

重组根瘤农杆菌葡萄糖耐受型 β -葡萄糖苷酶性质

郭华 边英男 刘锐 郑茂发 黄伟达*

(复旦大学生物化学与分子生物学系 上海 200433)

摘 要: 目前已发现的葡萄糖耐受型 β -葡萄糖苷酶均来源于真菌, 尚无原核细胞来源的相关报道。从根瘤农杆菌 *LBA4404* 中克隆 β -葡萄糖苷酶基因 *bgl*, 将其构建在表达载体 pET-28b 上, 转化 *Escherichia coli* RP (DE3), IPTG 诱导表达。重组 β -葡萄糖苷酶的比活高达 36.7 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。对经过 Ni 柱纯化的重组酶进行酶学分析发现: 该酶是糖基水解酶家族 1 的成员, 底物亲和力高, 专一性低, 在温度为 40°C 和 pH 在 5–8 之间时具有较高的酶活, 在低于 40°C 和 pH 5–10 之间时可稳定保存。以 pNP- β -Glc 为底物, 该酶的最适 pH 为 6.4, 最适温度为 60°C, 在 37°C 和 pH 6.4 的反应体系中, 该酶的 K_m 为 0.09 mmol/L, 竞争性抑制剂葡萄糖酸- δ -内酯和葡萄糖的 K_i 分别为 0.03 mmol/L 和 75 mmol/L, 具有很高的葡萄糖耐受性, 当金属离子 Ag^+ 和 Zn^{2+} 存在时, 酶活被明显抑制。该酶对 pNP- β -Gal 和 pNP- α -Glc 的 K_m 分别为 3.61 mmol/L 和 14.31 mmol/L。

关键词: β -葡萄糖苷酶, 根瘤农杆菌 *LBA4404*, 葡萄糖耐受性

Enzymatic Characterization of a Novel Glucose-tolerant β -glucosidase from *Agrobacterium tumefaciens*

GUO Hua BIAN Ying-Nan LIU Rui ZHENG Mao-Fa HUANG Wei-Da*

(School of Biochemistry and Molecular Biology, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: To date, the glucose-tolerant β -glucosidase has not been found in prokaryocyte. In the present study, the β -glucosidase gene *bgl* from the *Agrobacterium tumefaciens* str. *LBA4404* was cloned into the expression vector pET-28b and transformed into *Escherichia coli* RP (DE3). Bacteria containing positive clone were routinely grown and IPTG was added to induce the expression of recombinant protein. The β -glucosidase activity of crude extracts was found up to 36.7 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$. Enzymatic study was performed on the recombinant β -glucosidase purified with Ni column and found that this Bgl bore high substrate affinity and low substrate specificity, which belonged to the carbohydrate hydrolase superfamily 1. This β -glucosidase displayed quite high activity at pH 5–8 and 40°C, and was able to be stored quite stably at pH 5–10 and under 40°C. Using pNP- β -Glc as the substrate, the optimum pH and temperature of the hydrolysis reaction were revealed to be 6.4 and 60°C, and the K_m of Bgl was 0.09 mmol/L at pH 6.4 and 37°C. It was inhibited by the competitive inhibitor glucono- δ -lactone (K_i 0.03 mmol/L) and resistant to the inhibition of glucose (K_i 75 mmol/L). We also found that Ag^+ and

Zn^{2+} strongly inhibited the activity of Bgl. Its K_m for pNP- β -Gal and pNP- α -Glc were respectively 3.61 mmol/L and 14.31 mmol/L.

Keywords: β -glucosidase, *Agrobacterium tumefaciens* str. LBA4404, Glucose tolerance

β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶(β -D-Glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21), 又称 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase), 其主要的生物学功能是催化 β -葡萄糖苷键水解生成葡萄糖和相应的配基, 广泛存在于细菌、真菌、植物和动物体内。

β -葡萄糖苷酶有多种工业化应用。在能源工业上, 自然界木质纤维原料中纤维素的高效水解是生产燃料乙醇的关键技术, β -葡萄糖苷酶能将纤维二糖水解成葡萄糖, 是纤维素水解过程中的限速酶^[1]; 在食品开发上, β -葡萄糖苷酶作为风味酶应用在果汁、茶汁和果酒等产品的制备上, 起到很好的增香效果^[2]; 在饲料工业上, 通过 β -葡萄糖苷酶辅助降解植物的细胞壁, 使细胞内部的蛋白质等营养物质释放出来, 同时被降解的纤维素更易被畜禽消化吸收, 提高饲料利用率进而降低畜禽的生产成本^[3]; 在医疗保健方面, 银杏、大豆等黄酮类糖苷是保健品及药品的重要组成成分, 但该类黄酮类糖苷的生物活性和人体吸收率远低于其水解后生成的黄酮类苷元, 利用 β -葡萄糖苷酶水解黄酮类糖苷可以明显提高其生物利用率^[4-5]。

β -葡萄糖苷酶的水解产物葡萄糖能抑制 β -葡萄糖苷酶的活性。在已被研究的 β -葡萄糖苷酶中, 绝大多数 β -葡萄糖苷酶被葡萄糖强烈抑制^[6-8], 而有文献报道的葡萄糖耐受型 β -葡萄糖苷酶均来源于真菌, 表达量很低, 不能大量生产^[1,9-10]。因此, 寻找高表达量的葡萄糖耐受型 β -葡萄糖苷酶以满足工业化要求就显得至关重要。

我们在筛选多种细菌来源的 β -葡萄糖苷酶后发现, 根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 来源的 β -葡萄糖苷酶 Bgl, 其葡萄糖的 K_i 高达 75 mmol/L, 具有很高的葡萄糖耐受性; 将其构建在 pET-28b 上, 转化 *Escherichia coli* RP (DE3), IPTG 诱导表达, 重组酶的比活为 36.7 IU/mg, 具有很高的表达量。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

E. coli RP (DE3)购自美国 Stratagene 公司;

E. coli Top10、根瘤农杆菌 LBA4404 购自美国 Invitrogen 公司; pET-28b 购自美国 Novagen 公司。

1.2 酶与试剂

限制性内切酶、PrimerSTAR HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 生物技术公司(中国, 大连); Agarose 购自 Gene Tech 公司(中国, 上海); DNA 凝胶回收试剂盒购自美国 Axygen 公司; PCR 引物由上海英俊生物技术有限公司合成; DNA 序列分析工作由上海英俊生物技术有限公司完成; LB 培养基由本实验室根据分子克隆实验指南(第 2 版)配制; 卡那霉素、IPTG、咪唑购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; Ni 柱购自德国 Merck 公司; Hi-Trap Desalting Column 购自 Amersham 公司; BCA 蛋白质含量测定试剂盒购自上海荔达生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯级。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成: 目前尚无根瘤农杆菌 LBA4404 *bgl* 相关序列报道。故根据已报道的根瘤农杆菌 C58 全基因组 DNA 序列(GenBank accession No. NC_003063), 设计外侧引物 F1/R1 和内侧引物 F2/R2, 采用套式 PCR 扩增 *bgl*(表 1)。

表 1 用于克隆 <i>bgl</i> 的引物		
Table 1 Primers for the amplification of <i>bgl</i> with nested PCR		
引物 Primers	序列(5'→3') Sequences for primers (5'→3')	限制性内切酶位点 Restriction endonuclease site
F1	CGCATCCTGAAACGTTGTAGATT	
R1	GGAAACTGATAATAAGGGG AGAGA	
F2	CGGGATCCTATGACCGATCCCC AAACGCTTG	<i>Bam</i> H I
R2	CCCAAGCTTTCACCCCTTCACC ACACCATGG	<i>Hind</i> III

1.3.2 根瘤农杆菌 LBA4404 基因组 DNA 的提取: 用 CTAB 法提取根瘤农杆菌 LBA4404 基因组 DNA。

1.3.3 *bgl* 的克隆: 以抽提的基因组 DNA 为模板, 采用套式 PCR 扩增得到目的片段。PCR 反应条件如下: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 7 min。将扩增得到的目的片段纯化、酶切、回收, 连接到表达载体 pET-28b 上, 通过

CaCl₂ 法转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 经筛选及鉴定后得到阳性重组质粒 pET-28b-*bg1*。pET-28b-*bg1* 进行双向测序, 测序得到的 DNA 序列翻译成蛋白质序列后与根瘤农杆菌 C58 β -葡萄糖苷酶 1 的蛋白质序列比较, 同源性高达 95.3%。考虑到 PCR 过程有可能造成基因突变, 故而重复过程 1.3.2 和 1.3.3, 新得到的阳性重组质粒测序结果与先前一样, 因此基本上排除了所得蛋白质是突变蛋白质的可能性。将 pET-28b-*bg1* 转入 *E. coli* RP (DE3) 的感受态细胞中, 经筛选后获得含有重组质粒的菌株 RP-pET-28b-*bg1*。

1.3.4 Bg1 的诱导表达: 从菌株 RP-pET-28b-*bg1* 的平板上挑选单克隆接种到 2 mL 含卡拉霉素 10 mg/L 的 LB 培养基中, 在 37°C、200 r/min 下振荡培养 8 h。按 1% 的接种量将 2 mL 母液接种到 200 mL 含卡那霉素 10 mg/L 的 LB 培养基中, 在 37°C、200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 达 0.7 左右, 加入 IPTG 使其终浓度为 0.45 mmol/L, 再在 25°C 振荡培养 10 h; 7000 r/min 离心 15 min 收集菌体。

1.3.5 Bg1 的纯化: 离心收集的菌体经溶菌酶 37°C 处理 30 min, 超声破壁, 7000 r/min 离心 20 min 得到上清, 上清通过 Ni 柱纯化后得到高纯度的 Bg1, 再通过脱盐柱(HiTrap desalting column)除去盐和咪唑, 最后保存在含 20% 甘油的 PBS 溶液中, 冻存于 -80°C。

1.3.6 酶活的测定: 反应体系为 500 μ L, 酶稀释一定倍数以后与 2 mmol/L 底物 pNP- β -Glc 进行反应, 反应 Buffer 为 pH 6.4 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液, 反应温度 37°C, 反应时间 10 min; 以 500 μ L 1 mol/L Na₂CO₃ 终止反应, 之后取 100 μ L 液体到酶标板上在 405 nm 波长下进行测定^[11]。将每分钟生成 1 μ mol 对硝基苯酚(*p*-nitrophenol)所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(IU)。

2 结果与分析

2.1 Bg1 的诱导表达和纯化

以含 20 mmol/L Tris-Cl, 200 mmol/L NaCl, pH 7.5 的上样 Buffer 平衡 Ni 柱, 以含 20 mmol/L Tris-Cl, 200 mmol/L NaCl, 100 mmol/L 咪唑, pH 7.5 的清洗 Buffer 清洗上过样品的 Ni 柱, 以含 20 mmol/L Tris-Cl, 200 mmol/L NaCl, 150 mmol/L 咪唑和 250 mmol/L 咪唑, pH 7.5 的洗脱 Buffer 洗脱目的蛋

白质。由实验结果可知, Bg1 被成功诱导表达出来; 含 100 mmol/L 咪唑的清洗 Buffer 能将柱子非特异性结合的蛋白质完全清洗下来, 同时, 少量 Bg1 也会被清洗下来; 含 250 mmol/L 咪唑的洗脱 Buffer 能将柱子特异性结合的 Bg1 全部洗脱下来, 而含 150 mmol/L 咪唑的洗脱 Buffer 只能将与柱子特异性结合的 Bg1 部分洗脱下来。推测可能的原因是部分 Bg1 在折叠过程中, 其 N 端 His-Tag 上的 6 个 His 没有完全暴露在蛋白质外部, 导致这些蛋白质和 Ni²⁺ 之间的亲和力较低, 可以被含较低浓度咪唑的 Buffer 洗脱下来(图 1)。

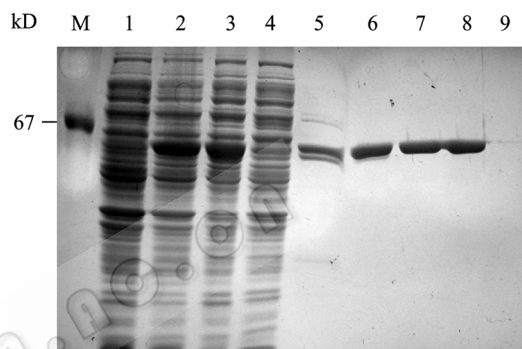


图 1 Bg1 的诱导表达及 Ni 柱纯化

Fig. 1 Induced expression and purification of Bg1

Note: M: 67 kD; 1: RP-pET-28b-*bg1* (No induced); 2: RP-pET-28b-*bg1* (IPTG induced); 3: Crude extracts; 4: Crude extracts pass through Ni column; 5: 100 mmol/L imidazole wash; 6: 150 mmol/L imidazole elution; 7,8: 250 mmol/L imidazole elution; 9: 100 mmol/L EDTA wash.

2.2 酶的基本性质

2.2.1 酶的最适 pH: 酶稀释一定倍数后与 2 mmol/L pNP- β -Glc 进行反应, 反应温度 37°C。反应 Buffer 为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液, 其能配制成 pH 2.2–8.0 的缓冲溶液, 选择 pH 4.0、5.0、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.4、8.0 进行实验。由实验结果可知, 其最适 pH 6.4, 在 pH 5.0–8.0 之间保持较高的酶活性(图 2A)。

2.2.2 酶的 pH 稳定性: 用 HCl、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、Na₃PO₄、NaOH 配置 pH 1–13 的缓冲溶液, 反应前, 将酶的贮存液用上述 pH 1–13 的缓冲溶液稀释 100 倍后, 在 0°C 保存 1 h, 然后再稀释一定倍数后与 2 mmol/L pNP- β -Glc 反应。反应 Buffer 为 pH 6.4 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液, 反应温度 37°C。由实验结果可知, 其在 pH 5–10 之间可长时间保存而不易失活(图 2B)。

2.2.3 酶的最适温度: 酶稀释一定倍数后与 2 mmol/L pNP- β -Glc 进行反应, 反应 Buffer 为 pH 6.4 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液。选择 30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C 作为反应温度分别进行实验。由实验结果可知, 其最适温度为 60°C, 在 40°C–60°C 之间保持较高的酶活性(图 2C)。

2.2.4 酶的热稳定性: 反应前, 酶的贮存液分别在 30°C、40°C、50°C、60°C、70°C 保存 1 h, 然后稀释一定倍数后与 2 mmol/L pNP- β -Glc 反应。反应 Buffer 为 pH 6.4 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液, 反应温度 37°C。由实验结果可知, 酶的热稳定性较差, 不能在高于 40°C 的温度下保存较长时间(图 2D)。

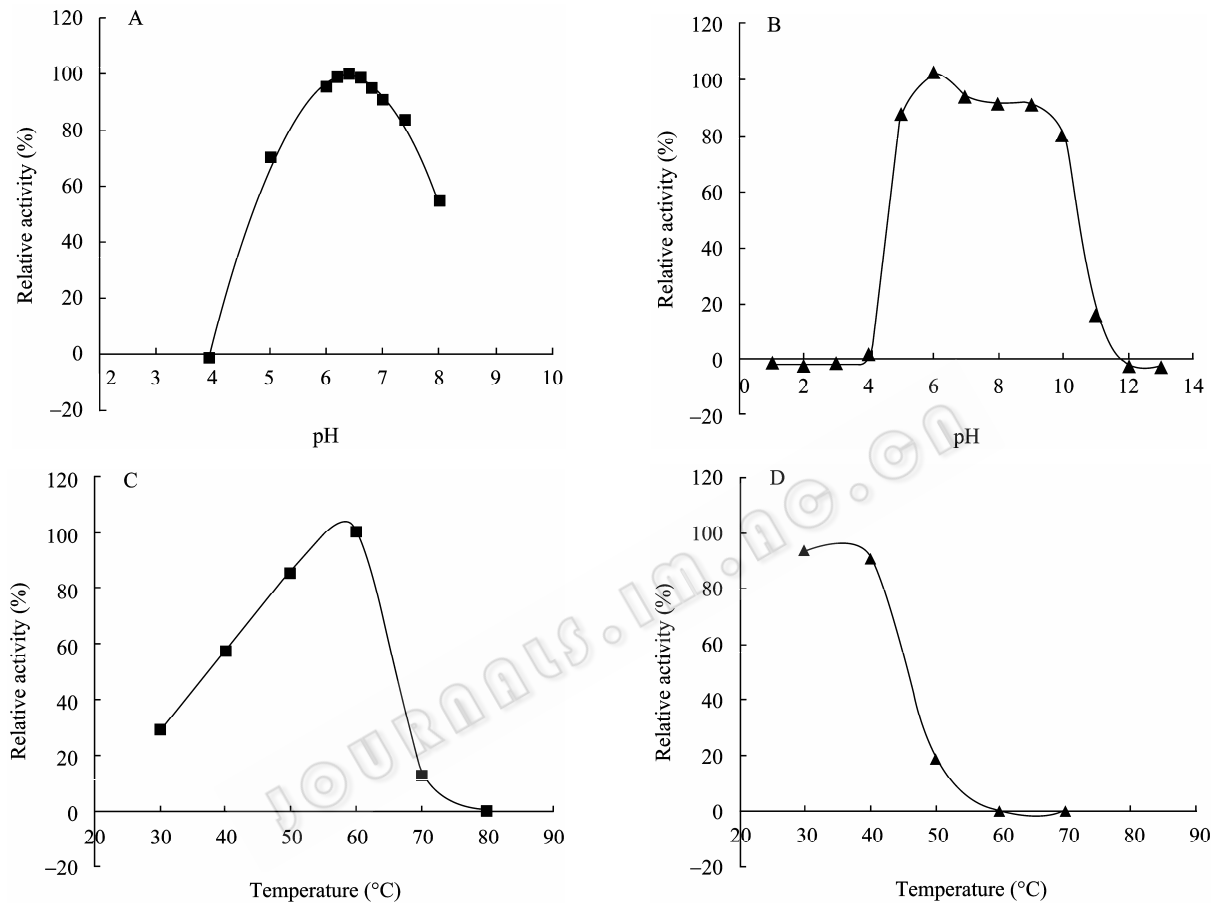


图 2 pH、温度对 Bg1 酶活性及稳定性的影响

Fig. 2 Effect of pH and temperature on the activity and stability of Bg1

Note: A: Effect of pH on the activity of Bg1; B: Effect of pH on the stability of Bg1; C: Effect of temperature on the activity of Bg1; D: Effect of temperature on the stability of Bg1.

2.2.5 酶的底物专一性及对不同底物的 K_m : 酶稀释一定倍数后与底物进行反应, 反应 Buffer 为 pH 6.4 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液, 反应温度 37°C。以 pNP- β -Glc 为底物时, 底物终浓度分别为 0.125、0.25、0.5 和 1 mmol/L, 以 pNP- β -Gal 和 pNP- α -Glc 为底物时, 底物终浓度分别为 1、2、4、8 mmol/L。以 Lineweaver-Burk 法作图求 K_m 。由实验结果可知, 酶与最适底物 pNP- β -Glc 的 K_m 为 0.09 mmol/L, 表明其与 $\beta(1,4)$ Glc 有很高的亲和力; 同时, 该酶还能催化 $\beta(1,4)$ Gal 和 $\alpha(1,4)$ Glc 的水解, 故其底物专一性较低(表 2)。

表 2 Bg1 对不同底物的 K_m		
Table 2 K_m of different substrates on purified Bg1		
底物 Substrate	糖苷键类型 Linkage of glycosyl group	K_m (mmol/L)
pNP- β -Glc	$\beta(1,4)$ Glc	0.09
pNP- β -Gal	$\beta(1,4)$ Gal	3.61
pNP- α -Glc	$\alpha(1,4)$ Glc	14.31

2.2.6 酶的竞争性抑制剂葡萄糖酸- δ -内酯和葡萄糖的 K_i : 反应前, 酶稀释一定倍数后与不同浓度的抑制剂在 37°C 作用 5 min, 再与不同浓度的 pNP- β -Glc 进行反应。反应 Buffer 为 pH 6.4 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液, 反应温度 37°C。葡萄

糖酸- δ -内酯终浓度梯度为 0、0.1 和 0.2 mmol/L，葡萄糖终浓度梯度为 50、100 和 200 mmol/L。pNP- β -Glc 终浓度分别为 0.125、0.25、0.5 和 1 mmol/L，由实验结果可知，葡萄糖酸- δ -内酯的 K_i 为 0.03 mmol/L，能强烈抑制酶的活性；葡萄糖的 K_i 为 75 mmol/L，表明酶具有很高的葡萄糖耐受性(图 3, 4)。

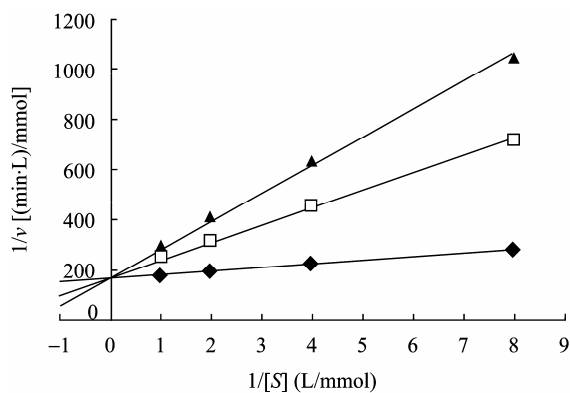


图 3 葡萄糖酸- δ -内酯存在下 Lineweaver-Burk 图
Fig. 3 Lineweaver-Burk plot of Bgl in the presence of glucono- δ -lactone
Note: \blacklozenge — \blacklozenge : No inhibitor; \square — \square : 0.1 mmol/L glucono- δ -lactone; \blacktriangle — \blacktriangle : 0.2 mmol/L glucono- δ -lactone.

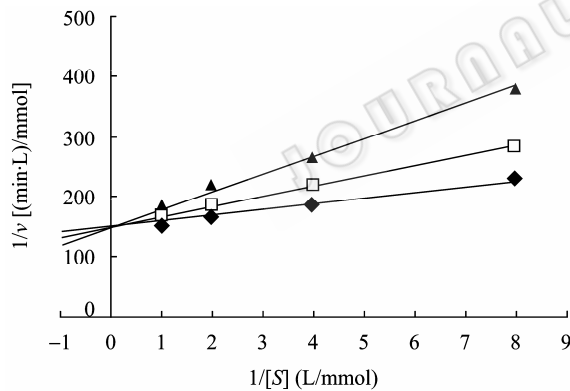


图 4 葡萄糖存在下 Lineweaver-Burk 图
Fig. 4 Lineweaver-Burk plot of Bgl in the presence of glucose
Note: \blacklozenge — \blacklozenge : 50 mmol/L glucose; \square — \square : 100 mmol/L glucose; \blacktriangle — \blacktriangle : 200 mmol/L glucose.

2.2.7 不同金属离子对酶活的影响: 酶稀释一定倍数后与 2 mmol/L pNP- β -Glc 进行反应，金属离子终浓度 1 mmol/L，反应温度 37℃。因为磷酸氢根离子能与部分金属离子生产沉淀，因此这里的反应 Buffer 采用 pH 6.4 的柠檬酸三钠-柠檬酸缓冲溶液。由实验结果可知， Ag^+ 、 Zn^{2+} 对酶活有明显的抑制作用(表 3)。

表 3 不同金属离子对 Bgl 酶活的影响
Table 3 Effects of different metal cation on the activity of Bgl

金属离子 Metal cation ^a	酶切效率 Relative initial rate of hydrolysis (%)
Control	100.00
CaCl ₂	102.39
BaCl ₂	101.59
LiCl	99.80
CoCl ₂	98.41
MgCl ₂	97.08
KCl	95.23
AlCl ₃	91.72
FeSO ₄	89.23
CuCl ₂	84.37
NiSO ₄	78.26
FeCl ₃	71.43
MnCl ₂	62.53
ZnSO ₄	28.66
AgNO ₃	4.41

Note: ^a: Activity of the purified Bgl was assayed in the presence of various metal cation at a concentration of 1 mmol/L.

3 讨论

根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的 β -葡萄糖苷酶 Bgl 自被发现以来，尚无后续研究报道。目前，根据酶的结构相似性和催化结构域氨基酸序列相似性，糖基水解酶被分为 88 个家族。 β -葡萄糖苷酶被归入家族 1、家族 3 和家族 30^[12]。通过序列分析和结构预测，我们发现 Bgl 属于家族 1，具有该家族特有的氨基酸保守序列以及 $(\beta/\alpha)_8$ 桶式模块。

已报道的葡萄糖耐受型 β -葡萄糖苷酶均来源于真菌，尚无原核细胞来源的相关报道。本文所研究的 Bgl 来源于原核细胞根瘤农杆菌 *LBA4404*，以 pNP- β -Glc 为底物，其葡萄糖的 K_i 高达 75 mmol/L，具有很高的葡萄糖耐受性。这是首次在原核细胞中发现葡萄糖耐受型 β -葡萄糖苷酶，具有重要的指导意义。

目前，进行工业化应用的 β -葡萄糖苷酶一般来源于微生物，主要有两种获得方法：(1) 通过黑曲霉 (*Aspergillus niger*)直接表达纯化^[13]；(2) 将基因克隆到不同的工程菌中进行表达纯化，例如将多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)等原核细胞的 β -葡萄糖苷酶基因重组到 *E. coli* BL21 (DE3)中进行表达^[14]，将木霉菌(*Trichoderma reesei*)等真核细胞的 β -葡萄糖苷

酶基因构建到酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中进行表达^[15]。在这些已获得的 β -葡萄糖苷酶中, 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶底物亲和力低^[16], 且生产周期很长, 至少 120 h^[13]; 其他细菌来源的 β -葡萄糖苷酶专一性高, 一般只对 $\beta(1,4)\text{Glc}$ 起作用^[14,17], 且目前已有报道的具备工业化应用前景的酶的表达量最高仅为 14.9 IU/mg^[14]。本文研究的 Bgl 通过 pET 表达系统在 *E. coli* RP (DE3) 中进行重组表达, 生产周期只需 20 h 左右, 而表达量高达 36.7 IU/mg; 同时, 该酶不仅底物亲和力高, 与最适底物 pNP- β -Glc 的 K_m 为 0.09 mmol/L, 而且专一性低, 能与 $\beta(1,4)\text{Gal}$ 和 $\alpha(1,4)\text{Glc}$ 起作用; 该酶在 pH 5–8 之间和 40°C 时具有较高酶活性, 满足在温和条件下水解多种糖苷底物的工业化应用要求, 还可用于酶制剂的开发。

参 考 文 献

- [1] Saha BC, Bothast RJ. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel β -glucosidase from *Candida pelata*. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(9): 3165–3170.
- [2] Gueguen Y, Chemardin P, Janbon G, *et al.* A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. *J Agric Food Chem*, 1996, **44**(8): 2336–2340.
- [3] 王志江, 魏红福. β -葡萄糖苷酶的研究. 饲料工业, 2006, **27**(22): 20–22.
- [4] 徐茂军. β -葡萄糖苷酶对豆奶及豆奶粉中大豆异黄酮糖苷化合物的转化作用研究. 中国食品学报, 2005, **5**(4): 328–331.
- [5] 伍毅, 王洪新. β -葡萄糖苷酶水解银杏黄酮糖苷的研究. 安徽农业科学, 2008, **36**(1): 30–32.
- [6] Bothast RJ, Saha BC. Ethanol production from agricultural biomass substrates. *Adv Appl Microbiol*, 1997(44): 261–286.
- [7] Gueguen Y, Chemardin P, Arnaud A, *et al.* Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. *Enzyme Microb Technol*, 1995, **17**(10): 900–906.
- [8] Woodward J, Wiseman A. Fungal and other β -D-glucosidases-their properties and applications. *Enzyme Microb Technol*, 1982, **4**(2): 73–79.
- [9] Benoliel B, Poças-Fonseca MJ, Torres FA, *et al.* Expression of a glucose-tolerant beta-glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, **160**(7): 2036–2044.
- [10] Decker CH, Visser J, Schreier P. Beta-glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties. *J Agric Food Chem*, 2000, **48**(10): 4929–4936.
- [11] 李华, 高丽. 葡萄浆果中 β -葡萄糖苷酶活性测定条件的研究. 酿酒科技, 2007(8): 146–149.
- [12] Bhatia Y, Mishra S, Bisaria VS. Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2002, **22**(4): 375–407.
- [13] 王春丽, 武改红, 陈畅, 等. 黑曲霉原生质体诱变选育 β -葡萄糖苷酶高产菌株. 生物工程学报, 2009, **25**(12): 1921–1926.
- [14] 赵云, 刘伟丰, 毛爱军, 等. 多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*) β -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质分析. 生物工程学报, 2004, **20**(5): 741–744.
- [15] Cummings C, Fowler T. Secretion of *Trichoderma reesei* beta-glucosidase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 1996, **29**(3): 227–233.
- [16] 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.
- [17] 房伟, 方泽民, 刘娟娟, 等. 新型海洋微生物 β -葡萄糖苷酶基因的克隆、表达及重组酶性质. 生物工程学报, 2009, **25**(12): 1914–1920.