

一株 β -葡萄糖苷酶产生菌株的分离鉴定及酶学性质研究

郑芳 曹小芳 张亚玲 白芳* 白钢

(南开大学 药学院 天津市分子药物研究重点实验室 天津 300071)

摘要: 【目的】分离获得 β -葡萄糖苷酶高产菌株, 确定该菌分类地位, 并对其所产 β -葡萄糖苷酶的酶学性质进行初步研究。【方法】采用七叶灵显色法从土壤样品中筛选 β -葡萄糖苷酶产生菌, 再用对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)显色法进行复筛; 通过形态特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列相似性分析等方法确定其分类学地位; 利用超滤、疏水层析、阴离子层析、分子筛层析法对 β -葡萄糖苷酶进行分离纯化; 以 PNPG 为底物, 测定 β -葡萄糖苷酶的最适反应 pH 及最适反应温度, 通过双倒数作图法确定 β -葡萄糖苷酶催化不同底物水解的米氏常数 K_m 值。【结果】从土壤样品中筛选得到一株 β -葡萄糖苷酶高产菌株 ZF-6C, 初步鉴定为 *Bacillus korensis*; 芽胞杆菌 ZF-6C 所产 β -葡萄糖苷酶的分子量约为 90 kD, 最适反应 pH 和温度分别为 7.0 和 40 °C, 该酶具有水解 $\beta(1,4)$ 糖苷键的活性, 最适底物为邻硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷, K_m 值为 0.73 mmol/L。金属离子 Ca^{2+} 、 Pb^{2+} 增强酶活, 而 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 抑制酶活。【结论】首次报道从 *Bacillus korensis* 中分离得到 β -葡萄糖苷酶, *Bacillus korensis* ZF-6C 所产 β -葡萄糖苷酶在分子量、最适反应条件及底物特异性等方面均不同于已知酶, 可能为一结构新颖且催化效率较高的 β -葡萄糖苷酶。

关键词: 芽胞杆菌, 分离鉴定, β -葡萄糖苷酶, 酶学性质

Isolation and identification of a β -glucosidase-producing strain and enzymatic characteristics of the β -glucosidase

ZHENG Fang CAO Xiao-Fang ZHANG Ya-Ling BAI Fang* BAI Gang

(College of Pharmacy and Tianjin Key Laboratory of Molecular Drug Research, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: [Objective] To isolate a novel β -glucosidase-producing strain from soil, to clarify the taxonomic status, and to study the enzymatic characteristics of the β -glucosidase. [Methods] A β -glucosidase-producing strain was isolated from soil sample using esculin and 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) coloration methods; the taxonomic status of strain ZF-6C was clarified by morphological, physiological, chemotaxonomic characteristics and 16S rDNA analysis; the β -glucosidase was isolated and purified by ultra-filtration, hydrophobic interaction chromatography, anion chromatography, molecular sieve chromatography; with PNPG as the substrate, the optimal reaction pH and temperature of β -glucosidase were determined, the Michaelis constant K_m of β -glucosidase against different substrates were determined by Lineweaver-Burk plot. [Results] A strain, which produced β -glucosidase at high level, was isolated from soil and identified as *Bacillus korensis*, the molecular weight of β -glucosidase isolated from *Bacillus* ZF-6C was 90 kD, the optimum reaction conditions for this enzyme were pH 7.0 and 40 °C. The enzyme was active against a wide range of β (1,4) linked disaccharides, the optimal substrate was *o*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, the K_m value was 0.73 mmol/L. Metal ions Ca^{2+} and Pb^{2+} enhanced enzyme activity, Cu^{2+} and Fe^{2+} inhibit the enzyme activity. [Conclusion] This is the first report of isolation and identification of β -glucosidase from *Bacillus korensis*. The β -glucosidase from *Bacillus korensis* is widely different to known enzymes at molecular weight, optimum reaction conditions and substrate specificity aspects. This β -glucosidase may have novel structure and high catalytic efficiency.

Keywords: *Bacillus korensis*, Isolation and identification, β -glucosidase, Enzymatic properties

β -葡萄糖苷酶 (β -Glucosidase, EC 3.2.1.21) 可以催化水解芳香基或烃基与糖基之间的糖苷键^[1]。目前已发现的糖苷酶主要来自于细菌、真菌和植物,不同来源的酶在分子大小及催化特性等方面存在较大差异^[2]。 β -葡萄糖苷酶在很多行业内广泛应用,具有巨大的商业价值,例如,作为饮料的前提物释放风味成分^[3-5],生产燃料乙醇^[6],作为洗涤剂的有效成分^[7]。但是,目前国内报道的糖苷酶主要来源于真菌,且最适 pH 多集

中在 3.5-5.5,限制了它在工业上的应用^[8],特别是在食品行业,存在食品安全卫生方面的隐患^[2]。所以,人们一直在积极寻找能产生中性 β -葡萄糖苷酶的高产菌株^[9-10]或新菌株。

七叶灵(6,7-2-羟基-香豆素- β -D-葡萄糖苷)在 β -葡萄糖苷酶的作用下能生成葡萄糖和七叶苷原(6,7-2-羟基-香豆素),七叶苷原能和 Fe^{3+} 作用呈现棕黑色^[11]。七叶灵显色技术可应用于 β -葡萄糖苷酶产生菌株的筛选、 β -葡萄糖苷酶提纯时的样

品检测、非变性聚丙烯酰胺凝胶活性染色, 以七叶灵为作用底物检验和判断 β -葡萄糖苷酶的方法具有高分辨率和灵敏性, 而且操作简易、快速、经济^[12]。本研究利用七叶灵显色法从土壤中分离筛选得到一株产胞外中性 β -葡萄糖苷酶菌株 ZF-6C, 通过 16S rDNA 序列相似性分析等方法鉴定其种属的基础上对其所产酶的酶学特性进行研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 土壤样品: 采集自天津市塘沽区泰枫公园。

1.1.2 主要试剂: 对硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷(*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, PNPG)、对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, PNP)、七叶灵(Esculin hydrate)以及各种 β -葡萄糖苷酶底物均购自 Sigma 公司; 丙烯酰胺、谷氨酸钠、柠檬酸铁铵等试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基: 富集筛选培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母浸膏 3, 氯化钠 5, pH 7.4-7.6; 初筛培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 3, 氯化钠 5, 七叶灵 0.1, 柠檬酸铁铵 0.2, 琼脂 15, pH 7.4-7.6。

1.2 产酶菌株的筛选

1.2.1 初筛: 取 1 g 土样, 加入 10 mL 无菌水, 振荡片刻, 制成悬液, 取 1 mL 悬液于富集培养基中进行富集培养, 37 °C、180 r/min 培养 24 h。参照文献[11], 取富集培养液适当稀释后涂布于初筛培养基平板, 37 °C 培养 24 h, 用牙签挑取周围有黑色显色的单菌落进一步划线纯化。

1.2.2 复筛: 将初筛到的菌株分别接种到 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 24-36 h, 发酵液 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 进行酶活力测定, 每个菌株重复 3 次。

1.2.3 酶活性测定方法: 取 96 孔板, 加入发酵液上清 10 μ L, 0.1 mol/L pH 7.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓

冲液(CP) 80 μ L, 50 mmol/L PNPG 10 μ L, 于 37 °C 保温 15 min。空白对照以 LB 培养基代替发酵液上清, 其余同上。反应完毕后, 加入 100 μ L 1 mol/L Na_2CO_3 显色, 用酶标仪测 450 nm 处吸光度(OD_{450})。1 个酶活力单位 (U) 定义为: pH 7.0、37 °C 条件下, 每分钟生成 1 μ mol PNP 所需的酶量。

1.3 菌种鉴定

委托中国工业微生物菌种保藏管理中心完成菌种鉴定工作。

1.4 酶的分离纯化

将 7.5 L 粗酶液过截留分子量为 10 kD 的中空纤维素柱, 粗酶液浓缩至 300 mL, 12 000 r/min 离心 30 min 后, 上清与 2 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ 等比混合, 加到已用 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ 平衡好的 HiTrapTM phenyl FF 疏水柱上, 用 1-0 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ 进行线性洗脱, 设定洗脱速度为 1 mL/min, 洗脱时间 120 min。活性部分收集合并后, 再加入到用 20 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 平衡好的 HiTrapTM Q_{HP} 阴离子交换柱, 用 0-500 mmol/L NaCl 进行线性洗脱, 设定洗脱速度为 1 mL/min, 洗脱时间 160 min。活性组分合并后, 超滤浓缩至 5 mL, 加到 Sephacryl S200 (16/60) 分子筛凝胶柱上, 用 CP 缓冲液洗脱, 收集有酶活性的部分, 用于酶学性质研究。纯化各步骤均通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测酶的纯度及分子量。蛋白质浓度测定采用 BCA 试剂盒法, 以 BSA 制作标准曲线对蛋白浓度进行测定。

1.5 β -葡萄糖苷酶的活性染色

将纯化后的酶液, 进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE), 具体方法见参考文献[13]。凝胶用考马斯亮蓝 G250 染色, 并对应用 0.04% 七叶灵和 0.6% 柠檬酸铁铵进行活性染色。

1.6 酶学性质研究

1.6.1 酶最适反应 pH: 用柠檬酸、 Na_2HPO_4 、 Na_2CO_3 配制缓冲液, 用此缓冲液配制 pH 2.0-11.0

的系列梯度酶液, 37 °C 条件下分别测定酶活, 以最高酶活为 100%, 其余为相对酶活, 每组重复 3 次。

1.6.2 酶最适反应温度: 在最适 pH 条件下, 在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 温度梯度下分别测定酶活, 以最高酶活为 100%, 其余为相对酶活, 每组重复 3 次。

1.6.3 酶的热稳定性和 pH 稳定性: 将等量酶液分别在 40 °C、50 °C、60 °C 条件下保温 1 h, 冷却后, 于酶的最适条件下测定酶活, 以未作处理酶液的酶活力为 100%, 以相对酶活确定酶的热稳定性, 每组做 3 个平行试验。将等量酶液分别加入到 pH 2.0–9.0 的 CP 缓冲液中, 37 °C 保温 1 h, 于最适条件下测定酶活, 以未作处理酶液的酶活力为 100%, 以相对酶活确定酶的 pH 稳定性, 每组做 3 个平行试验。

1.6.4 米氏常数(K_m 值)的测定: 在 pH 7.0、温度 37 °C 条件下, 测定 β -葡萄糖苷酶在不同底物浓度下的酶活力, 利用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法, 求出 K_m 值。

1.6.5 金属离子对酶活的影响: 在反应体系中添加一定浓度的金属离子 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Na^+ 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 至终浓度为 1 mmol/L,

在最适反应条件下, 以 PNPG 作为底物测定酶活。以未加入金属离子的酶液为对照组, 设其酶活为 100%。

2 结果与分析

2.1 β -糖苷酶产生菌的初筛和复筛

采用七叶灵平板显色法对来自土壤样品的菌落进行初筛, 通过观察菌落周围黑色显色的有无, 确定 β -葡萄糖苷酶产生菌, 初筛得到 18 株活性菌株。经 PNPG 复筛后, 选取酶活性最高的菌株 ZF-6C (图 1), 进行后续研究。

2.2 菌种鉴定

菌株 ZF-6C 细胞呈杆状, $0.7 \mu m \times (2.2-3.6) \mu m$ (图 2A); 芽孢椭圆形, 近中生, 孢囊膨大; 革兰氏染色阳性。在营养琼脂培养基上菌落乳白色, 圆形, 扁平, 湿润, 表面光滑, 不透明, 边缘较整齐(图 2B)。

采用 MEGA 4.1 软件, 邻位连接法显示菌株 ZF-6C 与相关种的 16S rDNA 序列系统发育树。如图 3 所示, 菌株 ZF-6C 与 *Bacillus korensis* 模式株聚在一个系统发育分支, 序列同源性大于 99.3%。结合形态学特征和生理生化特征(表 1), 将菌株 ZF-6C 初步确定为 *Bacillus korensis*。

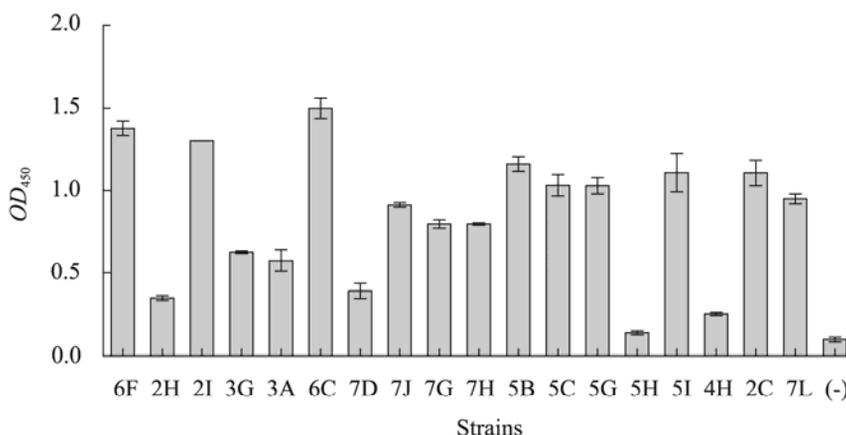


图 1 β -葡萄糖苷酶活性菌株复筛结果

Fig. 1 The second screening of β -glucosidase producing strains

2.3 β -葡萄糖苷酶的分离纯化

菌株 ZF-6C 在 LB 液体培养基中发酵 24 h 后可获得 β -葡萄糖苷酶 1 780 U/mL, 粗酶液经过超滤、疏水层析、阴离子层析、分子筛层析后得到 β -葡萄糖苷酶纯酶, 经 SDS-PAGE 检测分子量约

为 90 kD, 纯度 >90%, 纯化了 484 倍, 比活力为 1.64×10^5 U/mg (表 2, 图 4)。在 Native-PAGE 中, 考马斯亮蓝染色带 (图 4, Lane 7) 与七叶灵活性染色带 (图 4, Lane 8) 均为一条明亮的单带, 说明菌株 ZF-6C 所产 β -葡萄糖苷酶可能为单体酶。

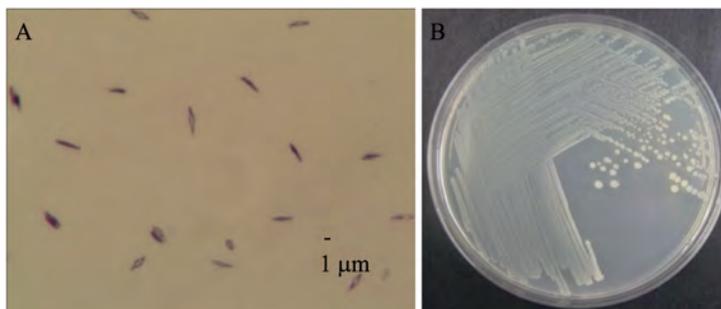


图 2 菌株 ZF-6C 的菌体及菌落形态

Fig. 2 Morphological characteristics of strain ZF-6C

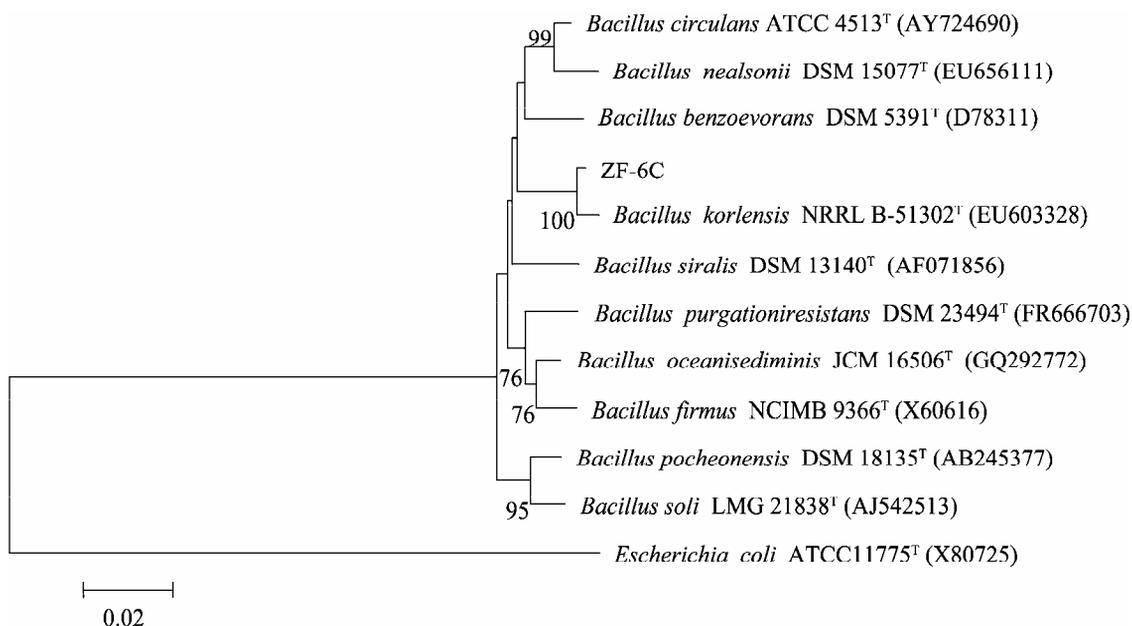


图 3 ZF-6C 与相关种的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 3 Molecular phylogenetic consensus of strain ZF-6C based on nearly complete 16S rRNA gene sequences

注: 括号内为 GenBank 检索号; 进行 1 000 次的相似度重复计算; 图中发育树节点只显示 Bootstrap 值大于 50% 数值; 比例尺为 2% 的序列差异。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the bootstrap values with >50% support. Bar: 2% sequence divergence.

表 1 菌株 ZF-6C 的生理生化特性
Table 1 The physiological and biochemical characteristics of ZF-6C

特征 Characteristics	结果 Results	特征 Characteristics	结果 Results
Oxidase	+	5% NaCl	+
Nitrate reduction	+	10% NaCl	-
Esculin hydrolysis	+	Acid production from	
Arginine dihydrolase	-	L-arabinose	+
Citrate utilization	-	Glycogen	+
Contact enzyme	+	L-rhamnose	+
Indole	-	D-xylose	+
Tryptophan deaminase	-	D-sorbitol	-
Ornithine decarboxylase	-	D-galactose	+
Starch hydrolysis	+	Lactose	+
Gelatin liquefaciton	-	D-ribose	+
ONPG	+	L-arabitol	-
Lysine decarboxylase	-	Xylitol	-
H ₂ S production	-	D-glucose	+
VP	+ ^w	D-lyxose	-
Casein hydrolysis	-	D-tagatose	-
Urease	-	Glycerol	+
Tyrosine decomposition	-	D-mannose	-
Growth		Sucrose	+
Anaerobic	-	α -Methyl-D-mannoside	-
50 °C	+ ^w	β -Methyl-D-xyloside	-

注: +: 阳性结果; -: 阴性结果; +^w: 弱阳性结果.

Note: +: Positive; -: Negative; +^w: Weak positive.

表 2 β -葡萄糖苷酶的分离纯化
Table 2 Purification protocol for the β -glucosidase from strain ZF-6C

纯化步骤 Purification step	总活力 Total activity (U)	总蛋白 Total protein (mg)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification fold	回收率 Yield (%)
Crude extract	13.35 $\times 10^6$	39 028.50	0.34 $\times 10^3$	1.00	100
Ultra-filtration	9.78 $\times 10^6$	4 207.20	2.33 $\times 10^3$	6.85	73.30
Phenyl FF	1.46 $\times 10^6$	157.95	9.23 $\times 10^3$	27.15	10.92
Q _{HP}	1.42 $\times 10^6$	19.31	73.50 $\times 10^3$	216.18	10.63
Sephacryl S200	0.967 $\times 10^6$	5.88	164.44 $\times 10^3$	483.65	7.24

2.4 酶学性质的研究

2.4.1 β -葡萄糖苷酶的最适 pH 及最适温度: 以 PNPG 为底物, 于不同 pH 缓冲液体系中测定相对酶活, 如图 5A 所示, 芽胞杆菌 ZF-6C 所产 β -葡萄糖苷酶的最适 pH 值为 7.0; 于不同温度下测定相对酶活, 如图 5B 所示, 芽胞杆菌 ZF-6C 所产 β -葡萄糖苷酶的最适反应温度为 40 °C。

2.4.2 β -葡萄糖苷酶 pH 稳定性与热稳定性的研究: 如图 6A 所示, 芽胞杆菌 ZF-6C 所产 β -葡萄糖苷酶在 pH 5.0 的缓冲液中储存最稳定; 图 6B 显示, 芽胞杆菌 ZF-6C 所产 β -葡萄糖苷酶在低于 55 °C 的环境中是比较稳定的, 60 °C 保温 1 h, 酶活性基本丧失。

2.4.3 β -葡萄糖苷酶的底物特异性: 如表 3 所示, 芽胞杆菌 ZF-6C 所产 β -葡萄糖苷酶能够有效水解含 β (1,4)糖苷键的底物: 对硝基苯- β -D-葡萄糖苷 (PNPG)、邻硝基苯- β -D-葡萄糖苷 (ONPG)、对硝基苯- β -D-半乳糖苷、对硝基苯- β -D-岩藻糖苷和对硝基苯- β -D-木糖苷。其最适底物为邻硝基苯- β -D-葡萄糖苷 (ONPG), K_m 值为 0.73。而对于由 α (1,4) 或 α (1,6)糖苷键连接的排他性底物(淀粉、糊精、普鲁兰糖)则无水解作用。

2.4.4 金属离子对芽胞杆菌 β -葡萄糖苷酶酶活的影响: 由表 4 可知, Ca^{2+} 、 Pb^{2+} 对该酶有明显的激活作用, Mn^{2+} 、 K^{+} 、 Zn^{2+} 也有激活作用, 但不明显。 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 对该酶有明显的抑制作用, Mg^{2+} 、 Na^{+} 有微弱的抑制作用。

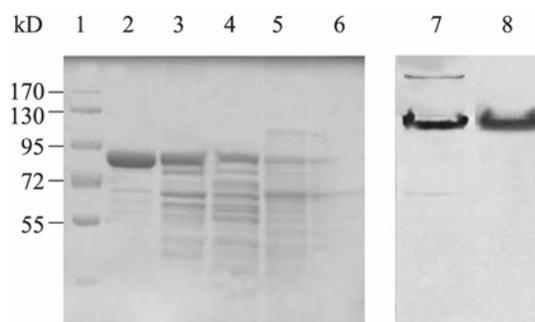


图 4 β -葡萄糖苷酶的蛋白质电泳

Fig. 4 SDS-PAGE of β -glucosidase at different purification steps

注: 1-6 为 SDS-PAGE, 1: 标准分子质量蛋白; 2: 分子筛层析; 3: 离子柱层析; 4: 疏水柱层析; 5: 中空纤维素膜超滤; 6: 发酵上清液. 7 和 8 为 Native-PAGE, 7: 考马斯亮蓝染色; 8: 七叶灵活性染色.

Note: Lanes 1-6 indicates the SDS-PAGE, 1: molecular weight of marker standard; 2: Sephacryl S200; 3: QHP; 4: Phenyl FF; 5: ultra-filtration; 6: fermentation broth. Lanes 7 and 8 indicates the Native-PAGE, 7: Coomassie Blue staining; 8: active staining with esculin.

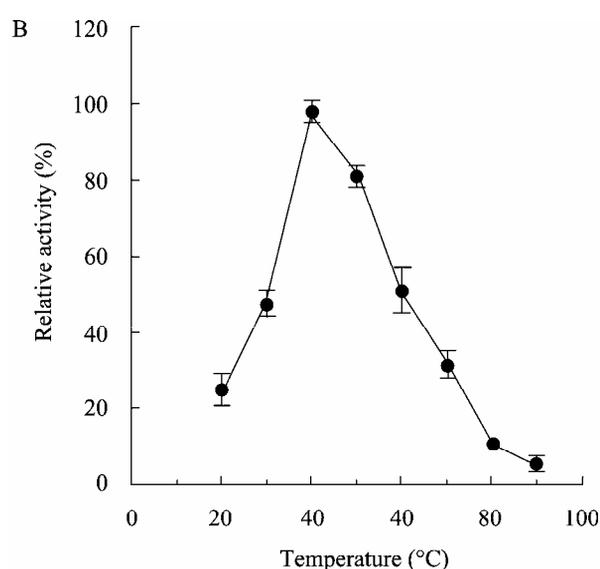
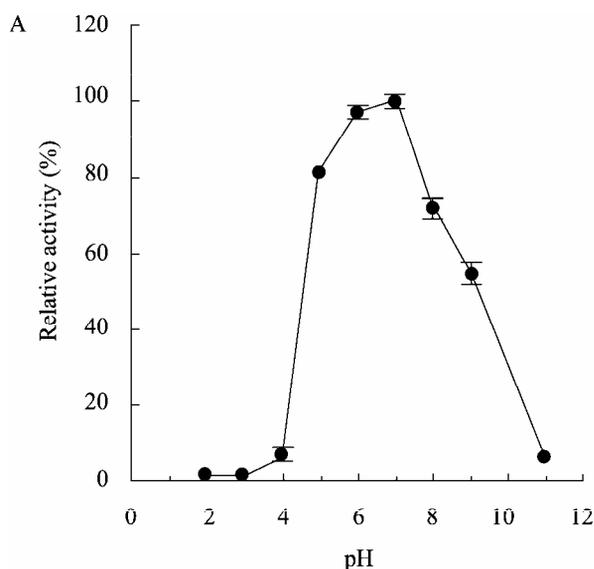


图 5 pH 及反应温度对 β -葡萄糖苷酶活性的影响

Fig. 5 The effects of pH and temperature on the β -glucosidase activity

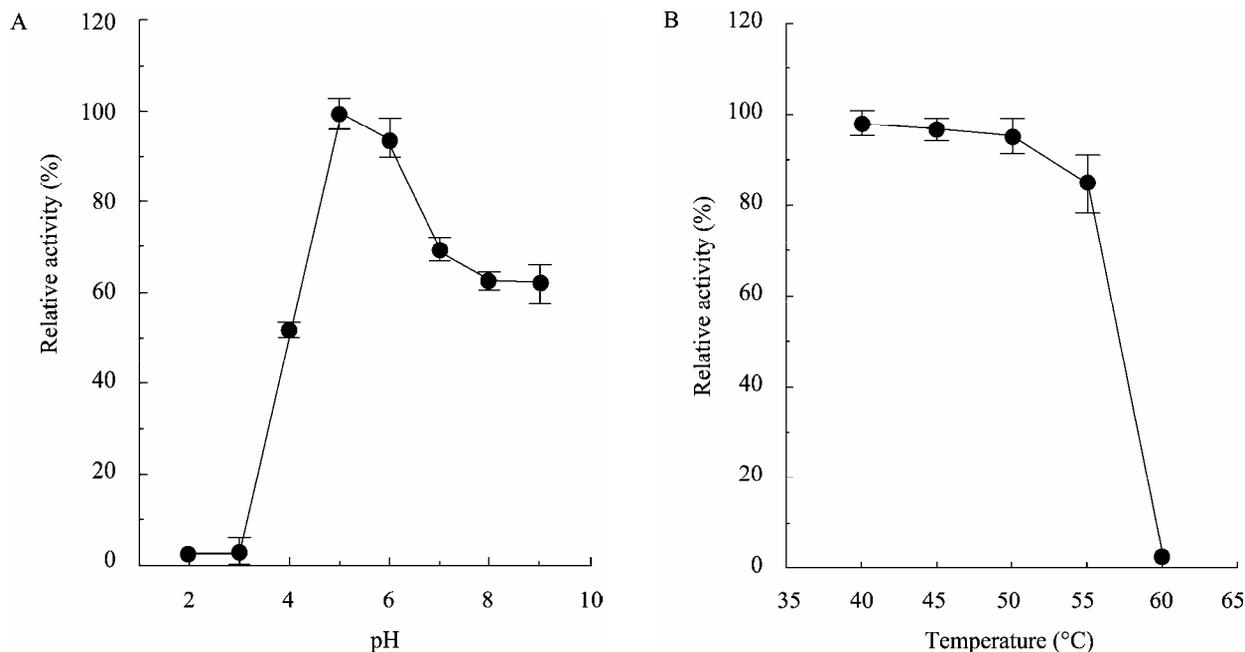


图 6 pH 值和温度对 β -葡萄糖苷酶稳定性的影响

Fig. 6 The effects of pH and temperature on the β -glucosidase stability

表 3 β -葡萄糖苷酶底物特异性的研究

Table 3 Substrate specificity of β -glucosidase from strain ZF-6C

底物 Substrate	糖苷键类型 Configuration of glycoside linkage	K_m (mmol/L)
p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	β (1,4)	2.71 ± 0.28
o-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	β (1,4)	0.73 ± 0.08
p-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	β (1,4)	20.09 ± 1.64
p-Nitrophenyl- β -D-cellobioside	β (1,4)	ND
p-Nitrophenyl- β -D-fucopyranoside	β (1,4)	13.06 ± 1.18
p-Nitrophenyl- β -D-mannopyranoside	β (1,4)	ND
p-Nitrophenyl- β -D-xylopyranoside	β (1,4)	1.84 ± 0.12
Starch	α (1,4); α (1,6)	ND
Dextrin	α (1,4)	ND
Pululan	α (1,4); α (1,6)	ND

注: ND: 未检测到酶活。

Note: ND: Not detectable.

表 4 不同金属离子对 β -葡萄糖苷酶活性的影响
Table 4 Effects of metal ions on activity of β -glucosidase from strain ZF-6C

金属离子 Ions	相对酶活 Relative activity (%)
Mn ²⁺	109
K ⁺	101
Ca ²⁺	110
Mg ²⁺	97
Na ⁺	99
Cu ²⁺	78
Pb ²⁺	121
Zn ²⁺	105
Fe ²⁺	54

3 讨论

β -葡萄糖苷酶因来源不同, 其性质有很大区别, 分子量的变化范围也很广, 一般在 40–300 kD 之间。目前已报道的芽胞杆菌来源的 β -葡萄糖苷酶, 分子量大多在 50 kD 左右, 如 1989 年 Gonzalez 等^[14]从多粘芽胞杆菌(*Bacillus polymyxa*)中克隆得到 β -葡萄糖苷酶基因 *bglA*, 并在大肠杆菌中进行表达, 获得分子量为 50 kD 的 β -葡萄糖苷酶; Bogas 等^[15]从 *Bacillus pumilus* CL16 中分离得到 54 kD β -葡萄糖苷酶 BglH; Lun 等^[16]从 *B. subtilis* 中克隆得到两种 β -葡萄糖苷酶基因 *bglH* 和 *yckE*, 它们在大肠杆菌中分别表达成 57 kD 和 58 kD 的 β -葡萄糖苷酶, BglH 和 YckE 水解 PNPG 的最适温度分别为 37 °C 和 45 °C, 最适 pH 均为 pH 6.0, K_m 值分别为 2.35 mmol/L 和 2.00 mmol/L。2010 年, Naz 等^[17]从 *Bacillus halodurans* C-125 中克隆获得 52 kD β -葡萄糖苷酶 BglA, 水解 PNPG 的最适 pH 值及温度分别为 8.0 和 45 °C, K_m 值为 4 mmol/L。

本研究利用七叶灵显色法从土壤中分离筛选出一株 β -葡萄糖苷酶产生菌, 初步鉴定为芽胞杆菌(*Bacillus korlensis*), 这是首次报道从 *Bacillus*

korlensis 中分离得到 β -葡萄糖苷酶; 对 *Bacillus korlensis* ZF-6C 产的 β -葡萄糖苷酶进行了分离纯化, 得到 90 kD 单体酶蛋白, 相对于其他芽胞杆菌产 β -葡萄糖苷酶分子量较大, 可能具有较新颖的结构。通过对其酶学性质进行研究发现, 该酶水解 PNPG 的最适反应温度为 40 °C, 最适反应 pH 为 7.0, K_m 值为 2.71 mmol/L, 是一种具有高催化活性的中性酶; 该酶的热稳定性较好, 55 °C 保温 1 h 仍能保持 80% 以上的酶活性, 且适宜在弱酸性环境 (pH 5.0) 中储存; 该酶能够水解多种由 $\beta(1,4)$ 糖苷键连接的底物, 对 $\alpha(1,4)$ 糖苷键无水解活性, 其最适底物为邻硝基苯- β -D-葡萄糖苷 (ONPG), K_m 值为 0.73。

参考文献

- [1] Esen A. In β -Glucosidase: Biochemistry and Molecular Biology[M]. Washington, DC: American Chemical Society, 1993: 1–13.
- [2] 石彩蕊, 王义强, 陈介南, 等. 产 β -葡萄糖苷酶微生物育种研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(3): 59–65.
- [3] 彭志英. 食品生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [4] González-pombo P, Fariña L, Carrau F, et al. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1): 385–389.
- [5] Su EZ, Xia T, Gao LP, et al. Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage[J]. Food and Bioprocess Processing, 2010, 88(2/3): 83–89.
- [6] 梁翠宜, 许敬亮, 袁振宏, 等. β -葡萄糖苷酶高温同步糖化发酵产乙醇应用研究[J]. 化学工程, 2012, 40(3): 4–7, 16.
- [7] Yan TR, Liao JC. Synthesis of alkyl β -glucosides from cellobiose with *Aspergillus niger* β -glucosidase II[J]. Biotechnology Letters, 1998,

- 20(7): 653-657.
- [8] 宋京城, 蔡健. 交联壳聚糖固定化 β -葡萄糖苷酶的稳定性的研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(2): 129-132.
- [9] 朱婧, 覃拥灵, 陈桂光, 等. β -葡萄糖苷酶高产菌株的选育及酶法转化葡萄糖生产龙胆低聚糖[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(4): 21-25.
- [10] 刘虎, 陈育如, 姜中玉. 固定化 β -葡萄糖苷酶转化甜菊糖的研究[J]. 食品工业科技, 2011(4): 170-172, 176.
- [11] 宋欣, 曲音波, 袁晓华. 一种将七叶苷用于高产 β -葡萄糖苷酶产生菌的平板筛选的方法: CN, 101177699A[P]. 2008-05-14.
- [12] 赵林果, 孟鹏, 李丽娟, 等. 利用七叶灵显色技术检验和判断 β -葡萄糖苷酶的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(12): 163-166.
- [13] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [14] González-Candelas L, Aristoy MC, Polania J, et al. Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing β -glucosidase activity in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(12): 3173-3177.
- [15] Bogas AC, Watanabe MAE, Barbosa A, et al. Structural characterization of the bgIH gene encoding a beta-glucosidase-like enzyme in an endophytic *Bacillus pumilus* strain[J]. Genetics and Molecular Biology, 2007, 30(1): 100-104.
- [16] Kuo LC, Lee KT. Cloning, expression, and characterization of two β -Glucosidases from isoflavone glycoside-hydrolyzing *Bacillus subtilis* natto[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(1): 119-125.
- [17] Naz S, Ikram N, Rajoka MI, et al. Enhanced production and characterization of a β -glucosidase from *Bacillus halodurans* expressed in *Escherichia coli*[J]. Biochemistry (Moscow), 2010, 75(4): 513-518.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。