

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.09.008

短小芽孢杆菌碱性 β -葡萄糖苷酶在毕赤酵母中的表达及酶学性质研究

Expression and characterization of alkaline β -glucosidase in *Pichia pastoris* from *Bacillus pumilus*

阚劲松 张敏 徐涛

KAN Jin-song ZHANG Min XU Tao

(合肥学院生物与环境工程系, 安徽 合肥 230601)

(Department of Biological and Environmental Engineering, Hefei University, Hefei, Anhui 230601, China)

摘要:以毕赤酵母密码子为基准,对短小芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因密码子进行优化,设计合成全基因序列,构建表达载体转入毕赤酵母中。结果表明,短小芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因已成功转入酵母菌中并分泌表达,诱导培养 72 h 发酵液的酶活力可达 25.39 U/mL。重组酶最适反应温度 45 $^{\circ}\text{C}$,最适 pH 9.0,重组酶的 K_m 值 1.26 mmol/L, V_{max} 为 32.15 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。重组 β -葡萄糖苷酶对大豆苷水解活性相对活力是 pNPG 的 248%,转糖苷活性催化 50% 底物葡萄糖合成龙胆二糖,达 34.25 g/L。

关键词:碱性 β -葡萄糖苷酶;短小芽孢杆菌;毕赤酵母;龙胆二糖;表达

Abstract: Engineered *Pichia pastoris* strain secreting and expressing β -glucosidase gene of *Bacillus pumilus* was constructed and enzymatic properties of recombinant enzyme were investigated. Based on the codon usage of *Pichia pastoris*, the codon of the β -glucosidase gene of *Bacillus pumilus* was optimized, the whole gene sequence was designed and synthesized, and the expression vector was constructed and transferred into *Pichia pastoris*. The results showed that the β -glucosidase gene of *Bacillus pumilus* had been successfully transferred into the yeast and secreted and expressed. The activity of the fermentation broth after 72 h induction could reach 25.39 U/mL. The optimum temperature and pH for the recombinant β -glucosidase were 45 $^{\circ}\text{C}$ and 9.0, and the K_m and V_{max} of recombinant enzyme were

1.26 mmol/L and 32.15 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, respectively. The relative activity of recombinant β -glucosidase to soybean glycoside hydrolysis was 248% of that of pNPG, and the transglycosylation activity catalyzed the enzymatic synthesis of gentiobiose yield of 34.25 g/L using 50% glucose as the substrate.

Keywords: alkaline β -glucosidase; *Bacillus pumilus*; *Pichia pastoris*; gentiobiose; expression

β -葡萄糖苷酶 (β -D-glucosidase, EC 3.2.1.21) 具有 β -糖苷键水解和合成(转糖苷)双重活性作用^[1-2],微生物来源的 β -葡萄糖苷酶在食品工业具有重要的应用价值^[3]。 β -葡萄糖苷酶的水解作用源于非还原端断裂 β -糖苷键释放 D-葡萄糖和糖基配体,一方面可将纤维低聚糖和纤维二糖水解成葡萄糖,对纤维素糖化获得单糖进行后续发酵具有关键性作用^[4],另一方面可将难以被人体吸收的天然糖苷类物质如大豆苷等水解成易于吸收利用的苷元形式^[5],也可以酶解多种不同糖苷键合态的香味前体物质,释放天然香气的风味物质^[6],在 β -葡萄糖苷酶的转糖苷作用下生成功能性低聚糖^[7-8],碱性条件下更有利于形成聚合物^[9]。功能性低聚糖如低聚龙胆糖、低聚纤维寡糖等可以作为益生元的功能性糖类,其中低聚龙胆糖比麦芽糖浆具有更高的吸水性和较低的黏度,可防止食品中的淀粉老化和保持食品中的水分,对双歧杆菌具有较强的增殖作用^[10]。

多数生物倾向于利用 64 种密码子中的一部分,被频繁利用的称为最佳密码子,未被经常利用的称为稀有或利用率低的密码子,密码子的偏爱性是影响外源蛋白质异源表达的关键因素。巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是发展迅速的真核表达系统^[11],相对原核表达来说,其外源基因稳定、分泌表达产物易于纯化及能进行蛋白翻译后加工修饰等特性使其得到广泛应

基金项目:安徽高校自然科学研究重点项目(编号:KJ2016A878);安徽省教育厅质量工程项目(编号:2016szzx036);安徽省自然科学基金青年项目(编号:1308085QC48)

作者简介:阚劲松(1964—),男,合肥学院副教授,硕士。

E-mail: kanjs@hfuu.edu.cn

收稿日期:2019-04-11

用,已成功表达几种真核生物的 β -葡萄糖苷酶基因^[12-14]。由于毕赤酵母对密码子的偏爱性,对目的基因的来源特别是原核基因序列需进行优化才能提高表达产物量。

前期研究已实现短小芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达,但大量表达产物易形成包涵体,导致酶活力较低,且需细胞破碎后才能分离产物。短小芽孢杆菌 F1 株 β -葡萄糖苷酶基因中编码部分氨基酸(Arg、Pro、Cys 和 Ala 等)的密码子在毕赤酵母中的使用频率较低。试验拟将细菌 *Bacillus pumilus* 的 β -葡萄糖苷酶基因在毕赤酵母中进行优化表达,以期提高表达量和胞外酶活力,并测定其酶学性质,为 β -葡萄糖苷酶在食品工业的应用及后续研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株及质粒

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)F1 株:本实验室筛选获得并保藏;

E.coli DH5 α :生工生物工程(上海)股份有限公司;

毕赤酵母 GS115、毕赤酵母表达载体 pPICZ α A:美国 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂

LB 培养基、质粒提取试剂盒、博来霉素(Zeocin)、PCR 产物纯化试剂盒、T₄ DNA 连接酶、DNA 相对质量标准、凝胶回收试剂盒、牛血清蛋白、考马斯亮蓝 R-250、Bradford 蛋白质试剂盒:生工生物工程(上海)股份有限公司;

EcoR I、*Not* I、*Sac* I:美国 Fermentas(MBI)公司;

对硝基苯基 β -D-葡萄糖苷(pNPG):美国 Sigma 公司;

糖苷(七叶苷、苦杏仁苷、水杨苷、大豆苷、柚皮苷、D-海藻糖、熊果糖)、葡萄糖含量检测试剂盒:北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 仪器与设备

高速冷冻离心机:Allegra 64R Centrifuge 型,美国 BECKMAN COULTER 公司;

紫外-可见分光光度计:Libra S22 型,英国 Biochrom 公司;

PCR 仪:Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler 型,美国 ABI 公司;

凝胶成像系统:BioSens 810 型,上海山富科学仪器有限公司;

电穿孔仪:MicroPulser 型,美国 Bio-Rad 公司;

高效液相色谱仪:Waters 1525/Alltech ELSD 2000ES 型,美国 Waters 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 β -葡萄糖苷酶基因遗传密码的优化设计 在保持氨基酸序列不变的前提下,以毕赤酵母密码子使用频率为基准,利用密码子优化软件(<http://www.jcat.de>)对 β -葡萄糖苷酶基因进行密码子优化设计,获得 β -葡萄糖苷酶基因序列(*bglK*)。为方便基因重组和重组酶的纯化,基因编码序列 5' 端引入 *EcoR* I 限制酶位点,3' 端增加 6 \times His 标签序列后再加上 *Not* I 限制酶位点。优化后的全基因序列进行人工合成后连接到 pUC57 载体,合成的全基因片段经测序分析完全正确后,用于酵母表达质粒的构建。

1.2.2 毕赤酵母表达载体的构建和转化 含有人工全合成基因的 pUC57 载体经 *EcoR* I 和 *Not* I 限制酶切后,凝胶电泳分离基因 *bglK*, T₄ 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接与经相同双酶切的 pPICZ α A 载体片段, CaCl₂ 法转入 *E.coli* DH5 α 中, 氨苄抗性(100 μ g/mL)平板筛选重组菌,获得阳性转化子,提取质粒进行酶切和测序分析验证。重组质粒 pPICZ α A-*bglK* 经 *Sac* I 线性化后,加入 200 μ L 毕赤酵母 GS115 感受态细胞并轻轻混匀,转入 2 mm 预冷电转化杯中,冰上放置 5 min,放入电转化仪电击后涂板,30 $^{\circ}$ C 培养 2 d 至转化子出现,通过含不同 Zeocin 浓度(100, 200, 500, 1 000 μ g/mL)的 YPD 平板筛选多拷贝高表达转化子。使用载体通用引物进行 PCR 鉴定转化子,5' AOX 引物序列:GACTGGTTCCAATTGACAAGC,3' AOX 引物序列:GGATGTCAGAATGCCATTTGC,阳性对照以 pPICZ α A-*bglK* 质粒为模板,pPICZ α A-*bglK* 转化子记为 GS115/pPICZ α A-*bglK*。

1.2.3 毕赤酵母工程菌株的分泌表达与鉴定 将多拷贝阳性转化子、GS115 及 GS115/pPICZ α A 空载毕赤酵母单克隆分别接种 5.0 mL YPD 液体培养基,30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12 h,按 10% 的接种量转种含 25 mL BMGY 培养基的摇瓶中,30 $^{\circ}$ C、250 r/min 摇床培养至 OD_{600 nm} 为 2~6,室温离心收集菌体,轻轻倒出上清液,用 BMMY 液体培养基将细胞重悬至 OD_{600 nm} 为 1.0 以诱导表达。30 $^{\circ}$ C、250 r/min 继续培养,每 24 h 补加适量 100% 甲醇至终浓度为 1.5%。每 24 h 取样,12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液即为粗酶液,分别进行酶活力检测、SDS-PAGE 和 Western Blotting 鉴定。

(1) SDS-PAGE 分析表达产物:600 μ L 样品菌悬液离心,取 200 μ L 上清,采用生工 TCA 沉淀试剂盒沉淀蛋白,最终蛋白重悬液体积为 20 μ L,上样量 20 μ L,浓缩胶 80 V,20 min,分离胶 120 V,60 min,凝胶电泳结束后进行考马斯亮蓝染色 20 min,脱色。

(2) Western Blotting 鉴定:检测重组 β -葡萄糖苷酶的表达情况^[15],制备聚丙烯酰胺凝胶为浓缩胶 5%,分离胶 12%,样品 20 μ L 上样。电泳参数为浓缩胶 80 V,

30 min;分离胶 120 V, 60 min。转膜为湿转, 250 mA, 52 min。5%脱脂奶粉封闭, 37 °C 缓慢振荡 1 h。一抗为兔抗 His 标签, 1:500 稀释, 37 °C 缓慢振荡 60 min 孵育一抗。二抗为羊抗兔, 1:8 000 稀释, 37 °C 缓慢振荡 60 min 孵育二抗, 四甲基联苯胺 (Tetramethylbenzidine, TMB) 显色。

1.2.4 重组 β -葡萄糖苷酶活力测定 800 μ L 的 0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9.0) 和 100 μ L 的 45 mmol/L pNPG 在 45 °C 条件下预热 5 min, 加入适当稀释倍数的酶液 100 μ L, 反应 10 min, 加入 2 mol/L Na_2CO_3 溶液 2 mL 终止酶反应, 再加入 10 mL 蒸馏水混匀, 取适量反应液加入比色皿中, 测定 $OD_{405\text{ nm}}$ 。 β -葡萄糖苷酶活力单位 (U) 定义为在最适反应条件下, 每分钟催化 1 μ mol 底物 pNPG 转化为产物 pNP 所需的酶量。

1.2.5 温度对重组酶活性的影响 在 25~60 °C (间隔 5 °C) 的不同温度下测定酶活, 确定重组酶的最适反应温度。将酶液分别在 45, 50, 55 °C 水浴中保温处理 3 h, 间隔 30 min 取样, 测定样品剩余酶活力, 以保温前 (0 h) 样品的酶活力为 100%, 计算相对酶活力, 研究重组酶在不同温度下残留酶活随时间变化情况, 探究酶的温度稳定性。

1.2.6 pH 对重组酶活性的影响 在最适温度 45 °C 条件下, 测定重组 β -葡萄糖苷酶在 pH 4.0~8.0 (磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液)、pH 9.0~10.0 (甘氨酸-氢氧化钠缓冲液) 条件下的酶活, 确定最适反应 pH。将酶液于 25 °C 分别在 pH 4.0~10.0 的缓冲液中保温 2 h 后测定剩余酶活力, 以未处理酶活力为 100%, 计算不同 pH 条件下的酶活变化情况。

1.2.7 金属离子对重组酶活性的影响 在最适酶反应条件下, 加入不同离子的溶液 (终浓度为 1, 5 mmol/L), 以未加入金属离子的酶活力为 100%, 测定重组 β -葡萄糖苷酶在不同离子环境中的酶活力。

1.2.8 重组 β -葡萄糖苷酶的动力学常数 以 pNPG 为底物, 在 45 °C、pH 9.0 条件下, 测定不同底物浓度 (0.25~40.00 mmol/L) 下的反应速度, 利用底物浓度和对应酶促反应速度, 通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 分析重组酶的动力学常数 K_m 和 V_{max} 值^[16]。

1.2.9 底物特异性 在最适酶反应条件下, 取终浓度为 0.01 g/mL 的糖苷类物质作为底物, 反应时间 10 min, 再放入 100 °C 水浴中煮沸 5 min 终止酶反应, 通过葡萄糖试剂盒测定 $OD_{505\text{ nm}}$ 值。

1.2.10 转苷活性检测 取 1 mL 粗酶液, 加 pH 7.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制 50% 葡萄糖浓度的反应体系, 45 °C 反应 48 h, 煮沸 10 min 灭酶, 0.45 μ m 滤膜过滤后进行 HPLC 检测分析。

HPLC 条件: 色谱柱为 Hypersil APS-2, 流动相为乙

腈-水 (体积比 70:30); 蒸发光散射检测器; 漂移管温度 90 °C; 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL/min; 进样量 5 μ L。

1.3 数据处理

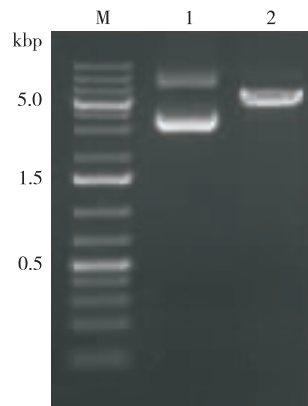
取 3 次平行试验的平均值, 采用 Excel 2010 进行统计处理与作图。

2 结果与分析

2.1 毕赤酵母重组表达载体的构建

根据毕赤酵母密码子偏好性, 优化设计源自短小芽孢杆菌 F1 株 β -葡萄糖苷酶基因序列, 将原始基因序列优化为适宜酵母表达的密码子, 以提高表达效率, 优化后的基因长 1 485 bp, 编码 495 个氨基酸。全基因序列由上海生工合成, 合成基因被克隆到 pUC57 载体上, 测序结果表明合成基因与设计的基因序列完全一致。

pUC57 载体经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后, 插入经相同双酶切的 pPICZ α A 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经 Amp 抗性筛选, 提取阳性克隆质粒, 电泳结果如图 1 所示, 重组质粒与计算值相符, 合成基因成功克隆至表达载体, 重组的表达载体命名为 pPICZ α A-bglK。*Sac* I 酶切重组表达载体, 酶切后线性化片段约 5 078 bp (载体 3 593 bp + 目的基因 1 485 bp), 电泳结果与理论值相符, 纯化回收线性化片段进行转化。



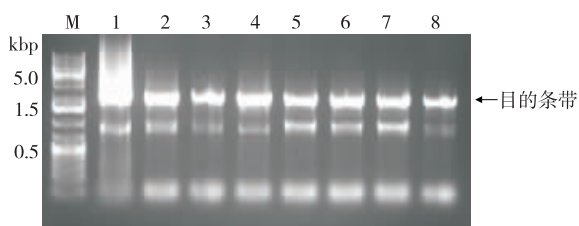
M, DNA marker 1, 重组质粒 pPICZ α A-bglK 2, *Sac* I 线性化 pPICZ α A-bglK

图 1 *Sac* I 线性化重组质粒 pPICZ α A-bglK

Figure 1 Linearization of recombinant pPICZ α A-bglK by *Sac* I

2.2 重组菌株的筛选和鉴定

线性化重组质粒片段电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 在 YPD 抗性平板上共筛选获得 56 个转化子, 挑选 7 个单克隆接种 YPD 液体培养基, 提取酵母基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 结果见图 2。转化子基因组扩增箭头所指为目的基因条带, 目的基因条带 1 485 bp 和载体上序列 488 bp 的总和约 1 973 bp, PCR 鉴定结果表明 *bglK* 基因已插入毕赤酵母基因组中, 泳道 2~8 均为阳性转化



M. DNA Marker 1. 阳性对照 2~8. H1~H7 转化子 PCR 扩增

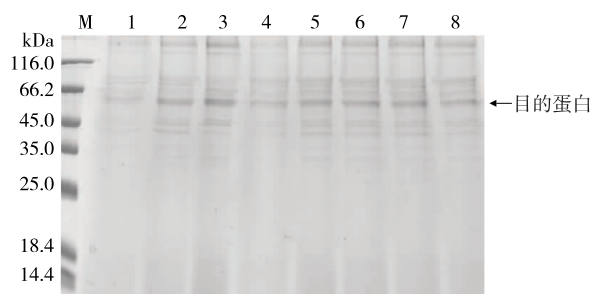
图 2 PCR 鉴定转化子

Figure 2 PCR amplification of transformants

子,转化子分别记为 GS115/pPICZ α -H1~H7。

2.3 重组菌株的分泌表达

摇瓶发酵诱导表达 72 h 后取样进行 SDS-PAGE 分析,由图 3 可知,目标蛋白理论大小约为 57.5 kDa,与泳道 1 相比,泳道 2~8 明显出现条带。



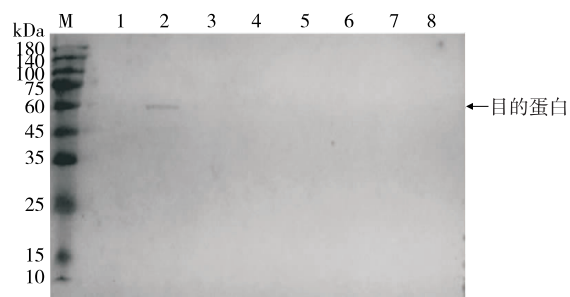
M. 蛋白质分子量对照 1. 阴性对照 GS115/pPICZ α 2~8. H1~H7 转化子发酵上清

图 3 毕赤酵母重组表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of the expressed protein produced from *P. pastoris*

2.4 Western Blotting 分析

由图 4 可知,在 57.5 kDa 附近,2 号泳道的一号菌株(GS115/pPICZ α -H1)可见明显的条带信号,条带大小与预期相符,表明短小芽孢杆菌 F1 株 β -葡萄糖苷酶基因在



M. 蛋白质分子量 Marker 1. 阴性对照 2~8. 阳性转化子 H1~H7 发酵液上清

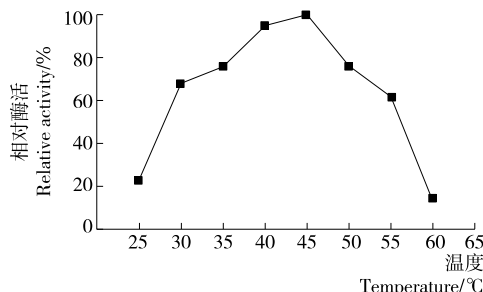
图 4 重组 β -葡萄糖苷酶的 Western Blotting 鉴定

Figure 4 Western Blotting analysis of the recombinant β -glucosidase

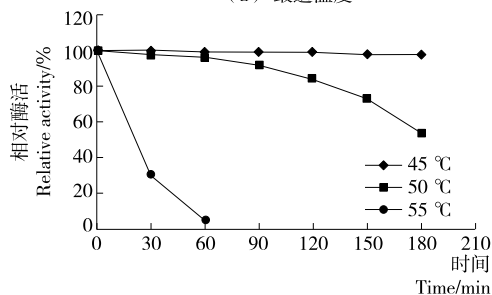
毕赤酵母中克隆并分泌表达成功。其他泳道未见显色条带可能是转化子因整合酵母基因组位置不同导致蛋白表达上的差异,也可能是表达蛋白中 His 标签包埋程度不同导致显色信号差异。

2.5 重组酶的酶学性质

2.5.1 最适温度和温度稳定性 由图 5(a)可知,当温度为 25~45 $^{\circ}\text{C}$ 时,相对酶活呈逐渐上升趋势;当温度为 45~60 $^{\circ}\text{C}$ 时,相对酶活逐渐下降,说明重组酶最适反应温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 。由图 5(b)可知,重组酶在 45 $^{\circ}\text{C}$ 时非常稳定,50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下酶的温度半衰期为 3 h,55 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 1 h 后酶活几乎为零。不同来源的 β -葡萄糖苷酶,其最适温度分布在 30~90 $^{\circ}\text{C}$ [17]。



(a) 最适温度



(b) 温度稳定性

图 5 重组 β -葡萄糖苷酶的最适温度和温度稳定性
Figure 5 Optimal temperature and thermal stability of the recombinant β -glucosidase

2.5.2 最适 pH 及 pH 稳定性 由图 6(a)可知,伴随 pH 值的改变,重组酶活出现明显变化,pH 处于 5.0~6.0 时,酶活较低;pH 处于 7.0~9.0 时,相对酶活快速上升;pH 处于 9.0~10.0 时,相对酶活快速降低,说明重组酶最适 pH 值为 9.0,与文献[17]报道的多数 β -葡萄糖苷酶的最适 pH(3.5~6.5)一致。由图 6(b)可知,pH 在 7.0~9.0 时,重组酶 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 3 h,依然保持 80% 以上的酶活力,说明重组酶在中性偏碱性条件下酶活力较高且比较稳定。

2.5.3 金属离子对重组酶活性的影响 由图 7 可知,测试的金属离子未表现出对重组 β -葡萄糖苷酶活力的促进作用;在 1.5 mmol/L 的处理条件下, Na^+ 、 K^+ 、 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 对重组 β -葡萄糖苷酶活力的影响不大; Ca^{2+} 在

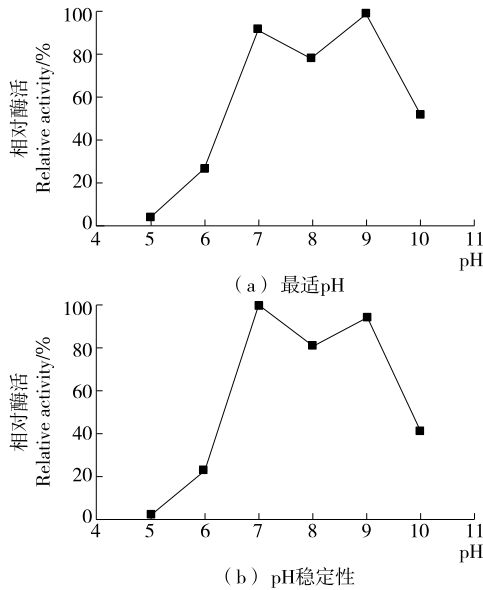


图6 重组β-葡萄糖苷酶的最适pH和pH稳定性
Figure 6 Optimal pH and pH stability of the recombinant β-glucosidase

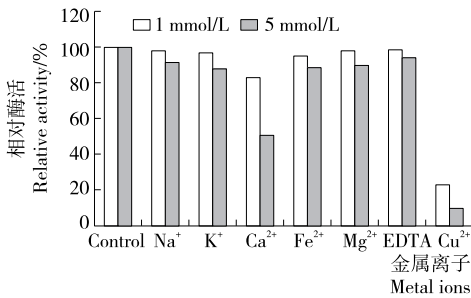


图7 金属离子对重组β-葡萄糖苷酶活性的影响
Figure 7 Effect of metal ions on the activity of the recombinant β-glucosidase

5 mmol/L 时抑制了 49% 的酶活; Cu²⁺ 在 1, 5 mmol/L 时分别抑制了 77%, 90% 的酶活。不同来源的 β-葡萄糖苷酶, 金属离子对酶活力的影响差异较大, 但 Cu²⁺ 对多数 β-葡萄糖苷酶具有抑制作用^[17]。

2.5.4 酶促反应动力学常数 诱导培养 72 h, 发酵液上清酶活力为 25.39 U/mL。将重组 β-葡萄糖苷酶与不同浓度的 pNPG 进行反应, 测定不同底物浓度的酶促反应速度, 通过双倒数作图法分析可知, 酶促反应具有典型米氏动力学特性(图 8), 计算获得重组酶的 K_m 值为 1.26 mmol/L, V_{max} 为 32.15 μmol/(min · mg)。

2.5.5 底物特异性 由表 1 可知, 重组 β-葡萄糖苷酶对海藻糖、苦杏仁苷、七叶苷、水杨苷、柚皮苷等糖苷类物质有一定的水解作用, 对熊果糖、麦芽糖和蔗糖等无作用, 对大豆苷其相对活力为 pNPG 的 248%。大豆异黄酮在大豆中以糖苷和苷元两种形式存在, 其中以糖苷为主要存在形式, 酶水解糖苷释放出游离的大豆异黄酮苷元易

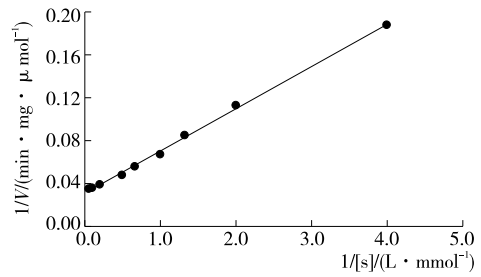


图8 重组β-葡萄糖苷酶的动力学方程
Figure 8 K_m and V_{max} values of the recombinant β-glucosidase

表1 重组β-葡萄糖苷酶对一些天然糖苷类物质的水解
Table 1 Hydrolysis of the recombinant β-glucosidase on some natural glycosidic substrates

糖苷类物质	相对酶活/%	糖苷类物质	相对酶活/%
pNPGlu	100	D-海藻糖	15
七叶苷	64	熊果糖	0
苦杏仁苷	53	蔗糖	0
水杨苷	65	麦芽糖	0
大豆苷	248	纤维二糖	82
柚皮苷	38		

被人体吸收^[18-19]。此酶对大豆苷的水解反应表现出高效催化作用, 有望用于制备功能和保健食品。

2.5.6 转苷活性 由图 9 可知, HPLC 图谱显示酶催化反应产物中, 出现与龙胆二糖标样保留时间一致的峰, 表

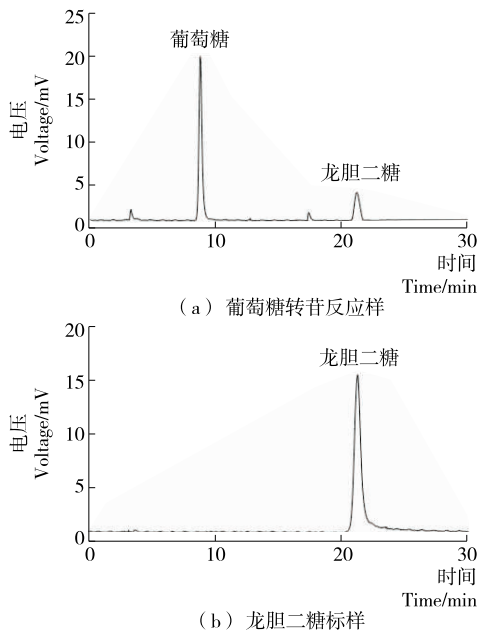


图9 转苷反应产物 HPLC 分析图谱
Figure 9 HPLC spectrometry analysis of the transglycosylation

明重组酶有转苷活性,根据峰面积计算可知,龙胆二糖含量达 34.25 g/L。

3 结论

试验将细菌 *Bacillus pumilus* 来源的 β -葡萄糖苷酶基因在毕赤酵母中进行表达,结果表明,短小芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶基因成功在毕赤酵母中克隆与分泌表达,方便蛋白质纯化,可进行高密度发酵培养,便于工业化生产。发酵上清中重组 β -葡萄糖苷酶活力达 25.39 U/mL,重组 β -葡萄糖苷酶最适反应温度 45 °C,最适 pH 9.0,在中性偏碱性条件下酶活力高且比较稳定,1,5 mmol/L 的 Cu^{2+} 分别抑制 77%,90% 的酶活。重组 β -葡萄糖苷酶对大豆苷的高效水解和能够酶促合成龙胆二糖,表明其具有较高的应用开发价值,但仍需对大豆苷的水解条件及利用转苷活性生产龙胆低聚糖的性质和条件进行优化研究,为 β -葡萄糖苷酶在食品工业的应用及后续研究提供依据。

参考文献

- [1] 郑芳芳,王金佩,林宇,等.链霉菌 GXT6 β -葡萄糖苷酶的酶学性质及葡萄糖耐受性分子改造[J].微生物学报,2018,58(10):1839-1852.
- [2] SINGH G, VERMA A K, KUMAR V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases[J]. 3 Biotech, 2016, 6(1): 3.
- [3] AHMED A, NASIM FU H, BATOOL K, et al. Microbial β -Glucosidase: Sources, production and applications [J]. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2017, 5(1): 31-46.
- [4] POCAN P, BAHCEGUL E, OZTOP M H, et al. Enzymatic hydrolysis of fruit peels and other lignocellulosic biomass as a source of sugar[J]. Waste Biomass Valorization, 2018, 9(6): 929-937.
- [5] HU Sheng-lin, WANG Dong-mei, HONG Jiong. A simple method for beta-glucosidase immobilization and its application in soybean isoflavone glycosides hydrolysis[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2018, 23(1): 39-48.
- [6] VERVOORT Y, HERRERA-MALAVAR B, MERTENS S, et al. Characterization of the recombinant *Brettanomyces anomalus* β -glucosidase and its potential for bioflavouring[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(3): 721-733.
- [7] BOUDABBOUS M, BEN HMAD I, SAIBI W, et al. Transglycosylation capacity of a highly glycosylated multi-specific β -glucosidase from *Fusarium solani* [J]. Bioprocess Biosystems Engineering, 2017, 40(4): 559-571.
- [8] DA SILVA A S, MOLINA J F, TEIXEIRA R S S, et al. Synthesis of disaccharides using β -glucosidases from *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *Prunus dulcis*[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(11): 1717-1723.
- [9] ZHAO Xue-song, GAO Ling, WANG Juan, et al. A novel ginsenoside Rb1-hydrolyzing β -D-glucosidase from *Cladosporium fulvum*[J]. Process Biochem, 2009, 44(6): 612-618.
- [10] QIN Yong-ling, ZHANG Yun-kai, HE Hai-yan, et al. Screening and identification of a fungal β -glucosidase and the enzymatic synthesis of gentiooligosaccharide[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 163(8): 1012-1019.
- [11] GÜNDÜZ ERGÜN B, ÇALIK P J B, ENGINEERING B. Lignocellulose degrading extremozymes produced by *Pichia pastoris*: Current status and future prospects [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2016, 39(1): 1-36.
- [12] TANG Zi-zhong, LIU Shan, JING Hai-jun, et al. Cloning and expression of *A. oryzae* β -glucosidase in *Pichia pastoris*[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(11): 7567-7573.
- [13] LIU Dong-yang, ZHANG Rui-fu, YANG Xing-ming, et al. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 25.
- [14] BOONVITTHYA N, TANAPONG P, KANNANAN P, et al. Cloning and expression of the *Aspergillus oryzae* glucan 1,3-beta-glucosidase A (*exgA*) in *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(10): 1937-1943.
- [15] 易晓男,任清华,程炜,等.高产 β -葡萄糖苷酶工程菌株的构建及其在 2,6-二甲氧基对苯醌发酵制备中的应用[J].食品科学,2017,38(8):69-73.
- [16] ZHANG Cong, WANG Xi-feng, ZHANG Wei-can, et al. Expression and characterization of a glucose-tolerant β -1,4-glucosidase with wide substrate specificity from *Cytophaga hutchinsonii*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(5): 1919-1926.
- [17] AHMED A, ASLAM M, ASHRAF M, et al. Microbial β -glucosidases: Screening, characterization, cloning and applications[J]. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2017, 5(2): 57-73.
- [18] 江民华,林厚民,尹金阳,等.差异柠檬酸杆菌 GXW-1 β -葡萄糖苷酶的酶学性质及分子改造[J].微生物学报,2017,57(3):363-374.
- [19] 刘群,管政兵,蔡宇杰,等.*Bacillus altitudinis* SYBC hb4 碱性 β -葡萄糖苷酶基因的克隆表达及酶学性质的研究[J].食品与生物技术学报,2017,36(11):1203-1209.