

研究报告

疏绵状嗜热丝孢菌外切 β -葡聚糖酶的基因克隆与酶学特征

王瑞杰¹ Nokuthula Peace Mchunu^{2*} 牛丹丹³ Kugenthiren Permaul² Suren Singh²

刘晓光^{1*} 路福平¹

(1. 天津科技大学生物工程学院 天津 300457)

(2. Department of Biotechnology & Food Technology, Faculty of Applied Sciences, Durban University of Technology,
P.O. Box 1334, Durban, 4001, South Africa)

(3. 福州大学生物科学与工程学院 福建 福州 350116)

摘要:【目的】疏绵状嗜热丝孢菌是一种嗜热丝状真菌，具有合成与分泌多种耐热酶的能力，从中找寻酶活高、耐热性能优良的 β -葡聚糖酶。【方法】对疏绵状嗜热丝孢菌其中一个外切 β -葡聚糖酶的编码基因 *glnB* 进行克隆，并在毕赤酵母 GS115 中表达。【结果】在摇瓶水平上重组菌的产酶活为 11.5 U/mL，重组酶在 SDS-PAGE 中的大小约为 48 kD。重组 GlnB 最适作用温度为 65 °C，最适作用 pH 为 5.0；在低于 50 °C 或 pH 3.0–10.0 之间具有良好稳定性。重组酶水解海带三糖，首先生成单糖和二糖，延长酶作用时间，可以进一步将其中的二糖部分水解为单糖。【结论】疏绵状嗜热丝孢菌来源的重组酶 GlnB 为外切 β -葡聚糖酶，具有较好的耐热性能和 pH 稳定性。

关键词: 疏绵状嗜热丝孢菌，外切 β -葡聚糖酶，酶学特征

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31461143026); Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (No. 14JCQNJC09200)

***Corresponding author:** E-mail: Nokuthula Peace Mchunu: nokuthula@dut.ac.za; LIU Xiao-Guang: liu_xg@tust.edu.cn
Received: May 09, 2015; **Accepted:** June 23, 2015; **Published online** (www.cnki.net): September 09, 2015

基金项目: 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(No. 31461143026); 天津市应用基础与前沿技术研究计划(青年)项目(No. 14JCQNJC09200)

***通讯作者:** E-mail: Nokuthula Peace Mchunu: nokuthula@dut.ac.za; 刘晓光: liu_xg@tust.edu.cn

收稿日期: 2015-05-09; **接受日期:** 2015-06-23; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-09-09

Gene cloning and biochemical properties of *Thermomyces lanuginosus* exo- β -glucanase

WANG Rui-Jie¹ Nokuthula Peace Mchunu^{2*} NIU Dan-Dan³ Kugenthiren Permaul²
Suren Singh² LIU Xiao-Guang^{1*} LU Fu-Ping¹

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Department of Biotechnology & Food Technology, Faculty of Applied Sciences, Durban University of Technology, P.O. Box 1334, Durban, 4001, South Africa)

(3. College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350116, China)

Abstract: [Objective] Thermophilic filamentous fungus *Thermomyces lanuginosus* is capable of secreting a host of thermostable enzymes. We are committed to find a high activity and thermostable β -glucanase gene. [Methods] A novel exo- β -glucanase gene (*glnB*) was cloned from *T. lanuginosus* and successfully expressed in *Pichia pastoris* GS115. [Results] SDS-PAGE shows that GlnB has a molecular weight of about 48 kD. Levels of recombinant GlnB reached 11.5 U/mL in the flask fermentation broth of recombinant *Pichia* cells. GlnB exhibited optimum temperature and pH at 65 °C and 5.0, respectively, and was stable below 50 °C and over the pH range 3.0–10.0. Hydrolysis of laminarin by the recombinant GlnB produced monosaccharide and disaccharide, and extended incubation resulted in partial hydrolysis of disaccharide. [Conclusion] The recombinant enzyme GlnB from *T. lanuginosus* is an exo- β -glucanase and has good command of thermo stability and pH stability.

Keywords: *Thermomyces lanuginosus*, Exo- β -glucanase, Enzymological property

β -葡聚糖以右旋葡萄糖为基本单位, 通过 β -1,3-(1,4)-糖苷键聚合而成, 是植物细胞壁的主要组成物质^[1-2]。通常谷物中含有较为丰富 β -葡聚糖, 海洋来源的生物物质如海藻^[3]、海带^[4]也含有较多的 β -葡聚糖。 β -葡聚糖水溶液的浓度越高, 黏度就越大^[5], 是食品加工和动物饲料中需要克服的关键因素之一。通过酶法对 β -葡聚糖进行不同程度的降解, 有助于改善啤酒成品的品质^[6], 提高动物对饲料中营养的利用率^[7-8]。在发酵工业中, β -葡聚糖的酶法水解有助于提高以生物物质为主要原料的工业产品的生产效率^[9-10]。此外, 对 β -葡聚糖的适度修饰, 在纺织工业中也具有重要应用价值^[11]。

工业上使用的 β -葡聚糖酶主要来源于 2 个方面, 解淀粉芽孢杆菌为代表的细菌 β -1,3-(1,4)-葡聚糖酶^[12]和丝状真菌来源的 β -1,4-葡聚糖酶^[13-14]。找寻耐热性优良的真菌 β -1,3-葡聚糖酶一直是研究者追求的目标。已知疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus* SSBP)具有丰富的半纤维素酶酶活, 但其降解纤维素的能力很弱, 原因未知^[15-16]。随着本

研究外方课题组南非德班理工大学对 *T. lanuginosus* SSBP 基因组的解析完成^[17], 研究其基因组中单个相关 β -葡聚糖酶编码基因成为可能。为此, 本研究根据疏绵状嗜热丝孢菌的基因组测序信息, 对疑似 β -葡聚糖酶的编码基因 *glnB* 进行基因克隆与表达, 并进一步研究与阐明重组酶酶学特征。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

T. lanuginosus SSBP 菌株及基因组测序信息由南非德班理工大学提供^[17]; *Pichia pastoris* GS115 用作表达宿主, 由天津科技大学酶与应用微生物实验室保藏。质粒 pPIC9k 用作表达载体构建质粒, 大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 用于质粒构建, 由天津科技大学酶与应用微生物实验室保藏。

1.2 主要试剂及培养基

限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*Sal* I 和 T4 DNA 连接酶、质粒小量提取试剂盒、小量 DNA 产物纯化回收试剂盒、小量 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂

盒和 1st Strand cDNA Synthesis Kit 均购自 Thermo 公司; G418 购自 Invitrogen 公司; 酵母基本氮源培养基购自 Sigma 公司; 底物海带三糖(Laminarin)购自 Aladdin 公司, 分子式 $C_{18}H_{32}O_{16}$, 其他生化试剂均为分析纯级别, 购自 Merck 公司。

MMH-CMC 培养基: 琼脂 20 g/L, 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 5 g/L, YNB 1.34%, Biotin 0.02%, 甲醇 0.5%。 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

LB、YPD、MD、G418-YPD、BMGY、BMMY 等培养基及其配制方法参考 Invitrogen 公司的 *Pichia* Expression Kit。

1.3 疏绵状嗜热丝孢菌 β -葡聚糖酶基因的克隆

疏绵状嗜热丝孢菌 *glnB* 基因原始核苷酸序列来自于疏绵状嗜热丝孢菌 SSBP 基因组测序信息^[17], 通过计算机分析并设计寡核苷酸引物, 用于对其成熟肽编码序列的扩增。引物通过化学合成(Inqaba Biotech 公司, 南非)获得。

将疏绵状嗜热丝孢菌接种到 50 mL PDA 液体培养基中, 于 50 °C、150 r/min 培养 36 h 后, 使用纱布过滤菌丝。菌丝体经液氮研磨后, 采用 Trizol 提取总 RNA, 以此为基础合成单链 cDNA。再以 cDNA 为模板扩增目的基因, 上游引物序列为: 5'-CGCGAATTTCGCGCTACGCCGACAGG-3'; 下游引物序列为: 5'-TAAGCGGCCGCTCATTGCTGAAACAACGCCACG-3'。

PCR 反应体系: 10×PCR buffer 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 8 μ L, 上下游引物(20 pmol/L)各 2 μ L, cDNA 2 μ L, *Taq* DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 补加超纯水至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物纯化后交上海生工生物工程股份有限公司进行核苷酸序列测定。

1.4 表达质粒 pPIC9K-*glnB* 的构建

将 PCR 产物用 DNA 产物纯化试剂盒纯化回收, 再用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切并纯化; pPIC9K 载体用 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切并纯化回收后, 与

目的片段进行连接。连接物用热激法转化入大肠杆菌 JM109。重组质粒分别用 *EcoR* I 和 *EcoR* I/*Not* I 对重组载体进行单双酶切验证, 酶切方法按照 Thermo 说明书进行操作。琼脂糖凝胶电泳检测目的条带大小。

1.5 重组毕赤氏酵母的遗传转化及发酵

将重组质粒 pPIC-*glnB* 经 *Sal* I 线性化后, 转化入毕赤氏酵母 GS115, 涂布于 MD 平板, 30 °C 培养至转化子长出。将长出的转化子依次点接到 G418 终浓度分别为 0.5 g/L 和 2 g/L 的 YPD 平板, 30 °C 培养 3–5 d 后, 选取 2 株菌落较大、长势较好的酵母转化子进行 PCR 验证。

按照 *Pichia* Expression Kit 提供的方法进行摇瓶发酵。发酵完成后, 12 000 r/min 离心 5 min 收集发酵液, 所得的上清液即为粗酶液, 保存到新的离心管中。

1.6 重组 β -葡聚糖酶水解试验

使用刚果红透明圈法初步筛选阳性表达子: 将筛选好的高拷贝转化子点接到 MMH-CMC 平板上, 在平板中央点接毕赤酵母 GS115 原始菌作为对照。每 24 h 添加 200 μ L 甲醇于平板盖上, 将平板在 30 °C 条件下倒置培养 3 d。在平板中加入 30 mL 0.1%的刚果红溶液, 浸泡 30 min 后, 弃去刚果红溶液, 然后用 1 mol/L NaCl 溶液浸泡 15 min 以脱去刚果红的颜色。对光观察平板, 有透明圈产生的即为阳性转化子, 通过透明圈大小可以初步判断转化子表达的酶活力大小。

1.7 重组酶的分析

1.7.1 重组酶的酶活测定: 取一定稀释倍数的 100 μ L 粗酶液(空白组加入 100 μ L 水, 对照组使用 100 μ L 毕赤酵母 GS115 发酵液), 加入 0.9 mL 0.5%底物(海带三糖, 使用 0.2 mol/L pH 5.0 的醋酸缓冲液配制), 50 °C 反应 10 min, 加入 2 mL DNS, 沸水浴 5 min, 定容至 25 mL, 测定 OD_{540} 下的吸光度值, 换算为还原糖的含量。酶活定义: 在 pH 6.0 温度为 50 °C 的条件下, 每分钟催化产生 1 μ mol 还原糖(葡萄糖)

所需要的酶量为 1 U。

1.7.2 重组酶学性质分析：将发酵液上清用缓冲液稀释为酶液，分别在不同温度及不同 pH 条件下，按照 1.7.1 中的方法测定 β -葡聚糖酶酶活。最适温度确定试验在 40–80 °C 下进行，热稳定性试验在 40–80 °C 条件下先保温 2 h，每隔 30 min 取样，在冰上放置 10 min 后，测定酶活，以未进行热处理的酶液酶活力为 100%，计算相对酶活，确定 β -葡聚糖酶的温度稳定性。最适 pH 确定试验在 pH 1.2–10.0 的缓冲液中进行，于 30 °C 保温 1 h 后测定酶活，以未进行 pH 作用的酶活力为 100% 计算残余酶活力，确定 β -葡聚糖酶的 pH 稳定性。

1.7.3 酶解产物组分分析：按照 1.7.1 的方法，将酶液与底物在 50 °C 下准确反应 10、30 和 60 min 后，沸水浴 10 min 对酶液进行灭活处理，使用 0.45 μ m 过滤膜过滤反应液，用于液相色谱检测。色谱分析条件：色谱柱：Bio-Rad Aminex HPX-87H (9 μ m \times 300 mm \times 7.5 mm)；柱温：65 °C；流动相：5 mmol/L H₂SO₄ ddH₂O；流速：0.6 mL/min；进样体积：10 μ L；检测器：RID 示差折光检测器。

2 结果与分析

2.1 *glnB* 序列信息分析

glnB 基因完整阅读框大小为 1 260 bp，编码 419 个氨基酸，使用 DNAMAN 预测其蛋白大小为 46.6 kD。SignalP 4.1 信号肽预测结果显示，位于 GlnB 的 N 端包含一个长为 23 氨基酸残基的信号肽，剪切位点为 AQA-ST。

多序列比对结果表明，GlnB 与来自 *Talaromyces cellulolyticus*、*Talaromyces stipitatus* ATCC 10500 和 *Rasamsonia emersonii* CBS 393.64 的外切 β -1,3-葡聚糖酶基因 GAM38244.1、XP_002483905.1 和 KKA20841.1 所编码的氨基酸序列的一致性较高，分别为 66%、65% 和 63%，此外，通过 NCBI-CDD 预测 *glnB* 所编码的蛋白属于糖苷水解酶第 5 家族，保守区域为 84–152 氨基酸残基。使用在线工具 PDB 及 Swiss-Model 进行综合比对分

析，预测 GlnB 可能是一个外切 β -1,3-葡聚糖酶。

2.2 *glnB* 基因克隆、重组质粒构建与重组菌筛选

提取疏绵状嗜热丝孢菌的总 RNA 并合成单链 cDNA，以 cDNA 为模板 PCR 扩增基因 *glnB*，使用 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切 PCR 产物并连接到载体 pPIC9K 中，获得重组质粒 pPIC9K-*glnB*。重组质粒在 *EcoR* I 单酶切条带大小约为 10.6 kb，在 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切下得到 9.3 kb 和 1.3 kb 两条带，表明重组表达质粒构建成功。

将重组质粒 pPIC9K-*glnB* 用 *Sal* I 进行线性化，通过电转化将目的基因整合到 *P. pastoris* GS115 染色体 DNA 上。分别经过营养互补筛选(MD 平板)、G418 抗性复筛、PCR 扩增验证以及 MMH-CMC 水解圈筛选，获得具有较好分泌 β -葡聚糖酶的重组酵母，将其命名为 GS115-*glnB*。GS115-*glnB* 在 MD 平板上生长良好，可以在浓度为 2 g/L 的 G418 平板上生长，在 MMH-CMC 平板上经甲醇诱导后可以形成明显水解圈图 1A，表明 *T. lanuginosus* SSBP 来源的 β -葡聚糖酶在 *P. pastoris* GS115 中成功得到分泌表达。在 250 mL 三角瓶中进行甲醇诱导摇瓶发酵试验。重组菌 GS115-*glnB* 在甲醇的诱导下能够持续合成与分泌 β -葡聚糖酶，使用 DNS 法测定酶活，在发酵进行到 144 h 时，其产酶水平达到最高，为 11.5 U/mL；对照组无酶活。SDS-PAGE 电泳结果如图 1B 所示。

2.3 重组外切 β -葡聚糖酶 GlnB 的酶学性质分析

2.3.1 最适反应温度和温度稳定性：在不同温度条件下对重组酶的酶活进行测定，结果如图 2 所示。重组 GlnB 的最适作用温度为 65 °C，在 50–75 °C 下仍然呈现很高的酶活。进一步测定重组酵母分泌表达的 β -葡聚糖酶的热稳定性，将重组酶酶液分别在 40–80 °C 下保温 2 h，每隔 30 min 取样，在冰上放置 10 min 后，再按照酶活测定方法及条件下测定残留酶活。重组 GlnB 在 40–50 °C 保温 2 h 后酶活仍保存 90% 左右；在 55–60 °C 处理 30 min，酶活保留 60%–95%；而在 70–80 °C 保温 30 min 后酶活

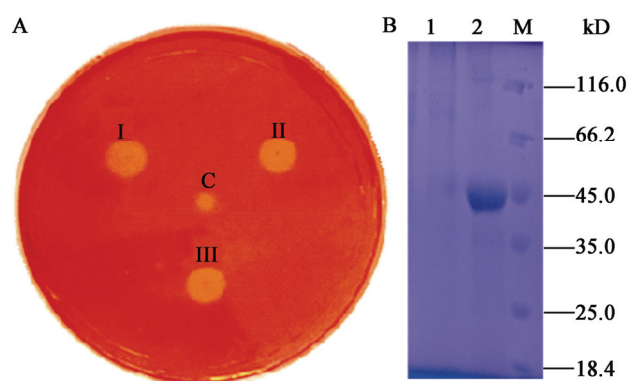


图 1 MMH-CMC 筛选平板检测转化子产酶情况(A)及 SDS-PAGE 电泳(B)结果

Figure 1 Recombinants grew on MMH-CMC plate (A) and SDS-PAGE (B)

注: I、II、III: GS115-glnB 重组菌; C: 毕赤酵母 GS115. 1: 毕赤酵母 GS115; 2: GlnB; M: 标准蛋白分子量.

Note: I, II, III: Recombinants GS115-glnB; C: Host *P. pastoris* GS115. 1: *P. pastoris* GS115; 2: GlnB; M: PageRuler unstained protein ladder.

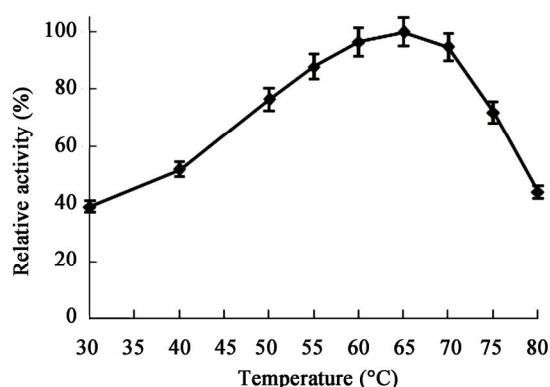


图 2 温度对 GlnB 酶活性的影响

Figure 2 Effect of temperature on GlnB activity

分别仅残留 10%左右。表明 GlnB 具有一定热温度稳定性。

2.3.2 最适反应 pH 和 pH 稳定性: 在不同 pH 条件下测定重组 β -葡聚糖酶的酶活确定最适反应 pH, 结果如图 3 所示。重组 β -葡聚糖酶在 pH 5.0 下表现出最高酶活力, 在 pH 4.5–5.5 之间仍具有很好的酶活力。pH 高于 6.0 之后则酶活下降明显, 显示 GlnB 属于酸性 β -葡聚糖酶。重组 β -葡聚糖酶的 pH 稳定性实验结果如图 3 所示, 在 pH 3.0–10.0 之间缓冲

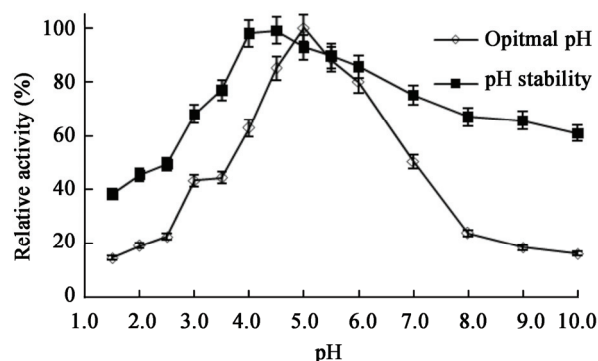


图 3 pH 对 GlnB 酶活性的影响

Figure 3 Effect of pH on recombinant GlnB activity

液处理 1 h 后酶活仍能保持 60%以上, 在 pH 4.0–5.0 条件下十分稳定, 重组 β -葡聚糖酶具有良好的 pH 稳定性。

2.4 重组酶作用海带三糖的酶解成分分析

实验已经显示, GlnB 具有水解 CMC 的能力, 为了确定其具有水解 β -1,3 糖苷键的活性, 进一步以海带三糖为底物进行水解试验。取 0.5% 海带三糖 900 μ L 作为底物, 加入 100 μ L 重组 GlnB 粗酶液, 反应不同时间后, 利用 HPLC 分析酶解产物, 结果如图 4 所示。对比液相图谱可以看出, GlnB 具有水解海带三糖的能力, 底物海带三糖的含量随着时间的推移在不断减少, 葡萄糖的含量随之增加; 与葡萄糖不断积累不同, 海带二糖生成后处于缓慢减少状态, 表明 GlnB 也具有一定的水解海带二糖的能力, 水解活力不及水解海带三糖。

3 讨论

目前, 国内外对于 β -葡聚糖酶的研究大多集中于内切 β -葡聚糖酶, 有关外切 β -葡聚糖酶的报道则相对较少。已知的外切 β -葡聚糖酶基因主要来源于芽胞杆菌、木霉和青霉等具有较强降解纤维素能力的菌株, 近些年也有少量来自于黑曲霉的报道。如庞浩等^[18]从地衣芽胞杆菌中克隆到一条外切 β -葡聚糖酶基因 *celB*; 赵萱等^[19]从草酸青霉中克隆了外切 β -葡聚糖酶基因 *cbh1*; 唐自钟等^[20]在毕赤酵母中表达了来自黑曲霉的外切 β -葡聚糖酶基因 *cbhB*。然

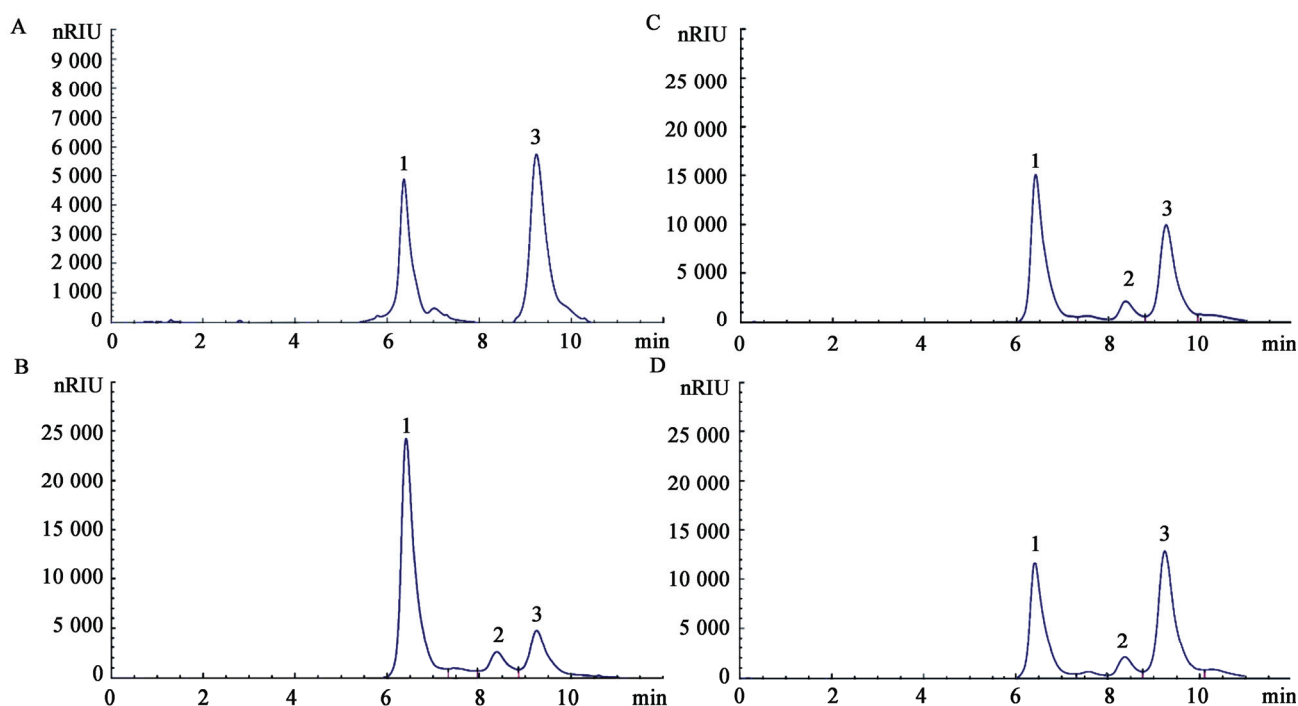


图4 重组 β -葡聚糖酶水解海带三糖的产物分析

Figure 4 HPLC profile of laminarin hydrolyzed with the recombinant GlnB

注: A: 海带三糖和葡萄糖标品; B、C、D: 海带三糖与酶作用 10、30 和 60 min 分析图。1: 海带三糖; 2: 海带二糖; 3: 葡萄糖。
 Note: A: Laminarin and glucose as standard reference; B, C, D: Laminarin hydrolyzed with the enzyme for 10, 30 and 60 min. 1: Laminarin; 2: DP2 (disaccharide); 3: Glucose.

而截止目前很少有外切 β -葡聚糖酶基因来自于嗜热丝状真菌的报道。

T. lanuginosus 具有丰富的半纤维素酶活性, 能分泌多种耐热的酶^[15-16], 因此可作为出发菌株进行 β -葡聚糖酶基因克隆及表达的研究。通过实验研究确定, 重组 GlnB 具有水解 CMC 释放还原糖的能力, 且能够水解海带三糖释放葡萄糖, 表明其基本上是一种具有外切活性的 β -葡聚糖酶, 即 *glnB* 编码一个具有外切活性的 β -葡聚糖酶, 是目前为止第一个被鉴定的来源于 *T. lanuginosus* 的 β -葡聚糖酶。*glnB* 与现有的外切 β -葡聚糖酶基因的同源性也较低^[21], 有助于丰富 β -葡聚糖酶的生物信息数据。然而, 由于没有获得更为合适的底物, 关于其外切酶类别的推断会在后续研究中进一步加以研究与确定。

重组 GlnB 在摇瓶水平上酶活达到 11.5 U/mL, 最适反应温度为 65 °C, 在不低于 55 °C 的条件下具

有很好的稳定性, 较已报道的多数重组外切 β -葡聚糖酶相比具有诸多优质特性^[20], 更适合工业生产的需要。如使用超声波复合酶法提取海带多糖^[22]需要在 55 °C 酶解 210 min, 用确定组分的内、外切 β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶替代纤维素酶可能有利于提高海带多糖的得率及纯度。此外, 借助本研究结果, 进一步筛查 *T. lanuginosus* SSBP 基因组信息, 发现至少还有 4 个开放读框可能编码 β -葡聚糖酶, 此将是后续继续研究的新内容。

参考文献

- [1] Varghese JN, Garrett TP, Colman PM, et al. Three-dimensional structures of two plant beta-glucan endohydrolases with distinct substrate specificities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(7): 2785-2789
- [2] Zhou P, Chen ZZ, Yan QJ, et al. The structure of a glycoside hydrolase family 81 endo- β -1,3-glucanase[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2013, 69(10): 2027-2038
- [3] Zhou CX, Tian T, Chen HM, et al. Bioactivities of β -glucan in

- six marine microalgae[J]. *Oceanologia ET Limnologia Sinica*, 2014, 45(1): 66-72 (in Chinese)
- 周成旭, 田甜, 陈海敏, 等. 海洋微藻 β -葡聚糖的生物活性分析[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(1): 66-72
- [4] Zheng L, Han P, Liu T, et al. Fluorescence quantitative detection and extraction process optimization of laminarin from kelp[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(5): 75-80 (in Chinese)
- 郑立, 韩平, 刘涛, 等. 海带中昆布素的荧光定量检测及提取工艺优化[J]. *海洋科学*, 2012, 36(5): 75-80
- [5] Yadamoe T. Structure and biological activities of fungal beta-1,3-glucans[J]. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 2000, 120(5): 413-431
- [6] Celestino KRS, Cunha RB, Felix CR. Characterization of a β -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry[J]. *BMC Biochemistry*, 2006, 7(1): 23
- [7] Zhang YH, Xu XL, Zhou XJ, et al. Overexpression of an acidic endo- β -1,3,4-glucanase in transgenic maize seed for direct utilization in animal feed[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81993
- [8] Michalko J, Socha P, Mészáros P, et al. Glucan-rich diet is digested and taken up by the carnivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.): implication for a novel role of plant β -1,3-glucanases[J]. *Planta*, 2013, 238(4): 715-725
- [9] Rodriguez-Nogales JM, Fernández-Fernández E, Gómez M, et al. Antioxidant properties of sparkling wines produced with β -glucanases and commercial yeast preparations[J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(9): C1005-C1010
- [10] Sutivisedsak N, Leathers TD, Bischoff KM, et al. Novel sources of β -glucanase for the enzymatic degradation of schizophyllan[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, 52(3): 203-210
- [11] Shimonaka A, Koga J, Baba Y, et al. Specific characteristics of family 45 endoglucanases from *Mucorales* in the use of textiles and laundry[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(4): 1013-1016
- [12] Masilamani R, Sharma OP, Muthuvel SK, et al. Cloning, expression of β -1,3-1,4 glucanase from *Bacillus subtilis* SU40 and the effect of calcium ion on the stability of recombinant enzyme: *in vitro* and *in silico* analysis[J]. *Bioinformation*, 2013, 9(19): 958-962
- [13] Damásio ARL, Ribeiro LFC, Ribeiro LF, et al. Functional characterization and oligomerization of a recombinant xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (GH12) from *Aspergillus niger*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2012, 1824(3): 461-467
- [14] Wang K, Luo HY, Shi PJ, et al. A highly-active endo-1,3-1,4- β -glucanase from thermophilic *Talaromyces emersonii* CBS394.64 with application potential in the brewing and feed industries[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(9): 1448-1456
- [15] Singh S, Madlala AM, Prior BA. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(1): 3-16
- [16] Singh S, Du Preez JC, Pillay B, et al. The production of hemicellulases by *Thermomyces lanuginosus* strain SSBP: influence of agitation and dissolved oxygen tension[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(5): 698-704
- [17] Mchunu NP, Permaul K, Abdul Rahman AY, et al. Xylanase superproducer: genome sequence of a compost-loving thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* strain SSBP[J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(3): e00388-13
- [18] Pang H, Chen Y, Wu QQ, et al. Exploring and function characteristics of exo-1,4- β -D-glucanase CelB gene of *Bacillus licheniformis*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(9): 151-157 (in Chinese)
- 庞浩, 陈燕, 吴倩倩, 等. 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 外切葡聚糖酶 CelB 基因的发掘及功能鉴定[J]. *生物技术通报*, 2013(9): 151-157
- [19] Zhao X, Dun BQ, Gu JG, et al. Cloning of an exo- β -1,4-D-glucanases gene (*cbh1*) from *Penicillium oxalicum*, its expression in *Pichia pastoris* and characterization of recombination CBH1[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(6): 1127-1135 (in Chinese)
- 赵萱, 顿宝庆, 顾金刚, 等. 草酸青霉外切葡聚糖酶基因 (*cbh1*) 克隆及其在毕赤酵母中的表达和重组外切葡聚糖酶特性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(6): 1127-1135
- [20] Tang ZZ, Liu S, Han XY, et al. Screening and identification of exo-1,4- β -D-glucanase-producing fungi, and its expression in *Pichia pastoris*[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(4): 629-635 (in Chinese)
- 唐自钟, 刘珊, 韩学易, 等. 产外切葡聚糖酶真菌的筛选鉴定及毕赤酵母中的表达[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(4): 629-635
- [21] Fujii T, Koike H, Sawayama S, et al. Draft genome sequence of *Talaromyces cellulolyticus* strain Y-94, a source of lignocellulosic biomass-degrading enzymes[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(1): e00014-15
- [22] Liu ZX, Liu JF, Xu F, et al. Technique optimization for extracting *Laminaria japonica* polysaccharide by ultrasonic compound enzyme method[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 41(20): 8467-8469 (in Chinese)
- 刘志新, 刘金富, 徐凤, 等. 超声波复合酶法提取海带多糖的工艺优化[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(20): 8467-8469