, 杨平平, 王燕. 黑曲霉原生质体诱变育种技术研究进展. *中国酿造*, 2007, (12): 1-5.
- [7] Cao JW, Chen SX. Ultraviolet mutagenesis of the cellulase producer *Aspergillus niger* using protoplasts. *FEMS Microbiol Lett*, 1988, **50**(1): 1-4.
- [8] Li P, Wan XC, Tao WY, *et al.* Selection of high-yield β -glucosidase producing strain by complex mutagenesis of *Aspergillus niger*. *Mycosystema*, 2000, **19**(1): 117-121.
李平, 宛晓春, 陶文沂, 等. 复合诱变黑曲霉选育 β -葡萄糖苷酶高产菌株. *菌物系统*, 2000, **19**(1): 117-121.
- [9] Zhang L. Study of the production of beta-glucosidase in submerged fermentation. Wuxi: Jiangnan University, 2007: 13-21.
张玲. β -葡萄糖苷酶的液态发酵生产. 无锡: 江南大学, 2007: 13-21.
- [10] Liu M, Ouyang J, Yong Q, *et al.* Preparation of β -glucosidase by *Aspergillus niger* in submerged fermentation. *Chin J B Che Eng*, 2008, **42**(5): 5-8.
刘敏, 欧阳嘉, 勇强, 等. 黑曲霉液体发酵制备 β -葡萄糖苷酶的研究. *生物质化学工程*, 2008, **42**(5): 5-8.
- [11] Shen JC, Zhu MT, Qu YB. Breeding of β -glucosidase-producing strains by N^+ implantation and research on fermentation conditions. *Chin J C Sci Tech*, 2008, **16**(4): 7-11.
沈加成, 朱明田, 曲音波. N^+ 注入诱变选育 β -葡萄糖苷酶高产菌株及其产酶条件的优化. *纤维素科学与技术*, 2008, **16**(4): 7-11.
- [12] Ghos TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*, 1987, **59**(2): 257-268.
- [13] Michael J, Peter B, Kaisa P. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol*, 1992, **23**(3): 257-270.
- [14] Zhu FM, Liu CJ, Li J. Studies on the properties of β -glucosidase from *Aspergillus* spp. obtained by protoplast fusion and aroma-enhancing of grape wine. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2008: 31-32.
朱凤妹, 刘长江, 李军. 原生质体融合曲霉菌株 β -葡萄糖苷酶的酶学性质及对葡萄酒增香调控作用的研究. 沈阳: 沈阳农业大学, 2008: 31-32.
- [15] Yang Q, Sun DM, Zhang J. Protoplast induced mutation breeding on *Trichoderma aureoviride*. *Microbiology*, 2005, **32**(4): 62-67.
杨谦, 孙冬梅, 张晶. 黄绿木霉原生质体诱变育种研究. *微生物学通报*, 2005, **32**(4): 62-67.