

Progress of β -Glucosidase from Microorganisms

Zhishuai Chang*, Hui Lan, Yali Bao, Zhanying Liu#

Inner Mongolia University of Technology, Hohhot Inner Mongolia
Email: 1925647878@qq.com, 11925647878@qq.com, #645877397@qq.com

Received: Jun. 7th, 2018; accepted: Jun. 21st, 2018; published: Jun. 28th, 2018

Abstract

β -glucosidase can effectively decrease the inhibitory effect of cellobiose on cellulase activity, which is a bottleneck on the complete hydrolysis of cellulose. Because of its low activity and high cost, the β -glucosidase, which is highly resistant to acid and alkali, is more suitable for industrial production and application by means of genetic engineering technology and expressing in heterologous hosts. In this paper, there is a detailed summary about β -glucosidase in the classification and cloning about different sources of β -glucosidase gene, enzyme activity determination and so on, which provides theoretical support for enzyme researches.

Keywords

β -Glucosidase, Gene Cloning, Enzyme Activity Determination

微生物产 β -葡萄糖苷酶研究进展

常治帅*, 兰 辉, 包亚莉, 刘占英#

内蒙古工业大学, 内蒙古 呼和浩特
Email: 1925647878@qq.com, 11925647878@qq.com, #645877397@qq.com

收稿日期: 2018年6月7日; 录用日期: 2018年6月21日; 发布日期: 2018年6月28日

摘 要

β -葡萄糖苷酶能有效解除纤维二糖对纤维素酶活性的抑制, 是限制纤维素彻底水解的重要因素。由于 β -葡萄糖苷酶酶活相对较低、成本高等因素, 通过基因工程手段对其定向改造, 异源表达获得高酶活、耐

*第一作者。

#通讯作者。

热耐酸碱的 β -葡萄糖苷酶,使其更适用于工业生产和应用。文中从 β -葡萄糖苷酶的分类、微生物来源 β -葡萄糖苷酶基因的克隆、酶活力测定方法等几方面对 β -葡萄糖苷酶进行综述,以期对 β -葡萄糖苷酶的研究提供借鉴。

关键词

β -葡萄糖苷酶, 基因克隆, 酶活力测定

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

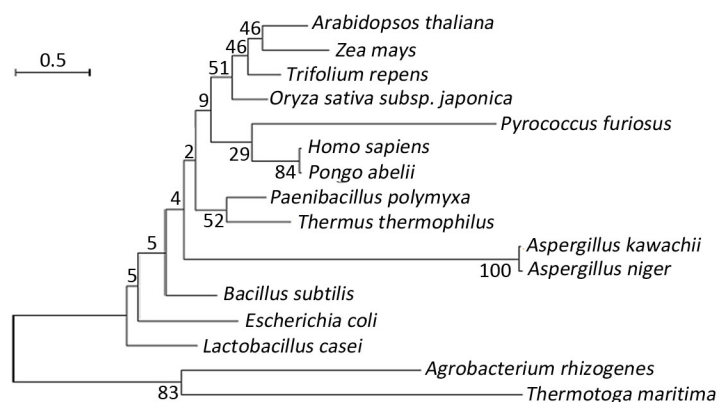
纤维素水解的过程需要大量的酶参与,主要包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶。内切葡聚糖酶随机切割纤维素链的糖苷键得到短链,外切葡聚糖酶则作用于所得短链的非还原端,得到纤维二糖和纤维寡糖, β -葡萄糖苷酶催化外切葡聚糖酶的水解产物,得到葡萄糖[1]。但是酶解过程中产生过多的纤维二糖会成为非竞争性抑制物,反馈抑制纤维素酶的活性。而 β -葡萄糖苷酶能够水解纤维二糖,有效地解除其对纤维素酶活性的抑制,是纤维素酶组分中的关键酶类,也是影响纤维素彻底水解的瓶颈。

β -葡萄糖苷酶来源也十分广泛,既可以存在于植物、微生物中,又可以存在于动物体中,便于获得。随着科学技术的不断发展,这类酶已被定向改造,获得具有更适合工业大规模生产特性的菌株,不仅降低了工业生产的成本,同时提高了生产效率。 β -葡萄糖苷酶具有很好的发展前景,在食品方面,可以提高酒香,使茶叶的香味增加;在工业方面,可以大量生产大豆异黄酮苷元产品;在医药方面,其浓度可以作为肠损伤的早期生化指标,同时 β -葡萄糖苷酶的底物特异性[2]、转糖苷功能[3]和葡萄糖耐受性[4]等也备受关注。因此,深入研究 β -葡萄糖苷酶,使其在科学研究和工业应用中发挥重要作用,对于人类的生产和生活具有重大意义。

2. β -葡萄糖苷酶分类

β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase),又称 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶,别名龙胆二糖酶、纤维二糖酶和苦杏仁苷酶,该酶可以水解连接羟基或芳香基与糖原子团间的糖苷键,最终得到单体葡萄糖。

β -葡萄糖苷酶根据其不同的特点可以有多种分类方法。根据 β -葡萄糖苷酶所存在的部位来划分,可分为胞内和胞外两种。根据其作用的底物不同可以将 β -葡萄糖苷酶分为3类:第一类是单一水解含有羟基的 β -葡萄糖苷的酶,其作用的底物一般为纤维二糖等;第二类是单一水解含有芳香基的 β -葡萄糖苷的酶,该酶作用的底物为对硝基苯- β -葡萄糖苷等;最后一类是能水解含有羟基或芳香基的 β -葡萄糖苷的酶,其作用的底物一般为纤维二糖、对硝基苯- β -D-葡萄糖苷等。微观方向基因序列的不同,可以将 β -葡萄糖苷酶分为A、B两大类。刘震等人利用MEGA5软件构建系统发育树[5],发现不同来源的 β -葡萄糖苷酶在氨基酸序列上均存在很大的差别,如图1。因此根据氨基酸序列的不同可将 β -葡萄糖苷酶进行分类。CAZy网站根据结构相似性,将所有糖苷水解酶分类为153个家族(<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>, 2018年4月更新),但是目前报道较多的一般为家族1和3两类。依据不同的特点对 β -葡萄糖苷酶进行分类,为更深入的科学研究提供了方便。



注：图中分支节点上的数字表示每100次分析所支持的次数，线段表示序列差异的分支长度标尺

Figure 1. Phylogenetic tree of β -glucosidase from different species [5]

图 1. 不同来源 β -葡萄糖苷酶的系统发育树[5]

3. 不同来源 β -葡萄糖苷酶及其活力比较

1837年, Liebig 和 Wohler 首次在苦杏仁中发现 β -葡萄糖苷酶。经过长期的研究发现, β -葡萄糖苷酶既可以存在于动物中又可以存在于植物的果实中, 同时在微生物中也发现了该酶的存在, 该酶来源十分广泛。

可以产生 β -葡萄糖苷酶的植物有橄榄果、甘蓝、玉米、大豆等, 但是植物来源 β -葡萄糖苷酶活性要比微生物中的 β -葡萄糖苷酶活性低; 可以产生 β -葡萄糖苷酶的动物有蜜蜂、牛肝等。相比较, 关于微生物来源的 β -葡萄糖苷酶的研究内容较多。微生物主要包括细菌、丝状真菌、放线菌、酵母和古细菌等; 同时在如盐碱湖、热泉等一些生存环境苛刻的条件中, 也发现一些具有产 β -葡萄糖苷酶能力的微生物, 其中丝状真菌中主要有曲霉属、青霉属、热子囊菌属、木霉属、踝节菌属等, 相比较, 青霉属菌类能产生大量的 β -葡萄糖苷酶, 霉菌可以产生活性高的 β -葡萄糖苷酶。现在的研究主要集中在酵母、真菌、细菌和放线菌。原核微生物产该酶的菌株有柠檬酸杆菌属菌株[6]、脑膜脓毒性黄杆菌、约氏黄杆菌、特异腐质酶、胶质类芽孢杆菌等; 一般来说, 来自极端环境的 β -葡萄糖苷酶与普通生物来源的相比, 其酶的最适温度和热稳定性都会偏高[7]。不同来源的 β -葡萄糖苷酶其理化性质和催化活力均存在很大差别。部分不同来源 β -葡萄糖苷酶的性质如表 1 所示。

4. 基因的克隆和表达

随着分子技术的快速发展, 自然选育、诱变育种、原生质体融合等技术已经远远不能满足人类需求, 而基因重组技术具有定向性, 也越来越受到关注, 利用该技术来获得高产 β -葡萄糖苷酶工程菌株已经成为现在的研究热点。

对 β -葡萄糖苷酶研究的不断深入, 目前, 多种不同来源的 β -葡萄糖苷酶已被成功克隆在不同的载体中并异源表达得到高活性蛋白。表达宿主一般是大肠杆菌或者巴斯德毕赤酵母, 但由于大肠杆菌是原核生物, 不能有效修饰真核基因, 表达量相对来说也比较低, 故现在更倾向于毕赤酵母表达系统。毕赤酵母具有有效修饰真核基因、操作简单和蛋白表达水平高等优点[13]。表 2 中是近十几年来 β -葡萄糖苷酶基因成功表达在真核系统的部分实例, 其中使用毕赤酵母表达系统的研究居多。

微生物可以产生大量的 β -葡萄糖苷酶, 酶活比植物来源的要高, 但在工业生产上, 其产量远远不能满足工业要求。将产 β -葡萄糖苷酶微生物的基因克隆在异源表达载体中, 其分子量、比活、热稳定性以及催化效率等酶学性质发生较大的变化, 热稳定性提高, 更有利于工业生产和应用。

细菌具有较高的纤维素降解能力, 但是大部分细菌产生的都是胞内酶。因此利用细菌来源的葡萄糖苷酶

Table 1. Characteristics of β -glucosidases from different sources**表 1.** 部分不同来源 β -葡萄糖苷酶的性质

来源	分子量(kDa)	最适 pH	最适温度(°C)	构型	Km/(mM·L ⁻¹) p-NPG	Vmax/(U·mg ⁻¹) p-NPG	比活(U·mg ⁻¹) 疏水层析
<i>Brassica oleracea</i> [8]	130	6.0	35	二聚体	0.755	604	1719.63
<i>Putranjiva roxburghii</i> [9]	68	5.0	65	NR	0.52	11.73 s ⁻¹	119.1
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> [10]	52	8.0	38	NR	2.334	9.017	180.3
<i>Aspergillus oryzae</i> [11]	90	4.5	55	NR	2.906 (纤维二糖)	0.138 $\mu\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$ (纤维二糖)	40.84
<i>Bacillus korensis</i> [12]	90	7	40	NR	0.73	NR	1.64 × 105

注: NR 表示文献中未有具体的数据。

Table 2. Examples of β -glucosidase genes expressed in eukaryotic systems**表 2.** β -葡萄糖苷酶基因在真核系统的成功表达的部分实例

菌株	表达宿主	基因序列长度	GenBank 登录号
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> [14]	酿酒酵母	NR	NR
<i>Paecilomyces thermophila</i> [15]	毕赤酵母	2557bp/858aa	HM998770
<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5 [16]	毕赤酵母	2622bp/844aa	HQ836475
<i>Trichoderma reesei</i> [17]	酿酒酵母	2622bp/847aa	NR
<i>Aspergillus niger</i> NL-1 [18]	毕赤酵母	2583bp/861aa	HQ385276
<i>Aspergillus oryzae</i> GIF-10 [19]	毕赤酵母	2586bp/862aa	NR
<i>Putranjiva roxburghii</i> [9]	酿酒酵母	1617bp/539aa	KF006311

注: NR 表示文献中未有具体的数据。

基因进行克隆和表达以获得高活性重组酶对生产具有重要的意义。KIM 等[20]将来自 *Thermococcus pacificus* P-4 中的 Tpa-glu 基因在大肠杆菌中进行克隆和蛋白表达, 其重组 β -葡萄糖苷酶在 pNPG 为底物时最适 pH 为 7.5, 最适温度 75°C, Km 值较小, 该重组酶具有较高的耐热性和底物特异性, 在一定程度上降低了工业生产成本。同时也有研究[21]将 *Humicola insolens* RP86 中的 bglhi 基因在大肠杆菌中进行克隆和异源表达, 其重组蛋白 pH 稳定范围更大, 在 pH 为 4.5~8.0 范围内其酶仍然保持稳定, 最适温度上升为 60°C, 最适 pH 为 5.0~7.0, 最适 pH 范围的扩大减少了工业生产中调节发酵液酸碱度的费用; 重组酶对纤维素的催化效率提高, 是原始菌株的三倍多, 这为生物质资源化的研究方向提供了有价值的借鉴, 同时利用废弃的生物质不仅减少资源浪费也降低了环境污染。综和比较可以发现, 大部分的葡萄糖苷酶经过克隆和异源表达后, 其对温度的耐受性和 pH 的稳定性都有了较大的提高, 并且对纤维素物质的水解效率提高, 而这些特征在工业应用中具有重要的实践意义, 甚至可以较好地利用纤维素材料生产乙醇、L-乳酸等重要产品。

相对于细菌, 真菌生产的酶大部分为胞外酶, 但是关于利用真菌进行克隆和表达的报道较少, 主要原因是真菌基因中含有内含子和外显子, 其糖基化过程复杂。但是大部分真菌通过质粒进行基因转移的特性促使其可以作为表达宿主, 尤其是毕赤酵母其特殊的高细胞外蛋白生产性能已经成为用于工业酶生产的理想基因表达系统并且被用于异源蛋白表达[22]。表 3 为部分微生物在毕赤酵母中成功表达的实例。毕赤酵母具有生产 β -葡萄糖苷酶的能力并且成功表达真菌来源的重组蛋白[23]。里氏木霉可以产生大量的酶组分, 因此基因改造里氏木霉获得理想特性如热稳定性和酸性耐受性的重组酶具有很高的价值, 大量的葡萄糖苷酶可以更好地促进生物质水解。对里氏木霉进行工程化使其产生包括 β -葡萄糖苷酶在内的

Table 3. Properties of recombinant β -glucosidases expressed in *P. pastoris*
表 3. 重组 β -葡萄糖苷酶在毕赤酵母过表达的特性

来源	基因	载体	宿主	分子量 (kDa)	最适 pH	最适温度 (°C)	Km (mM)		Vmax ($\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$)	
							pNPG	Cellobiose	pNPG	Cellobiose
<i>P. thermophila</i> J18 [2]	PtBglu1	pMD18-T	<i>P. pastoris</i> GS115	56.7	6	55	0.55	1	NR	NR
<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5 [16]	Bgl3	pPICZa	<i>P. pastoris</i> X33	130	6	60	1.76	2.2	131.4	52.9
<i>Neosartorya fisheri</i> P1 [24]	NfBGL1	pPIC9	<i>P. pastoris</i> GS115	80	5	70	0.51	NR	2172	NR
<i>Penicillium funiculosum</i> NCL1 [23]	Bgl4	pPICZa	<i>P. pastoris</i> KM71H	130	5	60	2.5	1.25	3332	2083

一系列糖化酶，这可以成为降低加工成本的途径之一。

5. 酶活力测定

国内外对 β -葡萄糖苷酶的酶活力测定有多种方法，总结起来酶活力的测定主要有四种方法，包括电化学法、荧光法、分光光度法、高效液相色谱法等。但是对于其活性测定尚没有确定的统一方法，其中以分光光度法最为常用。

5.1. 电化学法

Guilbault 和 Kramer 设计通过电化学法测定 β -葡萄糖苷酶的活力。主要方法是以扁桃苷作为底物，通过酶的作用发生反应生成氢化物，然后利用与自发(内)电解池相联结的一对银-铂电极来测定葡萄糖苷酶活性。该方法比较复杂，灵敏度低，很少使用。

5.2. 荧光法

由 Robinson 设计利用荧光吸光度来测定 β -葡萄糖苷酶活力。依据 4-甲基伞形酮能发出强烈的荧光，以 4-甲基伞形酮的 β -D-葡萄糖苷作为底物，经过 β -葡萄糖苷酶水解可以产生游离的 4-甲基伞形酮，根据其荧光吸光度来计算酶的活力[25]。荧光法最初的用途是检测动物组织中 β -葡萄糖苷酶的含量，该方法灵敏度高且快速，但是操作复杂，且重现性不好，现在多不使用。

5.3. 分光光度法

分光光度法，又称 Barush 和 Swiain 法，是应用较广的一种方法，该法简单方便，普遍使用。

5.3.1. 水杨苷为底物

水杨苷经过酶的水解可以产生水杨醇和 β -D-葡萄糖。该方法以水杨苷为底物，利用 DNS 试剂对其产物葡萄糖进行比色测定；或者利用 4-氨基安替比林对水解产物水杨醇进行显色，并利用分光光度计测定其吸光度。该方法的反应过程易被周围环境干扰，且灵敏度不高，很少使用。

5.3.2. 对硝基苯基 β -D-葡萄糖苷为底物

对硝基苯基 β -D-葡萄糖苷，又称 pNPG，经过酶解可以产生对硝基苯，且在 400~420 nm 处有吸光度。基本原理是利用 pNPG 为底物并对产物进行吸光度测定来确定酶的活力。该方法具有操作简单快速、灵敏度高且其重现性好的优点，现在实验室普遍使用，但不同来源的 β -葡萄糖苷酶其性质存在较大的差别，故使用该方法测定酶活力时测定条件也需要发生不同的变化[26]。

5.3.3. 京尼平苷

京尼平苷是一种环烯醚萜葡萄糖苷，经过酶水解后产物京尼平能与氨基酸发生显色反应，生成蓝色物质，且在 590 nm 处有吸光度。梁华正等人通过多次研究发现以京尼平苷为底物可以确定 β -葡萄糖苷酶的活力[27]。同时发现酶活力在 0.05~1 U/mL 范围里时，吸光度和酶活力呈线性相关，且能检测出的最低酶活力为 0.02 U/mL。与以对硝基苯基 β -D-葡萄糖苷为底物的测定方法相比较，该法灵敏度低，但是精密度和准确度较好，结果稳定。

5.4. 高效液相色谱法

以纤维二糖为底物，利用高效液相色谱，通过测定水解生成的葡萄糖量来判断酶活也是现在比较新颖的方法。但是该方法只适用于稀释后酶活力范围为 0.17~0.37 IU/mL，且葡萄糖产量在 2.0 mg 以内的酶活力测定[28]。该方法简单、快速、灵敏度高，但是现在实验室很少使用。同时研究发现， β -葡萄糖苷酶以纤维二糖为底物时，其酶活性偏高。

综合比较，电化学法和荧光法操作复杂、灵敏度，不适合用于精确测定酶活；分光光度法是操作最简单、快速的方法，适合酶活测定，也是现在实验室测定酶活经常用的方法；高效液相法现在使用的频率不高，但是灵敏度度相对来说比较高，是一种新颖的酶活测定方法，有可能成为实验室酶活测定的常用方法。

6. 应用

β -葡萄糖苷酶的应用范围极广，可以应用于食品、工业、医药等各个领域，对其催化机制、克隆和性质等进行深入研究对于工业和科学发展都有重大的意义。

6.1. 在食品中的应用

在食品工业中， β -葡萄糖苷酶的主要作用是改善产品口味，符合人群需求。比如在青梅饮料中，青梅本身富含营养，但其中存在的苦杏仁苷使产品出现苦味，通过添加适量的 β -葡萄糖苷酶可以使其苦味降低，饮料口味也更符合人群需求。评价葡萄酒品质高低的标准之一是其风味， β -葡萄糖苷酶能够水解风味前体物质，产生具有挥发性香气的成分，是影响葡萄酒品质的重要酶类，同时它对葡萄酒的抗氧化保健功能也具有重大的影响[29]。

6.2. 在工业中的应用

在工业中利用纤维素酶对木质纤维素材料进行发酵生产乙醇或者乳酸等产品，不仅降低了工业生产成本减少环境污染，同时也为新能源的开发与利用提供了基础。此外， β -葡萄糖苷酶还可以用于水解大豆异黄酮，生产大豆异黄酮苷元产品[30]等。

6.3. 在医药中的应用

坏死性小肠结肠炎(NEC)主要在早产儿或患病的新生儿中发生，在我国新生儿疾病中死亡率高达 10%~50% [31]，严重威胁其生命。研究发现，患儿血液中 β -葡萄糖苷酶浓度上升早于肠壁出现组织学变化，故可以将该检测作为肠损伤的早期生化指标，为患儿争取更多的治疗时间[32]。

7. 总结与展望

β -葡萄糖苷酶通过保留型和反转型两种催化机制将纤维寡糖和纤维二糖水解为葡萄糖，减少了纤维二糖对其他纤维素酶的抑制作用，提高了酶的水解效率。除此之外， β -葡萄糖苷酶在其他领域的应用也

十分广泛。该酶可以用于工业生产乳酸或者大豆异黄酮苷元产品等，同时还可以用于医疗中判断新生儿疾病等。目前，通过基因工程技术定向改造获得工程菌株或通过蛋白质工程技术获得高活性、具有耐热耐酸碱等特性的 β -葡萄糖苷酶已成为现在研究的热点。

对于酶活力的测定方法，发现实验室最常用的方法仍是以 pNPG 为底物测定酶解产物的吸光度，此方法简单、快速，结果也比较准确；根据 β -葡萄糖苷酶的特性，高效液相色谱法也有可能成为主要的测定方法。但是，针对不同来源的 β -葡萄糖苷酶尚没有建立更加简便精准的活力测定方法体系，加深对 β -葡萄糖苷酶活性测定条件的研究将有利于对 β -葡萄糖苷酶进行更深入的研究。同时尝试从基础领域出发，研究酶的催化机制，找到酶活力测定方法误差来源，真正从根本上减少误差，提高测定方法的精确度也是现在的研究内容之一。

基金项目

国家自然科学基金(61361016)；兰州重离子加速器国家实验室项目资助；中国科学院“西部之光”人才培养计划资助；内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划资助；内蒙古“草原英才”工程及“草原英才”滚动支持；内蒙古科技计划项目，内蒙古自治区人才开发基金，内蒙古自治区留学归国人员科技活动项目。

参考文献

- [1] Yang, F., Yang, X., Li, Z., *et al.* (2015) Overexpression and Characterization of a Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *T. aotearoense*, with High Specific Activity for Cellobiose. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **99**, 8903-8915. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6619-9>
- [2] Yang, S., Hua, C., Yan, Q., *et al.* (2013) Biochemical Properties of a Novel Glycoside Hydrolase Family 1 β -Glucosidase (PtBglu1) from *Paecilomyces thermophila* Expressed in *Pichia pastoris*. *Carbohydrate Polymers*, **92**, 784-791. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.086>
- [3] Mallek-Fakhfakh, H. and Belghith, H. (2016) Physicochemical Properties of Thermotolerant Extracellular β -Glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and Enzymatic Synthesis of Cello-Oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, **419**, 41-50.
- [4] Taku, U., Katusro, Y. and Kentaro, M. (2015) Glucose-Tolerant β -Glucosidase Retrieved from a Kusaya Gravy Metagenome. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 548.
- [5] 刘震, 朱秋享, 石贤爱, 等. β -葡萄糖苷酶体外分子改造研究进展[J]. 福州大学学报, 2015(4): 565-571.
- [6] Albaser, A., Kazana, E., Bennett, M., *et al.* (2016) Discovery of a Bacterial Glycoside Hydrolase Family 3 (GH3) β -Glucosidase with Myrosinase Activity from a Citrobacter Strain Isolated from Soil. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **64**, No. 7.
- [7] 于海玲. 黑葡萄穗霉中 β -葡萄糖苷酶及 β -木糖苷酶基因的克隆、表达与酶学分析[D]: [硕士学位论文]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2013.
- [8] Bešić, L., Ašić, A., Muhović, I., *et al.* (2017) Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Brassica oleracea*. *Journal of Food Processing and Preservation*, **41**, e12764. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12764>
- [9] Kar, B., Verma, P., Haan, R.D., *et al.* (2017) Characterization of a Recombinant Thermostable β -Glucosidase from *Pu-tranjiva roxburghii* Expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Use for Efficient Biomass Conversion. *Process Biochemistry*, **63**, 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.08.005>
- [10] Zhang, L., Fu, Q., Li, W., *et al.* (2017) Identification and Characterization of a Novel β -Glucosidase via Metagenomic Analysis of *Bursaphelenchus xylophilus* and Its Microbial Flora. *Scientific Reports*, **7**, 14850. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14073-w>
- [11] 陈静, 郝伟伟, 王春梅, 等. 产 β -葡萄糖苷酶真菌的筛选鉴定、纯化及酶学性质分析[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 191-196.
- [12] 郑芳, 曹小芳, 张亚玲, 等. 一株 β -葡萄糖苷酶产生菌株的分离鉴定及酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(8): 1059-1068.
- [13] Ma, Y., Liu, X., Yin, Y., *et al.* (2015) Expression Optimization and Biochemical Properties of Two Glycosyl Hydro-

- lase Family 3 Beta-Glucosidases. *Journal of Biotechnology*, **206**, 79-88.
- [14] Tang, H., Hou, J., Shen, Y., Xu, L., Yang, H., Fang, X. and Bao, X. (2013) High Beta-Glucosidase Secretion in *Saccharomyces cerevisiae* Improves the Efficiency of Cellulase Hydrolysis and Ethanol Production in Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, **23**, 1577-1585.
- [15] Yan, Q., Hua, C., Yang, S., *et al.* (2012) High Level Expression of Extracellular Secretion of a β -Glucosidase Gene (PtBglu3) from *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression & Purification*, **84**, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.04.016>
- [16] Liu, D., Zhang, R., Yang, X., *et al.* (2012) Characterization of a Thermostable β -Glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and Its Functional Expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories*, **11**, 25. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-25>
- [17] Treebupachatsakul, T., Nakazawa, H., Shinbo, H., *et al.* (2015) Heterologously Expressed *Aspergillus aculeatus* β -Glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* Is a Cost-Effective Alternative to Commercial Supplementation of β -Glucosidase in Industrial Ethanol Production Using *Trichoderma reesei* Cellulases. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, **121**, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.05.002>
- [18] Zhao, L., Zhou, T., Li, X., *et al.* (2013) Expression and Characterization of GH3 β -Glucosidase from *Aspergillus niger* NL-1 with High Specific Activity, Glucose Inhibition and Solvent Tolerance. *Microbiology*, **82**, 356-363. <https://doi.org/10.1134/S0026261713030181>
- [19] Tang, Z., Liu, S., Jing, H., *et al.* (2014) Cloning and Expression of *A. oryzae* β -Glucosidase in *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports*, **41**, 7567-7573. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3644-1>
- [20] Kim, Y.J., Lee, J.E., Lee, H.S., *et al.* (2015) Novel Substrate Specificity of a Thermostable β -Glucosidase from the Hyperthermophilic Archaeon, *Thermococcus pacificus* P-4. *The Korean Journal of Microbiology*, **51**, 68-74.
- [21] Souza, F.H.M., Meleiro, L.P., Machado, C.B., *et al.* (2017) Gene Cloning, Expression and Biochemical Characterization of a Glucose- and Xylose-Stimulated β -Glucosidase from *Humicola insolens* RP86. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, **106**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.04.007>
- [22] Singhania, R.R., Patel, A., Pandey, A., *et al.* (2017) Genetic Modification: A Tool for Enhancing Beta-Glucosidase Production for Biofuel Application. *Bioresource Technology*, **245**, 1352-1361.
- [23] Ramani, G., Meera, B., Vanitha, C., *et al.* (2015) Molecular Cloning and Expression of Thermostable Glucose-Tolerant β -Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1 in *Pichia pastoris* and Its Characterization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **42**, 553-565. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1549-6>
- [24] Yang, X., Ma, R., Shi, P., *et al.* (2014) Molecular Characterization of a Highly-Active Thermophilic β -Glucosidase from *Neosartorya fischeri* P1 and Its Application in the Hydrolysis of Soybean Isoflavone Glycosides. *PLoS ONE*, **9**, e106785.
- [25] 杨晓宽. β -葡萄糖苷酶研究进展[J]. 河北科技师范学院学报, 2012, 26(1): 77-81.
- [26] 李斐然, 刘石生, 王海燕. 橡胶籽中 β -葡萄糖苷酶活力测定条件研究[J]. 食品科技, 2011(5): 264-267.
- [27] 梁华正, 刘富梁, 彭玲西, 等. 京尼平苷为底物测定 β -葡萄糖苷酶活力的方法[J]. 食品科学, 2006, 27(4): 182-185.
- [28] 李旭晖, 朱明军, 郭启军. 一种测定粗纤维素酶中 β -葡萄糖苷酶酶活方法的建立[J]. 现代食品科技, 2010, 26(3): 323-325.
- [29] 桑苇. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶对葡萄酒酶解增香调控及风味物质影响的研究[J]. 江南大学, 2015, 41(5).
- [30] Kim, B.N., Yeom, S.J., Kim, Y.S., *et al.* (2012) Characterization of a β -Glucosidase from *Sulfolobus solfataricus* for Isoflavone Glycosides. *Biotechnology Letters*, **34**, 125-129. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0739-9>
- [31] 陈盛, 何念海. 136 例新生儿坏死性小肠结肠炎临床分析[J]. 重庆医学, 2004, 33(4): 494-496.
- [32] 王丹. β -葡萄糖苷酶在新生儿坏死性小肠结肠炎患者血清中的浓度测定及意义[J]. 重庆医学, 2012, 41(32): 3410-3411.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：amb@hanspub.org