

β -葡萄糖苷酶基因克隆及在丝状真菌中 高效表达的研究进展

朱凤妹, 彭丽莎, 李 军*

(河北科技师范学院 食品科技学院, 秦皇岛 066600)

摘 要: 纤维素酶是来源于真菌、细菌和原生动物并且能够降解纤维素成为葡萄糖单体的一组酶的总称, 包括内切型(β -1,4)葡聚糖水解酶、外切型(β -1,4)葡聚糖水解酶、 β -葡萄糖苷酶。 β -葡萄糖苷酶能够水解纤维二糖产生两分子的葡萄糖, 是纤维素酶的限速酶, 但其含量少、活力低, 成为纤维素酶解的瓶颈。因此, 通过基因重组技术构建工程菌, 开展关于 β -葡萄糖苷酶基因高效表达的研究具有重要的意义。本文从 β -葡萄糖苷酶及其菌株的筛选和育种、 β -葡萄糖苷酶基因的克隆与表达、分泌及诱导等方面论述了如何使 β -葡萄糖苷酶在丝状真菌中得到高效表达。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 丝状真菌; 外源基因克隆; 高效表达

Research progress on β -glucosidase gene cloning and high level expression in filamentous fungi

ZHU Feng-Mei, PENG Li-Sha, LI Jun*

(College of Food Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology,
Qinhuangdao 066600, China)

ABSTRACT: Cellulase is a group of several enzymes produced chiefly by fungi, bacteria, and protozoans which can catalyze cellulolysis, the decomposition of cellulose. It includes endo-1,4-beta-D-glucanase (beta-1, 4-glucanase, beta-1,4-endoglucan hydrolase, endoglucanase D, 1,4-(1,3,1,4)-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase) and β -glucosidase. β -glucosidase hydrolyzed cellobiose into 2 molecules of glucose which is the rate-limiting enzyme of cellulase. Moreover, β -glucosidase creates a bottleneck in cellulase hydrolysis owing to low content and poor enzyme activity. It is important to study the high level expression of β -glucosidase gene by constructing of engineering bacteria using gene recombination technology. Herein, we review the current progress of studies on the strain screening and breeding, β -glucosidase gene cloning, secretion and induction, and high level expression in filamentous fungi.

KEY WORDS: β -glucosidase; filamentous fungi; foreign gene cloning; expression

基金项目: 国家自然科学基金项目(31470542), 河北省自然科学基金项目(C2014407059)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31470542) and Natural Science Foundation of Hebei Province of China (C2014407059).

*通讯作者: 李军, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: spgcx@163.com

*Corresponding author: LI Jun, Professor, College of Food Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, China. E-mail: spgcx@163.com

1 引言

随着近年来环境污染和能源危机的加重, 作为生物能源重要材料之一的木质纤维素含有最广泛的碳源, 越来越受到各国政府的高度重视^[1]。 β -葡萄糖苷酶作为纤维素酶系中的一个重要成员, 在食品、医药和生物能源领域中具有重要的应用价值^[2]。 β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase, EC 3.2.1.21)属于纤维素酶类, 能够水解结合于末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键, 同时释放出 β -D-葡萄糖和相应的配基^[3], 其来源不同底物特异性也不同^[4]。近年来, 利用纤维素酶高效分解秸秆产糖已成为国内外研究的热点^[5]。 β -葡萄糖苷酶广泛存在于自然界中, 包括植物的种子、微生物、动物和真菌。研究发现, β -葡萄糖苷酶参与己糖二磷酸途径, 是参与双歧杆菌糖代谢的有关酶系之一^[6]。此外, β -葡萄糖苷酶能将水果、蔬菜、茶叶中的键合态风味前体物质水解为具有浓郁天然风味的游离态香气成分, 同时能协助纤维素酶降解纤维素^[7,8]。因此对 β -葡萄糖苷酶的研究具有重要的理论和实用价值, 但是在纤维素酶组分中 β -葡萄糖苷酶含量少、活力低, 成为纤维素酶解的瓶颈。本文将对 β -葡萄糖苷酶在丝状真菌中的克隆及高效表达进行综述。

2 β -葡萄糖苷酶及其菌种的筛选和育种

产 β -葡萄糖苷酶的微生物主要包括曲霉、木霉、酵母和细菌, 但产量低, 不易大规模生产。目前关于纤维素酶生产菌株的研究, 绝大部分集中于纤维素酶系齐全且酶活力较高的木霉如绿色木霉和里氏木霉等菌株上^[9-11], 但木霉菌发酵产物中存在多种真菌毒素。曲霉属(*Aspergillus*)微生物是发酵工业和食品加工业的重要菌种, 已被利用的近 60 种。黑曲霉不产生毒素, 是公认的安全微生物^[12,13]。在产纤维素酶的真菌中, 黑曲霉所产纤维素酶系中以 β -葡萄糖苷酶的活力较高, 所以通过黑曲霉发酵来获得 β -葡萄糖苷酶是一种很好的方法。诱变育种是在人为条件下, 利用物理、化学等因素, 诱发生物体产生突变, 从中选择、培育成微生物的新品种, 具有速度快、收效大、方法简单等优点。到目前为止, 是微生物育种上最重要、最有效的技术^[14]。张玉梅^[15]以黑曲霉 3.2130 为出发菌株, 经紫外线诱变处理, 采用平板培养筛选, 获得一酸性蛋白酶缺陷的菌株 B4。另外, 随着分子遗传学和分子生物学的迅速发展, 原生质体融合技术已成熟地应用于微生物的遗传育种实践中。通过采用原生质体融合技术实现了酵母菌、霉菌、放线菌和细菌等微生物的株内、株间、种间以及属间的融合。朱凤妹等^[16]采用原生质体融合技术对曲霉菌株高产 β -葡萄糖苷酶进行研究, 并考察了 β -葡萄糖苷酶对葡萄酒增香的作用机制。

3 β -葡萄糖苷酶的分类与理化性质

3.1 β -葡萄糖苷酶的分类

β -葡萄糖苷酶按其底物特异性可以分成三类: 第一类是能水解羟基- β -葡萄糖苷或芳香基- β -葡萄糖苷的酶, 此类 β -葡萄糖苷酶能水解的底物有纤维二糖、对硝基苯- β -D-葡萄糖苷等; 第二类是只能水解芳香基- β -葡萄糖苷的酶, 这类酶能水解对硝基苯- β -D-葡萄糖苷等类似物; 第三类是只能水解羟基- β -葡萄糖苷的酶, 这类 β -葡萄糖苷酶能水解纤维二糖等^[16]。

3.2 β -葡萄糖苷酶的理化性质

3.2.1 β -葡萄糖苷酶的相对分子量

β -葡萄糖苷酶的相对分子量通常在 40 kDa ~ 250 kDa 之间。不同来源的 β -葡萄糖苷酶的相对分子量由于其结构和组成不同而差异很大。有的菌株本身含有胞内和胞外 β -葡萄糖苷酶, 因此, 有时来源于同一菌株的 β -葡萄糖苷酶可能是两种不同分子量酶的混合物, 甚至是多种不同分子量酶的混合物。1992 年, 王沁等^[17]从黑曲霉发酵液中分离提纯 β -葡萄糖苷酶, 共得到四种酶组分, 经凝胶电泳鉴定均为单一谱带, 其分子量分别为 77000、67000、73000、43000 kDa。2010 年, 朱凤妹等^[18,19]从黑曲霉和米曲霉原生质体融合中纯化的 β -葡萄糖苷酶用 SDS 凝胶电泳和凝胶过滤测得其分子量在 125 kDa 左右。

3.2.2 β -葡萄糖苷酶的等电点、最适 pH

β -葡萄糖苷酶的等电点大都在酸性范围 3.5 ~ 5.5 之间。但最适 pH 可超过 7.0。国外学者从嗜碱芽孢杆菌中分离出胞外 β -葡萄糖苷酶, 其最适 pH 在 6.0 ~ 9.0 之间^[20]。

3.2.3 β -葡萄糖苷酶的最适温度及热稳定性

β -葡萄糖苷酶的最适温度在 40 °C ~ 110 °C 之间。通常来源于古细菌的 β -葡萄糖苷酶, 其热稳定性和最适温度要高于其他来源的 β -葡萄糖苷酶。如来源于古细菌 *Pyrococcus furiosus* 的 β -葡萄糖苷酶的最适温度为 102 °C ~ 105 °C。

3.2.4 β -葡萄糖苷酶的底物专一性

大多数 β -葡萄糖苷酶结构专一性较差, 能裂解 C-N 键、C-S 键、C-F 键等。有些 β -葡萄糖苷酶甚至对 C₆ 位的专一性也不高, 能水解木糖。有些对糖基部分的 C₄ 和 C₂ 结构不专一, 能同时水解 β -葡萄糖苷键和 β -半乳糖苷键。但是, 也有些 β -葡萄糖苷酶对底物表现出较强的专一性。2003 年, Dayan 等^[21]从美洲鬼臼的叶子中提取的 β -葡萄糖苷酶对足叶草毒素- β -D-葡萄糖苷有很高的专一性。

3.2.5 金属离子和抑制剂对 β -葡萄糖苷酶的影响

研究表明, Hg²⁺、Cu²⁺、Ag²⁺、SDS、EDTA 对 β -葡萄糖苷酶抑制作用比较明显^[4]。葡萄糖也是 β -葡萄糖苷酶的典型抑制剂。另外, Mn²⁺、Co²⁺ 对 β -葡萄糖苷酶有显著的

激活作用。

4 β -葡萄糖苷酶基因的克隆与表达

4.1 β -葡萄糖苷酶基因的克隆

早期 β -葡萄糖苷酶基因的克隆是通过构建总 DNA 文库或鸟枪法进行活性筛选的方式获得的。随着 PCR 技术的应用,利用种属相似性扩增克隆得到许多 β -葡萄糖苷酶基因,随着基因组学的发展,通过序列筛查定位分析出可能的 β -葡萄糖苷酶基因,是获得 β -葡萄糖苷酶新基因的有效手段^[22]。关于微生物 β -葡萄糖苷酶基因克隆的研究又以真菌居多,因为研究表明微生物中 β -葡萄糖苷酶活度高的生产菌大多是真菌。少数细菌也能产 β -葡萄糖苷酶,这主要集中在杆菌^[22]。另外,越来越多的植物 β -葡萄糖苷酶基因被陆续克隆研究。

4.2 几种微生物表达系统的比较

β -葡萄糖苷酶基因的表达可以通过表达检测方法研究、原核系统中表达水平研究和真核系统中表达水平研究来进行^[22]。微生物表达系统是用于蛋白质生产及性质研究的重要基础^[22]。常用的微生物表达系统有大肠杆菌表达系统、酵母表达系统和丝状真菌表达系统^[23,24]。

4.2.1 大肠杆菌表达系统

大肠杆菌表达系统是基因表达技术中发展最早、目前应用最广泛的经典表达系统。大肠杆菌可以表达多种多肽和蛋白质,具有遗传背景清楚,培养周期短,目标基因表达水平高,抗污染能力强,代谢途径和基因表达调控机制比较清楚等特点。外源真核蛋白如果具有以下性质:分子量小于 70 kDa、不含半胱氨酸、二硫键低于 3 个,不需要翻译后修饰,多数也可以在大肠杆菌表达系统中获得较好的结果^[25,26]。

另外,大肠杆菌的外源表达具有以下不足:

(1) 大肠杆菌系统不具有真核细胞翻译后修饰加工的功能,无法帮助真核蛋白糖基化、磷酸化、正确折叠和分泌等^[27]。

(2) 真核基因具有内含子,所以只能用其 cDNA。天然的真核基因在大肠杆菌细胞内不能转录为成熟的 mRNA,转录水平的限制也导致翻译难以进行。

(3) 大肠杆菌内源性蛋白酶易降解外来的真核生物基因所表达的蛋白质分子。

(4) 大肠杆菌细胞膜间隙中含有大量的内毒素,痕量的内毒素即可导致人体热原反应。

(5) 蛋白在大肠杆菌内多数为非分泌型表达,细胞内杂蛋白多。表达载体就是在克隆载体基本骨架的基础上增加表达元件,使目的基因能够表达的载体。目前常用的表达载体有非融合表达载体、融合表达载体,分泌型表达载体以及表面展示表达载体^[28]。

4.2.2 酵母表达系统

酵母菌是一种单细胞真菌,在有氧和无氧环境下都能生存,属于兼性厌氧菌。酵母基因表达系统是一种最近发展迅速的外源蛋白质生产系统。与以往的基因表达系统相比,它具有无可匹敌的高表达特性,已被认为是最具有发展前景的生产蛋白质的工具之一。酿酒酵母和毕赤酵母是目前最为成功的外源蛋白表达系统^[29-31]。

4.2.3 丝状真菌表达系统

随着真核表达体系的建立完善,近年来的研究表明,丝状真菌作为转化的宿主菌,有着许多其他微生物(如细菌、酵母)不可比拟的优点。丝状真菌即是霉菌,有着极强的繁殖能力,而且繁殖方式也是多种多样的。在表达和分泌蛋白方面,丝状真菌通过对蛋白质进行翻译后修饰,是具有高效分泌蛋白质潜力的真核表达系统。除此之外,丝状真菌自身能够产生次级代谢产物丰富,多数已经成为生物技术下的产物,并成为具有临床意义的药物^[32]。

综合以上三种外源基因的表达系统,丝状真菌外源蛋白分泌表达量可观,培养简单、成本低,转录翻译修饰水平接近高等真核生物,特别是发酵产物安全性高,具有商业化生产的优越性。

4.3 丝状真菌作为 β -葡萄糖苷酶基因表达的宿主

丝状真菌作为外源基因表达的宿主,具有其自身的优势和缺陷。

4.3.1 丝状真菌作为外源表达系统的优点^[32]

- (1) 具有可靠的安全性,成本低廉,操作简单。
- (2) 蛋白质分泌能力强。
- (3) 采用整合转化方式,对遗传育种有利。

翻译后蛋白的修饰和折叠更接近高等真核生物。

4.3.2 丝状真菌作为外源基因表达系统的自身缺陷

丝状真菌对真菌来源的同源蛋白的表达很理想,但是对哺乳动物和植物来源的异源蛋白的表达效果不是很好。概括起来,影响其产量因素主要包括以下几点:

- (1) 丝状真菌本身蛋白酶对其蛋白的降解。
- (2) mRNA 的水平及其稳定性。
- (3) 折叠酶或分子伴侣短缺,内质网,高尔基体不能正确加工和分泌蛋白^[32]。

4.3.3 丝状真菌作为外源基因表达系统的其他影响因素

除上述丝状真菌作为外源基因表达宿主自身存在的缺陷外,外源基因的转化方法,整合位点以及基因的结构对外源基因表达都具有一定的影响。

(1) 外源基因的转化方法

常用的 DNA 转化技术有:原生质体转化、农杆菌介导转化、电穿孔转化、基因枪转化^[33]。总体而言,原生质体转化技术是应用最好的一种。但另有报道说,原生质体技术在转化黑曲霉时并不成功,甚至都没产生转化子^[34]。所以,到现在为止,在预测某种转化方法是否可行上还没有一般规律。

(2) 外源基因的整合位点

如果外源基因整合到转录不活跃区域, 会导致外源基因的沉默。为使外源基因整合到特定位点, 避免随机整合。外源基因与纤维二糖水解酶 I 基因的启动子、终止子构建成线状表达载体盒, 能使外源基因定点整合至木霉的 *cbh1* 位点^[35]。

(3) 外源基因的结构

丝状真菌和酵母在信号序列上有明显的不同及在剪切位点上的差异, 使酵母不能对丝状真菌的 pre-mRNA 进行正确的加工, 因此穿梭表达较为困难。所以丝状真菌的基因在酵母中的表达则较为困难, 可见丝状真菌识别外源信号肽序列的能力要比酵母强^[36]。

(4) 外源蛋白的糖基化

丝状真菌能分泌范围广的糖蛋白, 使之成为异源表达的一个重要系统。但是, 异源表达蛋白对宿主的糖基化模式有一定的要求。过度糖基化可阻碍外源蛋白的运输和分泌。糖基化程度的不同, 也会影响蛋白的稳定性和半衰期, 改变其活性, 降低其与底物的亲和性^[37]。

4.3.4 提高外源基因的分泌与表达量的策略

为提高外源基因的分泌与表达量, 现在常用的几种策略有: 使用高效强启动子、使用融合蛋白、构建蛋白酶缺陷株、增强基因拷贝数、培养条件优化、影响蛋白质分泌途径^[37,38]。

(1) 使用高效的启动子

为达到异源蛋白过量表达的效果, 通常会选择一些宿主自身的强启动子来进行调控。研究表明, *cbh1* 启动子在黑曲霉中则表现为拷贝数越多增强效果越明显。另外, *glaA* 启动子也是黑曲霉作为异源表达宿主时普遍使用的强启动子。

(2) 构建融合蛋白

丝状真菌表达的很多自身的蛋白能够高效分泌到胞外, 构建融合蛋白。这种方法可以使异源蛋白的分泌量提高 5~100 倍。具体为利用异源基因取代某个分泌性良好的同源蛋白基因的 3'端, 表达出融合蛋白, 用这个丝状真菌自身的蛋白作为载体将目的蛋白“运出”细胞。通过基因融合表达融合蛋白的方法虽然得到了广泛的应用, 但是其背景知识仍然不是很清楚。

(3) 构建酸性蛋白酶缺陷菌株

研究发现丝状真菌自身表达的蛋白酶能够明显影响异源蛋白的产量, 可以根据此特点, 选择不同的种株系用于表达不同的目的蛋白。解决这个问题的另一种方法是通过诱变或基因敲除等技术筛选出特异的蛋白酶缺陷的丝状真菌突变株。刘丽等^[39]利用紫外诱变技术成功筛选出一株酸性蛋白酶活性缺陷的黑曲霉菌株, 其生长特性和糖化能力与一般菌株无异, 但其胞外酸性蛋白酶活性只有正常菌株的 0.76%。

(4) 菌株稳定性

丝状真菌的稳定性是分泌表达异源蛋白的前提, 多种外源和内源因素均可诱发丝状真菌细胞凋亡^[40]。首先, 在获得初始转化子后, 筛选一定数量的单孢子很重要, 可以降低阴性转化子和异核的可能性。另外, 丝状真菌表达异源蛋白所需的能量和代谢资源, 会增加细胞代谢的负担, 而且生产重组蛋白的菌株经常被不生产重组蛋白的菌株代替, 使得低产量或不产生异源蛋白的菌株生长效率更快。

(5) 增强基因的拷贝数

通常来说, 可以通过引入多拷贝的表达载体来提高表达。在黑曲霉中进行的增加葡糖淀粉酶基因拷贝数的实验表明, 在一定范围内(1~20 拷贝), 酶表达量与拷贝数成线性关系, 但随拷贝数的进一步提高, 表达不再升高, 原因或许是由于调控蛋白的滴定效应所造成。

(6) 培养条件的优化

丝状真菌生长的环境因素也会影响其稳定性, 进而影响表达的异源蛋白的稳定性。不同的培养方法产生的丝状真菌形态不同, 其分泌效率也会不同。菌体的生长反过来也会改变培养基的流动性, 造成碳源、氮源、氧气和 pH 值等在发酵罐中分布不均^[41]。

4.3.5 丝状真菌作为 β -葡萄糖苷酶基因表达

1979 年 Case 等^[42]首次在粗糙脉孢霉中建立了 DNA 转化系统, 人们逐渐发现丝状真菌作为外源基因表达系统的优越性, 并开始致力于丝状真菌在基因表达上的研究。现在, 通过生物技术手段的发展, 利用丝状真菌已经成功表达牛凝乳酶原、Fab 抗体片段、人体白细胞介素-6 和 1,2- α -甘露糖苷酶等^[43]。

5 β -葡萄糖苷酶的分泌及诱导

β -葡萄糖苷酶大多数是胞外酶^[44], 而且是诱导酶, 即只有外加纤维素或其他含 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键的葡聚糖和少数纤维寡糖时, 才能合成 β -葡萄糖苷酶并分泌到体外。在细胞内, β -葡萄糖苷酶的合成通常受到诱导和产物阻遏作用控制。细胞内合成的 β -葡萄糖苷酶浓度达到临界水平时, 由于产物的阻抑作用, 使得酶的合成关闭。如果增加酶的分泌与排出, 使细胞内的纤维素酶达不到临界水平, 酶的合成就成为连续的过程, 可以增加酶的产量^[45]。

蛋白质的分泌是涉及多种细胞器的复杂过程^[46]。丝状真菌的外源蛋白的分泌有可能在蛋白质分泌的某个或某几个环节中受到障碍。

(1) 内质网: 分泌表达的异源蛋白需要在内质网中经正确折叠后才具有生物活性, 未正确折叠的蛋白会滞留在内质网中或被内质网降解清除, 这将严重影响蛋白的转运和分泌^[47]。

(2) 高尔基体: 正确折叠的蛋白质从内质网靶向高尔基体进行进一步的修饰, 说明蛋白的修饰与分泌主要在菌丝的顶端^[48]。

(3) 囊泡: 细胞物质转运实质上是细胞内的一个庞大而复杂的物流系统。分泌途径是胞外蛋白生产的关键, 囊泡是这一物流系统中的一种可调控的重要的运输工具。丝状真菌中的囊泡转运可能是异源蛋白生产的瓶颈, 且具有潜在的可提高分泌能力的机制^[49]。液泡内含有很多液泡蛋白水解酶, 如液泡靶向信号不存在, 则到达液泡的蛋白便被降解, 说明液泡靶向能依赖于错误折叠蛋白的伸展二级结构形式的识别^[50]。一些研究机构也正在构建一些不分泌液泡水解酶的丝状真菌菌株, 用于商业生产异源蛋白^[51]。

6 结论

化石能源消耗导致的气候变化是本世纪最令人关注的问题之一。作为替代能源, 生物质能源成为研究热点。纤维素作为自然界中利用潜力最大的可再生生物质资源, 是将可再生糖类化合物积累最丰富的一种物质。有效转化和利用这些丰富的资源, 对纤维素进行生物转化, 对于防治环境污染、改变气候变暖和开辟新能源等具有非常重要的现实意义。近些年, 利用纤维素酶高效分解秸秆产糖和产乙醇已逐渐得到国内外学者的关注。产纤维素酶菌株活性不高仍然是目前纤维素酶生产和实际应用中存在的难题, 因此, 选育纤维素酶高产菌株是拓展纤维素酶应用范围的重要环节。对于目前存在的 β -葡萄糖苷酶活力低下、产量不高的问题, 研究的重点应放在提高酶产量、活力和稳定性上, 可以通过菌种筛选和育种、诱变、基因克隆等手段提高酶的活力。丝状真菌作为一个具有吸引力的异源基因表达系统, 引起广泛关注, 对于丝状真菌外源蛋白质表达系统分泌途径还有待进一步研究以揭示其合成及分泌网络。

参考文献

- [1] 唐德芳, 裴小琼, 李晓璐, 等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的筛选、克隆及表达[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(3): 423-426.
Tang DF, Pei XQ, Li XL, et al. Screening, cloning and expression of *Aspergillus niger* β -glucosidase [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2009, 15(3): 423-426.
- [2] Michael EH, Mark FR, Charles E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass [J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10(4): 358-364.
- [3] 王志江, 魏红福. β -葡萄糖苷酶的研究[J]. 饲料工业, 2006, 22: 20-22.
Wang ZJ, Wei HF. Study on the β -glucosidase [J]. Feed Ind, 2006, 22: 20-22.
- [4] 朱凤妹, 杜彬, 李军, 等. 响应面法优化米曲霉 3.481 产 β -葡萄糖苷酶发酵工艺的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(5): 35-42.
Zhu FM, Du B, Li J, et al. Study on optimization of the fermentation technology for β -glucosidase from *Aspergillus oryzae* 3.481 by response surface method [J]. J Chin Inst Food Sci Tech, 2009, 9(5): 35-42.
- [5] Dutta N, Mukhopadhyay A, Dasgupta AK, et al. Improved production of reducing sugars from rice husk and rice straw using bacterial cellulase and xylanase activated with hydroxyapatite nanoparticles [J]. Bioresour Technol, 2014, 153: 269-277.
- [6] 彭志英. 食品生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
Peng ZY. Food Biotechnology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999.
- [7] 潘利华, 罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 803-805.
Pan LH, Luo JP. Study and application progress of β -glucosidase [J]. Food Sci, 2006, 27(12): 803-805.
- [8] Zhu FM, Du B, Li J. Aroma enhancement and enzymolysis regulation of grape wine using β -glucosidase [J]. Food Sci Nutr, 2014, 2(2): 139-145.
- [9] 林宇野. 丝状真菌产生 β -葡聚糖酶的研究 I. GCN 平板的建立及产酶菌株的选育[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 1995, 11(3): 94-101.
Lin YY. Study on the silk-like fungus producing β -glucosidase I establishment of GCN plate and selection of β -glucosidase producing strain [J]. J Fujian Norm Univ (Nat Sci), 1995, 11(3): 94-101.
- [10] 石彩蕊. 黑曲霉诱变育种产 β -葡萄糖苷酶研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2011.
Shi CR. Study on β -glucosidase by *Aspergillus niger* mutation breeding [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2011.
- [11] Yeoh HH, Tan TK, Chua SL, et al. Properties of β -glucosidase purified from *Aspergillus niger* [J]. MIRCEN J, 1988, 4: 425-430.
- [12] 朱凤妹, 李军, 杜彬, 等. 黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶发酵培养基的优化研究[J]. 酿酒科技, 2008, 3: 43-47.
Zhu FM, Li J, Du B, et al. Study on optimization of β -glucosidase culture form *Aspergillus niger* [J]. Brewing Technol, 2008, 3: 43-47.
- [13] 朱凤妹, 杜彬, 刘长江, 等. β -葡萄糖苷酶产生菌摇瓶发酵条件的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 422-424.
Zhu FM, Du B, Liu CJ, et al. Study on conditions optimization of β -glucosidase shaking flask fermentation [J]. Food Sci, 2008, 29(8): 422-424.
- [14] 刘敏, 鹿金颖, 潘毅. 植物空间诱变育种[J]. 大自然, 2009, 6: 14-17.
Liu M, Lu JY, Pan Y. Space mutation breeding of plants [J]. Nature Mag, 2009, 6: 14-17.
- [15] 张玉梅, 李军, 国石磊, 等. 复合诱变选育酸性蛋白酶缺陷菌株[J]. 食品科技, 2014, 39(5): 15-17.
Zhang YM, Li J, Guo SL, et al. Screening of high acid protease producing mutant strains with compound mutagenesis [J]. Food Sci Technol, 2014, 39(5): 15-17.
- [16] 朱凤妹. 原生质体融合曲霉菌株 β -葡萄糖苷酶的酶学性质及对葡萄酒增香调控作用的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2008.
Zhu FM. Studies on the properties of β -glucosidase from *Aspergillus sp.*

- obtained by protoplast fusion and aroma-enhancing of grape wine [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2008.
- [17] 王沁, 赵学慧. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的纯化与性质[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1992, 31(6): 687–691.
- Wang Q, Zhao XH. Study on purification and properties of β -glucosidase from *Aspergillus niger* [J]. J Xiamen Univer (Nat Sci), 1992, 31(6): 687–691.
- [18] Zhu FM, Du B, Gao HS, Liu CJ, Li J. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from the protoplast fusing of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* [J]. Appl Biochem Micro, 2010, 46(6): 626–632.
- [19] Zhu FM, Du B, Li J. Improvement of β -glucosidase production by protoplast fusion between *Aspergillus oryzae* 3.481 and *Aspergillus niger* 3.316 using response surface methodology [J]. Biotechnol Biotec Eq, 2012, 26(6): 3378–3384.
- [20] Paavilainen S, Hillman JP. Purification, characterization, gene cloning, and sequencing of a new beta-glucosidase from *Bacillus circulans* subsp. *Alkalophilus* [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 927–932.
- [21] Dayan FE, Kuhajek JM, Canel C, et al. Podophyllum peltatum possesses a beta-glucosidase with high substrate specificity for the aryltetralin lignan podophyllotoxin [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1646(1–2): 157–163.
- [22] 韩笑, 陈介南, 王义强, 等. β -葡萄糖苷酶基因的克隆与表达研究进展[J]. 生物技术通报, 2008, 3: 8–12.
- Han X, Chen JN, Wang YQ, et al. Research advances of β -glucosidase gene cloning and gene expression [J]. Bio Technol Bull, 2008, 3: 8–12.
- [23] 姜天一. 菊芋 P450 还原酶基因取代载体的构建用于青蒿酸酵母工程菌的优化研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- Jiang TY. Studies on the construction of the P450 reductase gene replacement vector for the optimization of the engineered artemisinin producing yeast [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2007.
- [24] 姜天一, 朱平. 丝状真菌异源蛋白表达系统研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(6): 1050–1052.
- Jiang TY, Zhu P. Advances in research of heterologous expression in Filamentous fungi [J]. Lett Biotech, 2007, 18(6): 1050–1052.
- [25] Moralejo FJ, Cardoza RE, Gutierrez S. Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoter and high gene dosage [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65:1168–1174.
- [26] Fowler T, Berka RM, Ward M. Regulation of the *glaA* gene of *Aspergillus niger*[J]. Curr Genet, 1990, 18: 537–545.
- [27] Verdoes JC, Punt PJ, Stouthamer AH, et al. The effect of multiple copies of the upstream region on expression of the *Aspergillus niger* glucoamylase-encoding gene [J]. Gene, 1994, 145: 179–187.
- [28] Fowler T, Berka RM. Gene expression systems for filamentous fungi [J]. Curr Opin Biotechnol, 1991, 2: 691–697.
- [29] Gouka RJ, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ. Efficient production of secreted protein by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 47:1–11.
- [30] Conesa A, van den Hondel CA, Punt PJ. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger* [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 3016–3023.
- [31] 李庆华. 高产 β -葡萄糖苷酶酿酒酵母的筛选及其发酵特性的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2009.
- Li QH. Screening of the wine yeast rich in β -glucosidase and its fermenting characteristic [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2009.
- [32] 陈明, 陈文静. 几种微生物表达系统的比较[J]. 安徽农学通报, 2011, 17(3): 68–71.
- Chen M, Chen WJ. Comparisons of some microbial expression systems [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2011, 17(3): 68–71.
- [33] Michielse CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CA, et al. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi [J]. Curr Gene, 2005, 48(1): 1–17.
- [34] 程度. 丝状真菌表达外源蛋白的研究进展[J]. 中山大学研究生学刊(自然科学版), 2001, 22(1): 59–61.
- Cheng D. Recent advances of exogenous gene expression in filamentous fungi [J]. J Gradu Sun Yat-sen Univer (Nat Sci), 2001, 22(1): 59–61.
- [35] Punt PJ, Schuren FH, Lehmebeck J, et al. Characterization of the *Aspergillus niger* prtT, a unique regulator of extracellular protease encoding genes [J]. Fungal Genet Biol, 2008, 45(12): 1591–1599.
- [36] 刘德辉, 黄毓茂, 徐蕙. 丝状真菌异源蛋白高效表达的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 2(23): 221–223.
- Liu DH, Huang YM, Xu H. Study progress of heterologous protein expression in filamentous fungi [J]. Chinese J Biol Prod, 2010, 2(23): 221–223.
- [37] 廖德芳. 耐热 β -葡萄糖苷酶细菌的筛选、基因的克隆与表达[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- Liao DF. Screening, cloning and expression of bacterial thermophilic β -glucosidase [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010.
- [38] 陈卫红. 嗜热子囊菌光孢变种 β -葡萄糖苷酶的基因克隆、表达及酶学性质分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- Chen WH. Cloning, expression and analysis of enzyme properties of β -glucosidase from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2009.
- [39] 刘丽, 刘谨, 仇润祥, 等. 丝状真菌表达分泌系统中受体菌的构建[J]. 生物工程学报, 2002, 18(6): 667–670.
- Liu L, Liu J, Qiu RX, et al. Construction of recipient strain of expression-secretion system in filamentous fungi [J]. Chin J Biotech, 2002, 18(6): 667–670.
- [40] 唐开宇, 张全, 佟明友. β -葡萄糖苷酶发酵技术的进展[J]. 纤维素科学

- 技术, 2009, 17(3): 65–68.
- Tang KY, Zhang Q, Tong MY. Advance in fermentation for β -glucosidase [J]. J Cell Sci Technol 2009, 17(3): 65–68.
- [41] Pollack JK, Steven D. Autophagy in filamentous fungi [J]. Fungal Gen Biol, 2009, 46(1): 1–8.
- [42] Case ME, Schweizer M, Kushner SR, *et al.* Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5259–5263 .
- [43] Helena Nevalainen KM, Te'o VSJ, Bergquist PL. Heterologous protein expression in filamentous fungi [J]. Trends Biotechnol, 2005, 23(9): 468–474 .
- [44] 许晶, 张永忠, 孙艳梅. β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(6): 183–186.
- Xu J, Zhang YZ, Sun YM. Research progress of β -glucosidase [J]. Food Res Develop, 2005, 26(6): 183–186.
- [45] Narasirtha G, Sridevi A, Buddolla V, *et al.* Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* [J]. Afr J Biotechnol, 2006, 5(5): 472–476.
- [46] Kruse KB, Brodsky JL, McCracken AA. Characterization of an ERAD gene as VPS30 / ATG6 reveals two alternative and functionally distinct protein quality control pathways: one for soluble Z variant of human alpha-1 proteinase inhibitor (A1PiZ) and another for aggregates of A1PiZ [J]. Mol Biol Cell, 2006, 17 (1): 203–212.
- [47] Shoji JY, Arioka M, Kitamoto K. Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: Insights into their application for protein production [J]. Biotechnol Lett, 2008, 30(1): 7–14.
- [48] Conibear E, Stevens TH. Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1404(1–2): 211–230.
- [49] Ohneda M, Arioka M, Kitamoto K. Isolation and characterization of *Aspergillus oryzae* vacuolar protein sorting mutants [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(8): 4856–4861.
- [50] Pollack JK, Steven D. Autophagy in filamentous fungi [J]. Fungal Gen Biol, 2009, 46(1): 1–8.
- [51] Wiebe MG, Robson GD, Shuster J, *et al.* Evolution of a recombinant (gucoamylase-producing) strain of *Fusarium venenatum* A3/5 in chemostat culture [J]. Biotechnol Bioeng, 2001, 2: 146–156.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



朱凤妹, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: zhufengmei0714@163.com

李军, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: spgcx@163.com