

烟曲霉 β -葡萄糖苷酶的基因克隆、表达及酶学性质分析

谢贻¹, 欧阳浩淼¹, 黄日波², 陈东², 金城¹

1 中国科学院微生物研究所 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

2 广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室 国家非粮生物质能源工程技术研究中心 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007

谢贻, 欧阳浩淼, 黄日波, 等. 烟曲霉 β -葡萄糖苷酶的基因克隆、表达及酶学性质分析. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1245-1253.

Xie Y, Ouyang HM, Huang RB, et al. Cloning, expression and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1245-1253.

摘要: 探索获得优良的 β -葡萄糖苷酶基因, 对实现其工业化生产具有重要意义。烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* 基因组中含有一个 *bgl* 基因 (1 752 bp), 编码的蛋白约 65 kDa, 推测为属于糖苷水解酶家族的 β -葡萄糖苷酶。将 *bgl* 基因克隆并构建了重组表达载体 pGEX-*bgl*, 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导获得表达。重组蛋白经亲和层析纯化后, 以七叶苷为底物进行了酶学分析, 结果表明该酶的最适温度是 45 °C, 最适 pH 在 5.5~6.0 之间, 对七叶苷的 K_m 值为 17.7 mmol/L。该酶在 pH 4~7 范围内稳定; 70 °C 保温 2 h 后仍能保持 60% 的活性。金属离子和化学试剂对酶活性有不同程度的影响, Ca^{2+} 对重组酶有轻微的激活作用, 而 SDS 可强烈抑制其活性。由于其相对于真菌来源的其他葡萄糖苷酶稳定性较高, 为进一步的研究与应用奠定了基础。

关键词: 烟曲霉, β -葡萄糖苷酶, 原核表达, 酶学性质

Received: March 11, 2013; **Accepted:** April 1, 2013

Supported by: Provincial Cooperation for Chinese Academy of Sciences.

Corresponding author: Cheng Jin. Tel: +86-10-64807425; Fax: +86-10-64807429; E-mail: jjinc@im.ac.cn

中国科学院院地合作项目资助。

Cloning, expression and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*

Yi Xie¹, Haomiao Ouyang¹, Ribo Huang², Dong Chen², and Cheng Jin¹

¹ State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, Guangxi Academy of Science, Nanning 530007, Guangxi, China

Abstract: Exploring new β -glucosidase genes is of great importance to industrialize β -glucosidase. The genomes of *Aspergillus fumigatus* contain a *bgl* gene, which encodes a 65 kDa putative β -glucosidase. The *bgl* gene was cloned into an expression plasmid and transformed to *Escherichia coli* BL21 (DE3). The *bgl* was expressed upon induction of Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The recombinant protein was purified by GST-tag affinity chromatography. The purified recombinant Bgl was characterized using Esculin as substrate. The optimum temperature and pH were 45 °C and 5.0–6.0, respectively. The K_m for Esculin was 17.7 mmol/L. The enzyme was stable in the range of pH 4–7. After incubation at 70 °C for 2 h, the recombinant Bgl remained 60% of its activity. Metal ions and chemical reagents had different influences on the activity of β -glucosidase. Ca^{2+} (1 mmol/L) could increase enzyme activity slightly. On the contrary, the enzyme activity was greatly inhibited by 5 mmol/L Sodium dodecyl sulfate (SDS). Based on our results, the *A. fumigatus* Bgl was thermostable β -glucosidase.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, β -glucosidase, prokaryotic expression, enzyme activity

β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase, EC3.2.1.21) 在自然界分布广泛, 可催化水解 β -D-葡萄糖苷键, 参与生物体的糖代谢, 在人类、动植物和微生物的糖类代谢方面具有非常重要的价值^[1-2]。

β -葡萄糖苷酶可以广泛应用于多种工业领域, 如在纤维素的降解中, 辅助外切纤维素酶和内切纤维素酶将纤维素降解为葡萄糖单糖; 在食品工业中作为食品改良剂, 水解果汁饮料、酒、茶叶等中的芳香基糖苷类化合物, 释放风味前体物质, 使香气更加浓郁协调, 显著提高风味; 在工业中, 制备有活性的中药成分, 生产低聚龙胆糖、表面活性剂^[3-4]; 同时, 与其他酶协同作用生产单细胞蛋白等, 应用于饲料工业和医药领域。因此, 寻找新的 β -葡萄糖苷酶具有重要意义。

烟曲霉是自然界普遍存在的一种腐生真

菌, 是已知真菌中唯一能在 30~55 °C 的范围内正常生长的真菌, 也是目前已知的热耐受性最高的真核生物, 相关文献报道证明烟曲霉产生的多种酶均具有较好的热稳定性, 如几丁质酶、植酸酶等^[5-6]。因此, 烟曲霉是一种非常好的工业用酶来源。

本研究克隆并表达了烟曲霉基因组中注释的 β -葡萄糖苷酶编码基因 *bgl* (AFUA_8G06970), 对重组蛋白的分析证明该基因编码的蛋白是一个热稳定性较好的、新型 β -葡萄糖苷酶。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* YJ-407 由中国微生物保藏中心保存 (CGMCC 0386), 表达载

体 pGEX-4T-1 购自 Invitrogen 公司, 克隆载体 pEASY-T1 及大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3) 购自 Transgen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; 限制性内切酶、蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司; DNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司; T4DNA 连接酶购自 NEB 公司; 用于酶学分析的底物均购自 Sigma 公司, 其他试剂为国产分析纯。GSTrap FF Column (GE 公司), 超声波细胞粉碎机 (南京新辰生物科技有限公司); DU800 紫外可见分光光度计 (Beckman 公司); 蛋白电泳相关设备 (Bio-Rad 公司)。

1.2 烟曲霉基因组 DNA 的提取

将烟曲霉孢子接种于完全培养基, 37 °C 培养 48 h 后收集菌丝, 菌丝加液氮研磨成细粉, 用苯酚-氯仿法提取基因组 DNA。

1.3 目的基因的克隆

1.3.1 引物设计

根据 GenBank 中预测的 β -葡萄糖苷酶基因序列, 用 Primer 5.0 软件设计引物 (Forward primer: 5'-GCGTCGACTCATGAGACAGTGCGGTGAGTTG-3'; Reverse primer: 5'-ATTTGCGGCCGCTACTTGGACATCCTCGATGAC-3'), 并在其上下游引入酶切位点 *Sal* I 和 *Not* I (下划线部分所示)。

1.3.2 *bgl* 基因的扩增和 TA 克隆

PCR 反应采用 25 μ L 体系, 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物纯化后与 pEASY-T1 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选出阳性克隆, 并经测序验证。

1.4 融合表达载体的构建

pEASY-*bgl* 和 pGEX-4T-1 通过 *Sal* I 与 *Not* I 双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的片段, 16 °C 连接过夜后转化 DH5 α , 通过酶切验证, 最终得到表达载体 pGEX-*bgl*。

1.5 重组载体在大肠杆菌中的诱导表达

pGEX-*bgl* 转化至 *E. coli* BL21(DE3), 用七叶苷平板法快速筛选具有 β -葡萄糖苷酶活性的重组菌株^[7]。37 °C 过夜的培养物以转接至 LB 培养基中, 200 r/min 培养 2~3 h, 加入异丙基- β -D- 硫代半乳糖苷 (IPTG, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 于 16 °C、200 r/min 培养 24 h。

1.6 亲和层析纯化及产物鉴定

将培养液 5 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体, 重悬于 1 \times PBS 中, 冰浴超声裂解, 离心收集上清。用 GE 公司的 GSTrap FF column (5 mL 预装重力柱) 于 AKTA Purifier 层析系统中纯化上清中的重组蛋白。纯化的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后考马斯亮蓝染色, 观察结果, 并切取目的条带, 经脱色、还原和烷基化后, 胶内胰蛋白酶酶解, 进一步处理后的肽提取液进行 MALDI-TOF-MS 检测^[8]。蛋白质质量采用 Bradford 法, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白^[9]。

1.7 酶学性质分析

以七叶苷作为底物, 采用 DNS 比色法测定 β -葡萄糖苷酶活性^[10]。70 μ L 0.1 mol/L 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液中, 加入 20 μ L 1% 的七叶苷和 10 μ L 酶液, 在一定温度和 pH 下反应 10 min, 立即加入 100 μ L DNS 试剂, 沸水浴 5 min, 流水冷却至室温, 在波长 540 nm 下测吸光度, 以

相同处理的灭活酶作空白对照。一个酶活力单位(Unit)定义为每分钟催化 1 μmol 还原糖生成所需的酶量。所有酶活测定结果为 3 次重复平行试验数据的平均值。

1.7.1 温度对酶活力的影响

在 25~65 $^{\circ}\text{C}$ 范围内分别测定酶活力, 反应条件为 pH 5.8, 10 min, 以最高活力为 100%。热稳定性测定: 在最适 pH 下, 将浓度为 0.2 mg/mL 的酶分别于 45 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 和 80 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴保温 0.5 h、1 h、2 h 和 4 h 后, 加入底物于 45 $^{\circ}\text{C}$, pH 5.8 测定残留活力, 以未处理的酶活力为 100%, 作温度稳定性曲线。

1.7.2 pH 对酶活力的影响

在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下测定 pH 值的变化对酶活力的影响, 以最高活力为 100%, 作 pH 曲线。pH 稳定性的分析: 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下将酶在不同 pH 值 (pH 2~8) 的缓冲液中处理过夜, 然后在最适条件下测定酶活, 以未处理的酶活力为 100%, 计算相对酶活, 以研究其 pH 稳定性。

1.7.3 酶的动力学参数测定

以不同浓度的七叶苷为底物在最适条件下反应 5 min, 采用双倒数作图法 (Lineweaver-Burk) 计算 K_m 及 V_{\max} 值。

1.7.4 金属离子和化学试剂对酶活力的影响

在酶促反应中加入不同的金属离子 (终浓度 1 mmol/L) 和相关化学试剂 (终浓度 5 mmol/L) 在最适条件下反应, 研究其对酶活性的影响。以未加金属离子和化学试剂的反应体系为正对照, 计算其他各处理样品的相对酶活力。

1.7.5 酶的底物特异性

采用水杨苷、熊果苷、羧甲基纤维素钠、葡聚糖、纤维二糖为底物, 在标准反应条件下

反应 10 min, 用 DNS 法或葡萄糖氧化酶法测定吸光度值, 根据葡萄糖标准曲线计算酶活。同时, 以 pNPG、pNPC、pNPX、oNPG 为底物^[11], 在标准反应条件下反应 10 min, 测定 405 nm 吸光值, 根据 pNP 标准曲线计算酶活。一个酶活力单位 (Unit) 定义为: 在标准条件下, 每分钟产生 1 μmol pNP 所需要的酶量。

2 结果与分析

2.1 *bgl* 的克隆和序列测定

通过 PCR 方法扩增到 *bgl* 的编码框全长, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 可见一条约 1.7 kb 的 DNA 片段 (图 1A), 该片段与预期 PCR 产物长度一致, 说明已成功扩增出目的基因。连接 T 载体后的重组质粒经测序鉴定, 序列与 GenBank 上的 *bgl* 基因片段完全相同。

2.2 表达载体的构建及活性菌株筛选

按照材料和方法中所述构建重组表达质粒 pGEX-*bgl*。重组质粒酶切得到约 5 kb 的

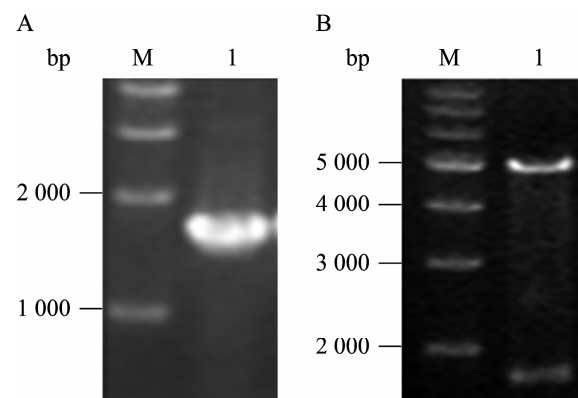


图 1 PCR 扩增产物及表达载体的酶切鉴定

Fig. 1 Amplification of the gene *bgl* and construction of expression vector. (A) M: DNA marker; 1: *bgl*. (B) M: DNA marker; 1: pGEX-*bgl* digested with *Sal* I and *Not* I.

pGEX-4T-1 线性片段和约 1.7 kb 的插入片段，证明已经成功构建出原核表达载体 (图 1B)。将 pGEX-*bgl* 转入 BL21(DE3)，经初筛和复筛，选择在七叶苷平板上能产生黑色活性圈的 β -葡萄糖苷酶产生菌 (图 2)。

2.3 重组蛋白的表达和纯化

对诱导进行优化，最终选择以下条件：过夜

培养菌液次日以 1:100 体积比接种 LB 培养基于 37 °C，放大培养至 $OD_{600}=0.6$ 时以终浓度为 0.4 mmol/L IPTG，于 16 °C、200 r/min 诱导 24 h。诱导表达的重组蛋白经亲和层析纯化，获得一个分子量约为 65 kDa 的蛋白 (图 3A)，与理论值相符。进一步通过质谱进行肽指纹图谱鉴定 (图 3B)，证明所纯化的重组蛋白为 *bgl* 基因编码的蛋白。

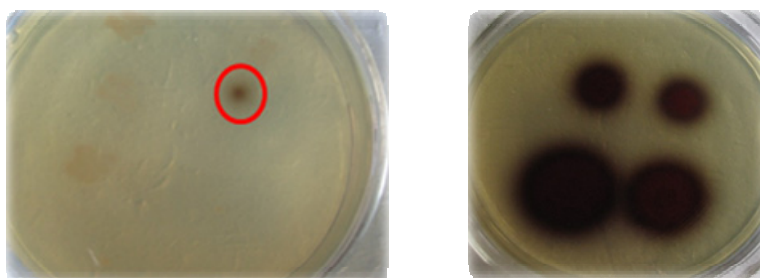


图 2 产 β -葡萄糖苷酶阳性菌株的筛选

Fig.2 Screening of β -glucosidase positive clones on Esculin agar plates.

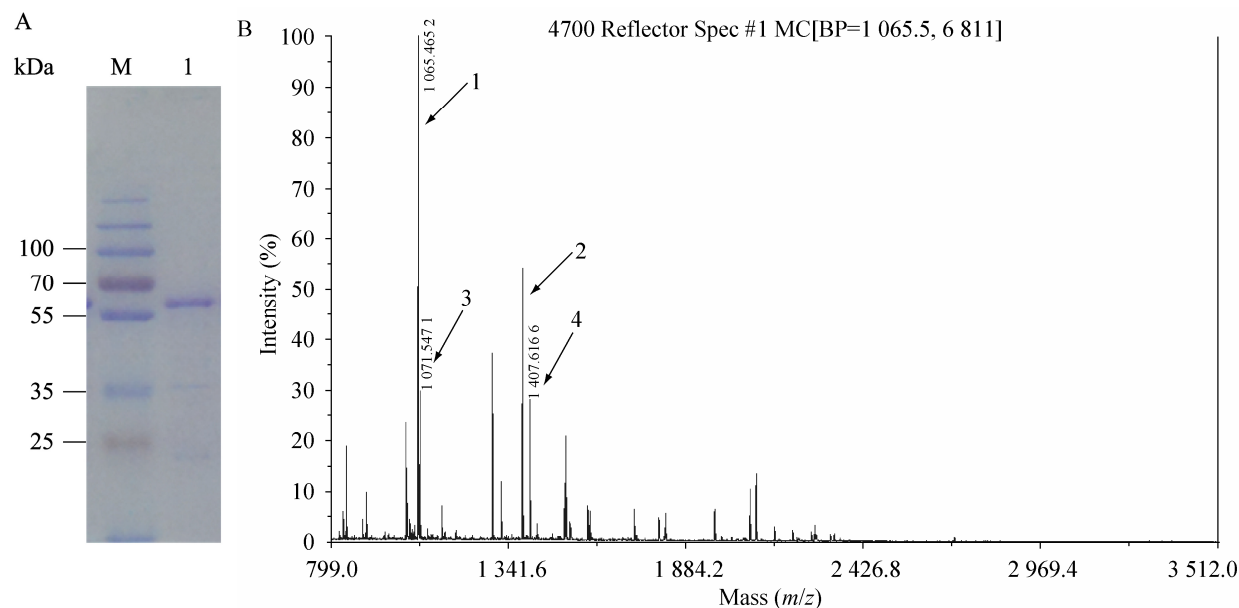


图 3 重组 β -葡萄糖苷酶纯化的 SDS-PAGE 和质谱检测题

Fig. 3 Identification of recombinant protein by SDS-PAGE and mass spectrometry analysis. (A) SDS-PAGE analysis of the purified Bgl. M: prestained protein marker; 1: purified recombinant protein Bgl. (B) Mass spectrogram results of Bgl. peak 1 matched peptides of “FNDNFGVPR”; peak 2 matched peptides of “SLFDLVDFVSSR”; peak 3 matched peptides of “IVLTHFADR”; peak 4 matched peptides of “TDLSDQLFDTPR”.

2.4 纯化重组酶的性质

2.4.1 温度对酶活力的影响

该重组酶以七叶苷为底物的最适反应温度为 45 °C, 在 25~40 °C 及 50~60 °C 之间约有 70%~80% 的活性, 65 °C 时仅表现出约 50% 的活性 (图 4A)。纯化的 β -葡萄糖苷酶在最适温度 45 °C 活性保持稳定; 70 °C 处理 1 h, 其酶活残留 80%

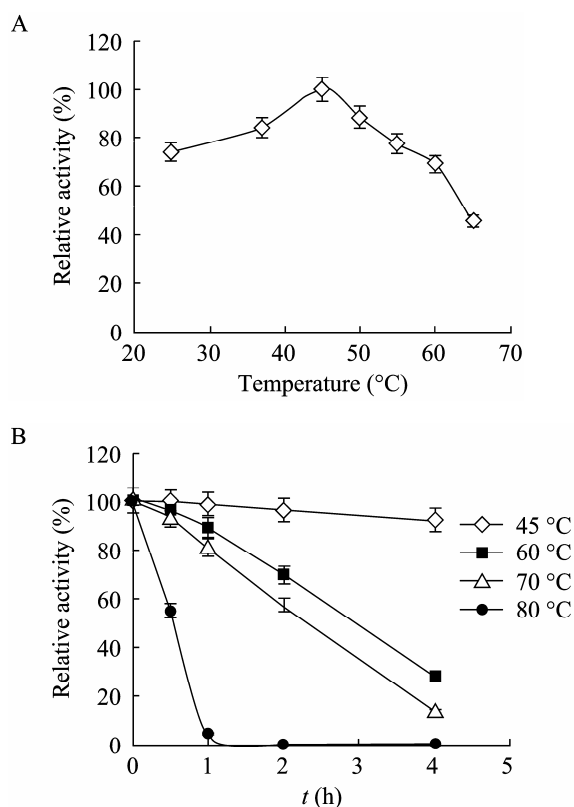


图 4 温度对酶活力和稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on activities and stabilities of recombinant enzyme. (A) The optimal temperature of the Bgl was estimated at various temperatures (25 °C–65 °C) in sodium hydrogen phosphate-citric acid buffer (100 mmol/L, pH 5.8). (B) Purified enzyme (0.2 mg/mL) was incubated in different conditions (45 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C at optimal pH) for time 0.5 h, 1 h, 2 h, and 4 h. The activity of enzyme without pre-incubation was taken as 100%. Results are the average of three replicates.

以上, 处理 2 h, 酶活性保持 60% 左右, 处理 4 h 后酶活性残留 10%。80 °C 处理 0.5 h, 酶活保持 50% 以上 (图 4B), 表明该酶具有较好的热稳定性。

2.4.2 pH 对酶活力的影响

以柠檬酸- Na_2HPO_4 体系作为缓冲液, 酶活测定结果表明, 酶于 45 °C 时的最适 pH 在 5.5~6.0 之间 (图 5A), 属于酸性酶。pH 稳定性分析 (图 5B) 显示, 该酶在 pH 值 4~6 范围内较稳定, 超出这一范围后, 活性迅速下降。

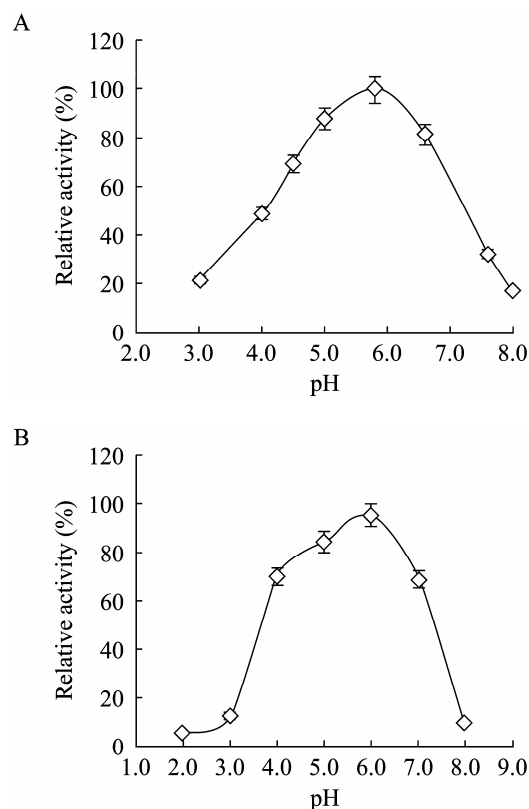


图 5 pH 对酶活力和稳定性的影响

Fig. 5 Effect of pH on activities and stabilities of recombinant enzyme. (A) The optimal pH of the Bgl was estimated at various pH (3.0–8.0). (B) Purified enzyme was incubated at different pH (2.0–8.0) for 12 h, and the maximum activity was taken as 100%.

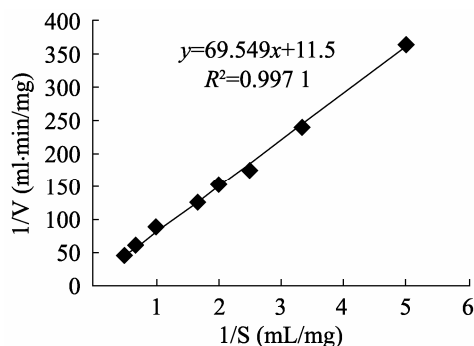


图 6 β -葡萄糖苷酶水解七叶苷的酶动力学曲线

Fig. 6 Kinetic curve of Esculin hydrolyzed by recombinant enzyme.

2.4.3 酶促反应的动力学

重组酶在 45 °C 催化七叶苷水解时的动力学参数 K_m 及 V_{max} 值分别为 17.7 mmol/L 和 116 μ mol/(min·mg)。

2.4.4 金属离子和化学试剂对酶活力的影响

结果表明, Na^+ 和 Ca^{2+} 对重组酶有轻微的激活作用, Co^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶促反应有不同程度的抑制作用, 当反应体系中含有 5 mmol/L 的 SDS 时, 酶已基本失去活性(图 7)。

2.4.5 底物特异性

分析了重组酶对多种底物的活性 (表 1),

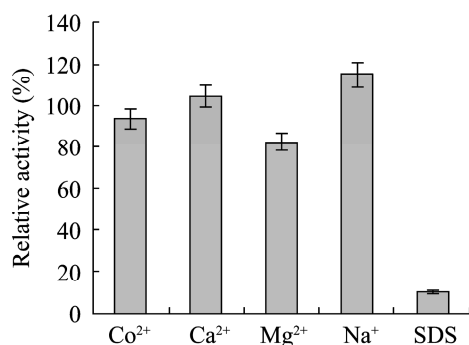


图 7 金属离子和化学试剂对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of different metal ions and chemical reagents on Bgl activity. Results are the mean of three replicates.

表 1 β -葡萄糖苷酶的底物特异性

Table 1 Hydrolytic specific activities of purified Bgl on various substrates

Substrate	Specific activity (U/mg)
Esculin	17.61
Salicin	7.69
Cellobiose	2.02
Arbutin	0.13
Glucan	N
CMC	N
pNPG	0.56
pNPC	0.36
pNPX	N
oNPG	N

Results are the mean of three replicates. N: not detectable; CMC: carboxymethylcellulose sodium; pNPG: 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside; pNPC: 4-Nitrophenyl- β -D-cellobioside; pNPX: 4-Nitrophenyl- β -D-xylopyranoside; oNPG: 2-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside.

发现重组 β -葡萄糖苷酶对七叶苷具有较高的活性, 对水杨苷和纤维二糖活性相对较弱, 而对其他底物分解能力很弱或不可测出。

3 讨论

根据氨基酸序列和 CAZY 数据库的信息^[12], 本研究克隆表达的蛋白隶属于糖苷水解酶家族 (Glycoside Hydrolysis Family)1。经 SWISS-MODEL 结构模拟分析, 该酶与来源于黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium*^[13-14] 的 BGL1A 具有 30% 的相似性; 与土曲霉 *Aspergillus terreus* β -葡萄糖苷酶 (XP_001211835) 的同源性为 68%。同时与多种真菌, 如里氏木霉 *Trichoderma reesei* 来源的 GH1 葡萄糖苷酶多序列比对发现, 该酶具有两个与催化活性有关 Glu

保守残基。

已报道的 β -葡萄糖苷酶最适温度在 30~110 °C 之间, 多为酸性酶 (表 2), 我们得到的重组酶最适温度和最适 pH 也在此范围内变化。值得一提的是, 烟曲霉 Bgl 在 70 °C 保温 1 h 后仍可保留 80% 以上的酶活性; 80 °C 处理 0.5 h, 酶活保持在 50% 以上。因此, 该酶在目前已报道的真菌 GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶中是热稳定性最高的。

目前已报道的 β -葡萄糖苷酶大多可以分解

纤维二糖, 而 *Neosartorya fischeri* 来源的酶能有效分解槲皮黄酮葡萄糖苷、染料木黄酮等, 却不能分解纤维二糖、三糖和四糖; 还有的酶分别对七叶苷、水杨苷等水解能力较强 (表 2)。对烟曲霉 Bgl 的底物特异性进行分析发现, 该酶对七叶苷活性最高, 对水杨苷和纤维二糖有一定活性, 但对其他商品化底物则没有活性, 与其他来源的 β -葡萄糖苷酶的底物特异性存在较大差异。由于所测试的底物有限, 尚难以确定烟曲霉 Bgl 的天然底物, 仍需进一步的深入研究。

表 2 不同来源 β -葡萄糖苷酶的部分酶学性质

Table 2 Properties of recombinant BGLs from various sources

Source	Optimum temperature & pH	Thermo stability	Preferred substrate
<i>Periconia</i> sp.	70 °C; 6.0	Retained 60% after 1.5 h at 70 °C	pNPG, cellobiose, MUC ^[15]
<i>Neosartorya fischeri</i>	40 °C; 6.0	Retained 50% after 8 min at 60 °C	genistein, Quercetin 3-O-glucoside, Cirmtin ^[16]
<i>Debaryomyces basenji</i>	40 °C; 4.0–5.0	N	arbutin ^[17]
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	40 °C; 5.0–6.0	80% residual activity at 50 °C	MUC, MUD, cellobiose, Esculin ^[18]
<i>Paecilomyces thermophila</i>	60 °C; 6.0	Retained 60% after 30 min at 60 °C	pNPG, cellobiose, gentiobiose ^[19]
<i>Chaetomium thermophilum</i>	60 °C; 5.0	Retained 67.7% after 1 h at 60 °C	salicin ^[20]
<i>Aspergillus niger</i>	60 °C; 4.0	Retained 40% after 30 min at 70 °C	pNPG ^[21]
<i>Trichoderma reesei</i>	6.0; 40 °C	Retained 80% after 10 min at 45 °C	pNPG, pNPC ^[22]

Cirmtin: hesperetin 7-rhamnoglucoside; MUC: 4-methylumbelliferyl- β -D-cellobioside; MUD: 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside; N: not reported.

REFERENCES

- [1] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143–169.
- [2] Anish R, Rahman MS, Rao M. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96(1): 48–56.
- [3] Yan TR, Liao JC. Synthesis of alkyl β -glucosidases from cellobiose with *Aspergillus niger* β -glucosidase II. *Biotechnol Lett*, 1998, 20(7):653–657.
- [4] Cortes ML, Felipe P, Martin V, et al. Successful use of a plant gene in the treatment of cancer *in vivo*. *Gene Ther*, 1998, 5(11): 1499–1507.

- [5] Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 2005, 438(7071): 1151–6.
- [6] Wang Y, Wang JQ, Jin C, et al. Cloning and expression of chitinase gene from *Aspergillus fumigatus* YJ407. *Chin J Biotech*, 2004, 20(6): 843–850 (in Chinese).
王颖, 王俊琦, 金城, 等. 烟曲霉几丁质酶基因的克隆与表达. *生物工程学报*, 2004, 20(6): 843–850.
- [7] Edberg CE, Trepeta RW, Kontnick CM, et al. Measurement of active constitutive beta-D-glucosidase (Esculinase) in the presence of sodium desoxycholate. *J Clin Microbiol*, 1985, 21(3): 363–365.
- [8] Bergman AC, Benjamin T, Alaiya A, et al. Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2001, 21(3): 679–86.
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 7(72): 248–254.
- [10] Liu DY, Zhang RF, Yang XM, et al. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost. *Protein Expr Purif*, 2011, 79(2): 176–186.
- [11] Opasiri R, Hua Y, Wara-Aswapati O, et al. β -Glucosidase, exo- β -glucanase and pyridoxine transglucosylase activities of rice BGlu1. *Biochem J*, 2004, 379(1): 125–131.
- [12] Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 1995, 3(9): 853–859.
- [13] Nijikken Y, Tsukada T, Igarashi K, et al. Crystal structure of intracellular family 1 β -glucosidase BGL1A from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett*, 2007, 581(7): 1514–1520.
- [14] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195–201.
- [15] Harnpicharnchai P, Champreda V, Sornlake W, et al. A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. *Protein Expr Purif*, 2009, 67(2): 61–69.
- [16] Priyadharshini R, Manish Kumar, T, Raushan K, et al. Cloning and characterization of a putative β -glucosidase (NfBGL595) from *Neosartorya fischeri*. *Process Biochemistry*, 2012, 47(1): 99–105.
- [17] Rosi I, Vinella M, Domizio P. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J Appl Bacteriol*, 1994, 77(5): 519–527.
- [18] Chen HL, Chen YC, Lu MJ, et al. A highly efficient β -glucosidase from the buffalo rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5. *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5: 24.
- [19] Yan Q, Hua C, Yang S, et al. High level expression of extracellular secretion of a β -glucosidase gene (PtBglu3) from *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2012, 84(1): 64–72.
- [20] Xu R, Teng F, Zhang C, et al. Cloning of a gene encoding β -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* CT2 and its expression in *Pichia pastoris*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2011, 20(1): 16–23.
- [21] Zhao LG, You LJ, Meng P, et al. Study on purification and some properties of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Chem Ind Forest Prod*, 2007, 27(6): 41–46 (in Chinese).
赵林果, 游丽金, 孟鹏, 等. 黑曲霉胞外耐高糖 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及部分特性研究. *林产化学与工业*, 2007, 27(6): 41–46.
- [22] Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, et al. Molecular cloning and expression of the novel fungal β -glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J Biochem*, 1999, 125(4): 728–736.

(本文责编 陈宏宇)