

糖苷水解酶第3家族 β -葡萄糖苷酶的研究进展

周林芳^{1,2}, 江波^{1,*}, 张涛¹, 李淑华²

(1.江南大学,食品科学与技术国家重点实验室,江苏无锡 214122;

2.江苏工程职业技术学院,江苏南通 226007)

摘要: β -葡萄糖苷酶属于糖苷水解酶家族,在食品、医药、生物质转化中有着重要的作用。本文主要对糖苷水解酶家族3的 β -葡萄糖苷酶进行综述,主要包括理化性质、底物特异性、反应动力学、三维结构、催化残基和酶基因克隆表达等几个方面,为从基础领域研究该家族此酶的催化机理及表达调控机制提供参考。

关键词: β -葡萄糖苷酶,糖苷水解酶家族,三维结构,催化残基,克隆表达

Research progress of β -glucosidases of glycoside hydrolase family 3

ZHOU Lin-fang^{1,2}, JIANG Bo^{1,*}, ZHANG Tao¹, LI Shu-hua²

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.Jiangsu College of Engineering and Technology, Nantong 226007, China)

Abstract: β -Glucosidases belong to glycoside hydrolase (GH) families. They play an important role in food industry, medicine field and biomass conversion process. In this paper, the physical and chemical properties, substrate specificity, reaction kinetics, three-dimensional structure, catalytic residues, gene cloning and expression of GH3 β -glucosidases were reviewed in detail. This summarization provides reference to research on the catalytic mechanism and expression regulatory mechanism of this enzyme from basic area.

Key words: β -glucosidase; glycoside hydrolase family; three-dimensional structure; catalytic residues; gene cloning and expression

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2017)14-0330-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.14.065

β -葡萄糖苷酶(β -D-Glucosidase, EC 3.2.1.21)是糖苷水解酶家族(Glycoside Hydrolase (GH) families)中的一大类酶,其主要功能是水解结合于底物末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键,同时释放出 β -D-葡萄糖和相应的配基^[1]。该酶存在于几乎所有的生物体内,是生物体糖代谢途径中不可或缺的一类酶。根据碳水化合物活性酶数据库(Carbohydrate-Active enzymes Database, CAZy),依据氨基酸序列的同源性和结构的相似性,已知的 β -葡萄糖苷酶被归为GH1、GH3、GH5、GH9、GH30和GH116等6个家族中^[2-4],微生物来源的 β -葡萄糖苷酶主要属于GH1和GH3,许多真菌来源的 β -葡萄糖苷酶属于GH3家族^[5]。近年来,对GH3家族的 β -葡萄糖苷酶的研究有了很大进展。

1 β -葡萄糖苷酶的理化性质

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^[6],其相对分子量一般在40~330 kDa之间,可能由单亚基、双亚基或多亚基组成。有的菌株本身就能产多种 β -葡萄糖苷酶,如Decker等^[7]就从*Aspergillus tubingensis*中分离出四种 β -葡萄糖苷酶,这四种酶的性质各异。就算相同来源的 β -葡萄糖苷酶,其理化性质也存在较大差异。

表1列出了部分不同来源GH3家族 β -葡萄糖苷酶的基本性质。从表1来看,大部分GH3家族的 β -葡萄糖苷酶最适pH在4.0~6.5之间,且在酸性范围内稳定性较好。相对于其他纤维素酶, β -葡萄糖苷酶的最适温度一般较高,大多在50~70℃之间,且具有很好的热稳定性,特别是一些真菌来源的 β -葡萄糖苷酶,这种特性对于工业应用来说非常有利。

2 底物特异性

GH3家族成员广泛分布于细菌、真菌和植物中,许多GH3酶具有广泛的底物特异性,有的可以称为

收稿日期:2016-12-12

作者简介:周林芳(1979-),女,博士研究生,讲师,研究方向:食品生物技术,E-mail:cathyzhou852@126.com。

*通讯作者:江波(1962-),男,博士,教授,研究方向:酶在食品生物制造中的应用,E-mail:hjiang@jiangnan.edu.cn。

基金项目:十二五863计划糖质资源高效生物利用关键技术研究(2013AA102102);江苏工院科研计划项目(GYKY/2015/10)。

表 1 部分不同来源 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的性质
Table 1 Characteristics of GH3 family β -glucosidases from different sources

来源	分子量 (kDa)	四级结构	最适 pH	最适温度 ($^{\circ}\text{C}$)	K_m (mmol/L)	V_{max} (U/mg protein)
<i>Aspergillus niger</i> ^[8]	330	三聚体	4.6~5.3	70	1.1	NR
<i>Aspergillus niger</i> ^[9]	128	单体	4.5	70	2.9	565
<i>Aspergillus oryzae</i> ^[10]	43	单体	5.0	50	0.55	1066
<i>Chalara paradoxa</i> ^[11]	170	单体	4.0~5.0	45	0.52	294
<i>Aspergillus tubingensis</i> ^[7]	131	NR	4.6	65	0.76	63.7
	126		4.0	65	0.35	40.3
	54		5.0	60	3.2	21.4
	54		5.0	60	6.2	28.4
<i>Stachybotrys</i> sp. ^[12]	75	单体	5	50	0.27	78
<i>Daldinia eschscholzii</i> ^[13]	64	单体	5	50	1.52	3.21
<i>Fomitopsis pinicola</i> ^[14]	105	单体	4.5	50	1.8	1710
<i>Penicillium decumbens</i> ^[15]	120	NR	4.5~5.0	65~70	0.0064	1.30 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{L})$
<i>Penicillium purpurogenum</i> ^[16]	110	单体	5.0	65	5.1	934
<i>Humicola insolens</i> ^[17]	55	二聚体	6~6.5	60	0.16	18.1
<i>Stachybotrys microspora</i> ^[18]	225	单体	5	50~60	0.9	27.77

注:NR 表示未报道。

“双功能”酶。比如来自大麦的 ExoI^[19]和来自假单胞菌的 ExoP^[20],它们虽然都具有 β -葡萄糖苷酶活性,但更确切的来说应为 β -D-葡聚糖外切酶和外切 β -1,3/1,4-葡聚糖酶。另外,GH3 的 β -葡萄糖苷酶可水解的底物类型也很多样,除可强烈水解 4-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pNPG)外,不同来源的 β -葡萄糖苷酶还可水解 4-硝基苯基- β -D-岩藻吡喃糖苷^[21~22]、4-硝基苯基- β -D-半乳糖苷、4-硝基苯基- β -D-纤维二糖苷、纤维二糖、纤维三糖、纤维四糖等^[16]。因此,研究中测 β -葡萄糖苷酶的酶活和动力学参数常以 pNPG 为底物。

3 反应动力学和机理

在 β -葡萄糖苷酶所属的 6 个家族中,只有 GH9 家族成员是遵循一步法异头物构型反转催化机理,其他家族成员包括 GH3 家族的催化机制都是典型的 Koshland 双取代“两步法”构型保持机理。对于 β -葡萄糖苷酶来说,其催化过程分为两个阶段:糖基化和去糖基化(见图 1)^[23]。主要参与反应的是作为亲核试剂和酸/碱的氨基酸残基,通常是天冬氨酸和谷氨酸。第一步:酶上作为亲核试剂的残基进攻底物糖苷键上异头碳中心,同时作为酸催化剂的另一个羧基上的氢与底物糖苷键上的氧原子形成氢键,第一

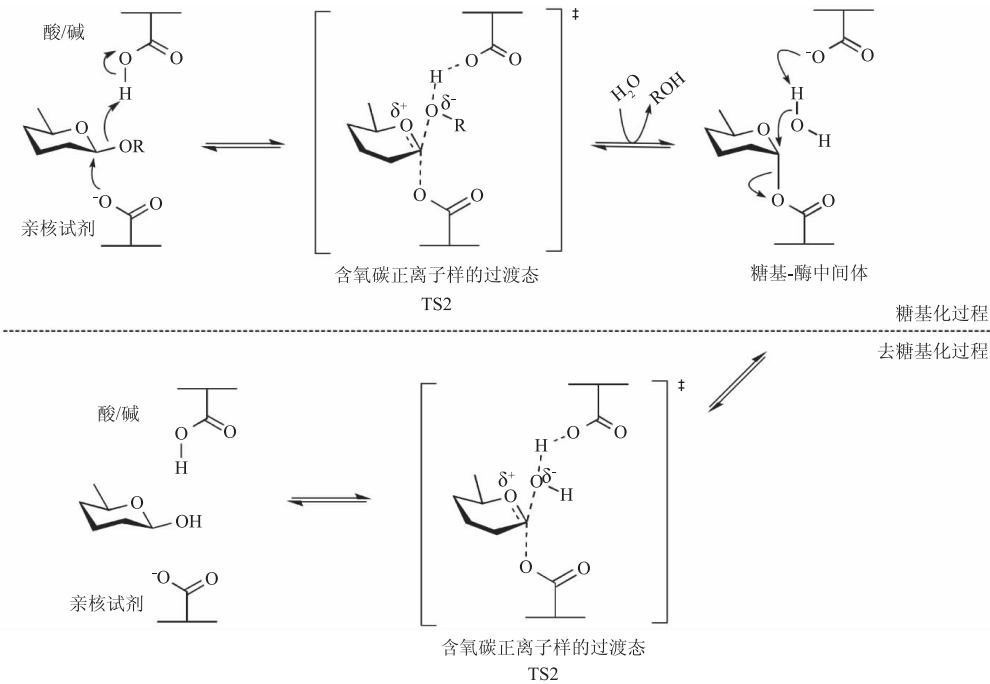


图 1 β -葡萄糖苷酶双取代“两步法”构型保持机理
Fig.1 A two step double-displacement retaining mechanism for β -glucosidase

表2 具有 β -葡萄糖苷酶活性的蛋白信息Table 2 Information of proteins owning β -glucosidase activity

序号	来源	名称	氨基酸 个数/aa	GenBank 登陆号	蛋白四级 结构	PDB code	结构域
1	<i>Hordeum vulgare</i> ^[19]	ExoI	605	AAD23382	单亚基	1EX1	2
2	<i>Thermotoga neapolitana</i> ^[24]	Bgl3B	721	ABI29899	单亚基	2X40	3
3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ^[25]	KmBglI	845	CAA29353	四聚体	3ABZ	4
4	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.BB1 ^[20]	ExoP	822	ABC88234	单亚基	3USZ	3
5	<i>Streptomyces venezuelae</i> ^[26]	DesR	829	ACR54627	二聚体	4I3G	3
6	<i>Aspergillus aculeatus</i> ^[5]	AaBGLI	841	BAA10968	二聚体	4IIB	3
7	<i>Hypocrea jecorina</i> ^[27]	HjCel3A	713	AAA18473	单亚基	3ZYZ	3
8	<i>Aspergillus fumigates</i> ^[28]	Af β G	844	-	二聚体	5FJI	3
9	<i>Aspergillus oryzae</i> ^[28]	Ao β G	842	XP_001816831	四聚体	5FJJ	3
10	<i>Rasamsonia emersonii</i> ^[4]	ReCel3A	857	AAL69548	四聚体	5JU6	3

次形成含氧碳正离子样的过渡态 (Oxocarbenium-like transition state) TS1, 经过键的形成又断裂, 糖基分子的异头碳构型发生第一次翻转, 并与亲核羧基形成酯键, 生成共价糖基-酶中间体 (glycosyl-enzyme intermediate), 该步即糖基化过程; 第二步去糖基化过程即糖基-酶中间体的水解, 之前作为酸催化剂的残基现在作为碱催化剂使进攻的水分子去质子化, 水分子上的活性羟基氧亲核进攻糖基-酶中间体中糖基分子的异头碳, 第二次形成含氧碳正离子样的过渡态 TS2, 又使异头碳构型发生翻转, 两个催化残基恢复到原始状态而完成整个反应, 因此反应的最终结果是产物葡萄糖的异头碳构型没有发生改变。

4 三维结构

截止到 2016 年 10 月, 根据 CAZy 数据库持续更新的数据, GH3 家族包含了 12012 个条目。尽管有大量已知的氨基酸序列, 但 GH3 家族成员的结构信息还很有限。由于 GH3 家族成员蛋白结构排列的高度多样性, 该家族的进化史是复杂的。特别是真菌来源的 β -葡萄糖苷酶, 虽然在工业上已有重要的应用, 但丝状真菌结构复杂, 所产酶系非常发达, 其晶体结构也是最后被解析。到目前为止, 仅有 10 个具有 β -葡萄糖苷酶活性的蛋白结构被彻底表征和报道, 其基本信息见表 2。

从表 2 中可以看出, 不同来源的 β -葡萄糖苷酶蛋白结构由单亚基到四聚体不等, 单体的结构域大多为 3 个。最早发现的大麦 ExoI 是典型的 GH3 家族双结构域, 即 (β/α)₂ 筒状结构和 (α/β)₂ 夹层结构, 具有催化作用的活性位点分别位于这两个结构域上。而 ReCel3A、HjCel3A、AaBGLI、Af β G、Ao β G、KmBglI 和 TnBgl3B 这七个蛋白的 (β/α)₂ 筒状结构中的前两个 α 螺旋结构发生缺失, 同时第二个 β 折叠结构反向平行, 从而形成 $\beta\beta$ (β/α)₂ 桶装结构, 另外这些蛋白都具有第三个结构域-纤连蛋白 III (Fn III), 该结构域可能对蛋白的稳定性有帮助^[4]。剩下的两个 ExoP 和 DesR, 除都具有同 ExoI 相似的 (β/α)₂ 筒状结构和 (α/β)₂ 夹层结构外, 它们的第三个结构域分别是纤连蛋白 III 和 PA14。而唯一具有四个结构域的 KmBglI 蛋白, 其第四个结构域也是

PA14。由于 PA14 并不保守, 目前对于其功能还不清楚, 但因为 PA14 插入到 (α/β)₂ 夹层结构中, KmBglI 对于小的底物有更好的活性^[25]。图 2 分别为不同结构域 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶单体的蛋白结构, 研究结果发现, 这些酶的整体结构非常相似, 表明它们是从同一个祖先进化而来^[25]。后来发现的其他几个 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的蛋白结构也有类似的现象。

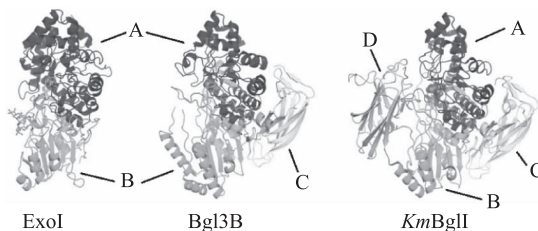


图2 三个不同结构域 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的蛋白结构^[5]

Fig.2 Protein structures of three GH3 family β -glucosidases of different domains^[5]

注: A 表示桶状结构域, B 表示 α/β 夹层结构域, C 表示纤连蛋白 III 结构域, D 表示 PA14 结构域。

5 催化残基

现在, 通过序列比对可以很容易确定 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的亲核催化残基, 很多实验已经证明多种物种来源的 GH3 家族酶的亲核催化残基是高度保守的, 而作为广义酸碱对的催化残基的位置和身份却并不保守^[5]。早在 1974 年, Bause 和 legler 就认为 *Aspergillus wentii* 产的 β -葡萄糖苷酶中天冬氨酸残基 (序列 VMSDW) 是假定的亲核催化试剂, 同时认定该酶是 GH3 的成员^[29]。直接的证明来自于 Dan 等人^[30]的研究结果, 来源于 *Aspergillus niger* 的 β -葡萄糖苷酶中 Asp261 作为亲核催化残基 (序列 VMSDW), 同时证明 Asp261 在这个家族中是高度保守的, 两者的结果吻合。后续研究证明 GH3 中 β -葡萄糖苷酶的亲核催化残基通常是天冬氨酸, 而谷氨酸残基则作为酸碱催化试剂。如来自大麦的 ExoI 的催化残基分别是 Asp285 和 Glu491^[19]; 来自耐热细菌的 Bgl3B 的催化残基是 Asp242 和 Glu458^[24]; 来自假

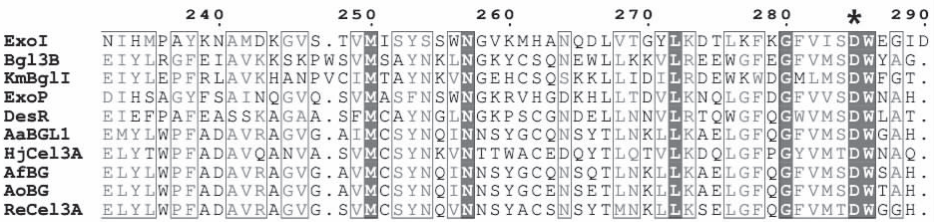


图3 已知结构 GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的部分蛋白序列比对
Fig.3 Multiple sequence alignment of known structure GH3 family β -glucosidases
注：* 表示亲核残基位置。

表3 GH3 家族部分 β -葡萄糖苷酶基因在真核系统中的表达
Table 3 Partial β -glucosidase genes of GH3 family expressed in eukaryotic systems

菌株	表达宿主	基因序列长度	GenBank 登录号
<i>Aspergillus niger</i> BI ^[30]	毕赤酵母	2583bp/860aa	CAB75696
<i>Talaromyces emersonii</i> ^[32]	里氏木霉	2917bp/857aa	AY072918
<i>Thermoascus aurantiacus</i> IF09748 ^[33]	毕赤酵母	2586bp/862aa	DQ114397
<i>Aspergillus niger</i> ZU-07 ^[34]	里氏木霉	2526bp/842aa	-
<i>Paecilomyces thermophila</i> ^[35]	毕赤酵母	2557bp/858aa	HM998770
<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5 ^[36]	毕赤酵母	2622bp/844aa	HQ836475
<i>Aspergillus niger</i> ASKU28 ^[37]	毕赤酵母	2526bp/841aa	JX127252
<i>Aspergillus niger</i> NL-1 ^[38]	毕赤酵母	2583bp/861aa	HQ385276
<i>Aspergillus oryzae</i> GIF-10 ^[39]	毕赤酵母	2586bp/862aa	-
<i>Aspergillus niger</i> BE-2 ^[40]	毕赤酵母	2583bp/860aa	KJ724529

单胞菌的 ExoP 的催化残基是 Asp293 和 Glu493^[20]；而来自棘孢曲霉的 AaBGL1 的催化残基则是 Asp280 和 Glu509^[5]等。图3 为上述十个已知蛋白结构 β -葡萄糖苷酶的部分氨基酸序列比对结果。从结果来看, GH3 家族 β -葡萄糖苷酶的亲核催化残基非常保守。

6 β -葡萄糖苷酶基因的克隆表达

由于植物来源的 β -葡萄糖苷酶活性不高, 目前的研究主要集中于各种微生物。虽然产 β -葡萄糖苷酶的微生物多样, 如曲霉、木霉、酵母和细菌等, 但产量均较低, 不宜大规模生产。而 β -葡萄糖苷酶作为纤维素酶系中的重要成员^[31], 对其基因方面的研究已有较长的历史, 自上世纪 70 年代以来, 已有多种来源的成百个 β -葡萄糖苷酶基因被克隆, 其中又以微生物来源居多。许多 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶基因被成功克隆并表达于不同的系统中。

大肠杆菌表达系统是基因表达技术中发展最早, 应用最广的经典表达系统, 但很多 GH3 家族的 β -葡萄糖苷酶来源于真菌, 对于原核表达系统, 因缺少真核生物的翻译后加工过程, 产生的外源基因可能没有活性或表达的蛋白以包含体的形式存在^[31]。如 Dan 等^[30]把来源于 *Aspergillus niger* 的 β -葡萄糖苷酶基因分别表达于大肠杆菌、酿酒酵母和毕赤酵母中, 结果该基因在大肠杆菌中不表达, 在酿酒酵母中表达水平很低, 而在毕赤酵母中表达水平较高(约 0.5 g/L), 且上清中几乎没有杂蛋白。

随着真核表达系统的建立和完善, 近年来, 越来越多的研究主要集中于 β -葡萄糖苷酶基因在真核系统中表达, 特别是毕赤酵母表达系统。毕赤酵母表

达系统是上世纪 80 年代初期发展起来的一种新型的外源蛋白表达系统, 作为真核表达系统, 它可以严格调控外源蛋白的表达, 表达量高, 在基因重组技术中得到越来越广泛的应用。表3 中是近十几年来 GH3 家族部分 β -葡萄糖苷酶基因在真核系统的成功表达案例, 毕赤酵母表达系统占大多数。

目前, 国内外用于研究和制备 β -葡萄糖苷酶的微生物主要有木霉属 (*Trichoderma*) 和曲霉属 (*Aspergillus*)。研究表明, 许多曲霉属是生产高活力 β -葡萄糖苷酶的优良菌株, 且被认为是不会产生毒素的纤维素酶产生菌。2007 年 2 月, 荷兰皇家帝斯曼 (DSM) 公司在著名的科学杂志《Nature Biotechnology》上首次公布黑曲霉基因组 DNA 序列^[41]。该研究通过测定 *Aspergillus niger* CBS 513.88 的 3390 万个碱基对的序列, 确定了 14165 个开放阅读框中 6506 个基因的潜在功能。其中属于 GH3 家族的具有潜在 β -葡萄糖苷酶功能的基因就有 11 个, 从国内外研究结果看, 目前已经确定的具有 β -葡萄糖苷酶活性的是 An18g03570 (2583bp/860aa), 该基因在大部分黑曲霉中都存在, 其序列相似度很高, 文献中大多相互为模板进行克隆, 也是被克隆最多的 β -葡萄糖苷酶基因, 而其他几个酶基因未见研究报道。

7 展望

β -葡萄糖苷酶作为纤维素酶系中的关键酶, 在食品和医疗等领域也有重要的应用价值, 它可作为风味酶用于果酒增香或脱苦、水解大豆异黄酮、生产低聚龙胆糖, 此外 β -葡萄糖苷酶还被用在乳品工业上分解乳糖、生产天然色素等, 因此近年来采用基因

工程与蛋白质工程手段获得优良的 β -葡萄糖苷酶已成为研究的热点。国内外许多研究机构正致力于 β -葡萄糖苷酶的分子生物学研究,从基础领域研究该酶的催化机理及表达调控机制,以期更好地改善其催化效率。GH3 家族 β -葡萄糖苷酶在该酶中占有很大比例,近年来对其的研究虽然取得了很大进展,但该酶的晶体结构还很有限,对某些结构域的具体功能还不十分清楚,对于结构和稳定性之间的关系仍不明确,基因工程菌的酶活力还有待提高,这些都是今后研究的方向。

参考文献

- [1] 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):803-807.
- [2] Henrissat B, Davies G. Structural and sequence - based classification of glycoside hydrolases [J]. Current Opinion in Structural Biology,1997,7(5):637-644.
- [3] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. Biochemical Journal,1991,280:309-316.
- [4] Gudmundsson M, Hansson H, Karkehabadi S, et al. Structural and functional studies of the glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase Cel3A from the moderately thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* [J]. Acta Crystallogr D Struct Biol,2016,72(Pt 7):860-870.
- [5] Suzuki K, Sumitani J-i, Nam Y-W, et al. Crystal structures of glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus* [J]. Biochemical Journal,2013,452:211-221.
- [6] 杨晓宽. β -葡萄糖苷酶研究进展[J].河北科技学院学报,2012,26(1):77-81.
- [7] Decker C H, Visser J, Schreier P. β -Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β -glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2001,55(2):157-163.
- [8] Rashid M H, Siddiqui K S. Purification and characterization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* [J]. Folia Microbiologica,1997,42(6):544-550.
- [9] Zhou L F, Li S H, Zhang T, et al. Properties of a novel polydatin- β -D-glucosidase from *Aspergillus niger* SK34.002 and its application in enzymatic preparation of resveratrol [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,2016,96(7):2588-2595.
- [10] Riou C, Salmon J M, Vallier M J, et al. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae* [J]. Applied and Environmental Microbiology,1998,64(10):3607-3614.
- [11] Lucas R, Robles A, de Cienfuegos G A, et al. β -glucosidase from *Chalara paradoxa* CH32: Purification and properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2000,48(8):3698-3703.
- [12] Amouri B, Gargouri A. Characterization of a novel β -glucosidase from a *Stachybotrys* strain [J]. Biochemical Engineering Journal,2006,32(3):191-197.
- [13] Karnchanatat A, Petsom A, Sangvanich P, et al. Purification and biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm [J]. FEMS Microbiology Letters,2007,270(1):162-170.
- [14] Joo A R, Jeya M, Lee K M, et al. Purification and characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2009,83(2):285-294.
- [15] Chen M, Qin Y, Liu Z, et al. Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation[J]. Enzyme and Microbial Technology,2010,46(6):444-449.
- [16] Jeya M, Joo A R, Lee K M, et al. Characterization of β -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2010,86(5):1473-1484.
- [17] Souza F H M, Nascimento C V, Rosa J C, et al. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens* [J]. Process Biochemistry,2010,45(2):272-278.
- [18] Saibi W, Gargouri A. Purification and biochemical characterization of an atypical β -glucosidase from *Stachybotrys microspora* [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,2011,72(3-4):107-115.
- [19] Varghese J N, Hrmova M, Fincher G B. Three-dimensional structure of a barley β -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase [J]. Structure,1999,7(2):179-190.
- [20] Nakatani Y, Cutfield S M, Cowieson N P, et al. Structure and activity of β -1,3/1,4- β -glucanase from marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. BB1 showing a novel C-terminal domain [J]. FEBS Journal,2012,279(3):464-478.
- [21] Chen L, Li N, Zong M-H. A glucose-tolerant β -glucosidase from *Prunus domestica* seeds: Purification and characterization [J]. Process Biochemistry,2012,47(1):127-132.
- [22] Asha B, Pathma J, Sakthivel N. Isolation and Characterization of a Novel Thermostable β -glucosidase from *Bacillus subtilis* SU40 [J]. Applied Biochemistry and Microbiology,2015,51(1):21-26.
- [23] Cairns J R K, Esen A. β -Glucosidases [J]. Cellular and Molecular Life Sciences,2010,67(20):3389-3405.
- [24] Pozzo T, Pasten J L, Karlsson E N, et al. Structural and functional analyses of β -glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*: a thermostable three-domain representative of glycoside hydrolase 3 [J]. Journal of Molecular Biology,2010,397(3):724-739.
- [25] Yoshida E, Hidaka M, Fushinobu S, et al. Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *Kluyveromyces*

marxianus[J].Biochemical Journal,2010,431:39-49.

[26] Zmudka M W, Thoden J B, Holden H M. The structure of DesR from *Streptomyces venezuelae*, a beta-glucosidase involved in macrolide activation [J]. Protein Science, 2013, 22 (7): 883-892.

[27] Karkehabadi S, Helmich K E, Kaper T, et al. Biochemical characterization and crystal structures of a fungal family 3 beta-glucosidase, Cel3A from *Hypocrea jecorina* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(45):31624-31637.

[28] Agirre J, Ariza A, Offen W A, et al. Three-dimensional structures of two heavily N-glycosylated *Aspergillus* sp family GH3 beta-D-glucosidases[J]. Acta Crystallographica Section D-Structural Biology, 2016, 72:254-265.

[29] Bause E, Legler G. Isolation and amino acid sequence of a hexadecapeptide from the active site of beta-glucosidase A3 from *Aspergillus wentii* [J]. Hoppe - Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 1974, 355(4):438-442.

[30] Dan S, Marton I, Dekel M, et al. Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* beta-glucosidase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(7):4973-4980.

[31] 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.

[32] Murray P, Aro N, Collins C, et al. Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 beta-glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii* [J]. Protein Expression and Purification, 2004, 38(2):248-257.

[33] Hong J, Tamaki H, Kumagai H. Cloning and functional expression of thermostable beta-glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(6):1331-1339.

(上接第329页)

[26] 侯玉艳, 桑兰, 游金坤, 等. 食用菌多酚的生物活性研究进展[J]. 中国食用菌, 2014(6):1-4.

[27] Ji H L, Lee S Y, Kim B, et al. Barley sprout extract containing policosanols and polyphenols regulate AMPK, SREBP2 and ACAT2 activity and cholesterol and glucose metabolism *in vitro*, and *in vivo* [J]. Food Research International, 2015, 72:174-183.

[28] Sato S, Yamate J, Hori Y, et al. Protective effect of polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats on the renal cortex in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2005, 16(9):547-553.

[29] Frankel E N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids [J]. Trends in Food Science & Technology, 4:220-225.

[30] Shan B, Cai Y Z, Brooks J D, et al. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(1):112-119.

[34] Wang B B, Xia L M. High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei* [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(6):4568-4572.

[35] Yan Q J, Hua C W, Yang S Q, et al. High level expression of extracellular secretion of a beta-glucosidase gene (PtBglu3) from *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2012, 84(1):64-72.

[36] Liu D Y, Zhang R F, Yang X M, et al. Characterization of a thermostable beta-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33 [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11:25.

[37] Thongpoo P, McKee L S, Araujo A C, et al. Identification of the acid/base catalyst of a glycoside hydrolase family 3 (GH3) beta-glucosidase from *Aspergillus niger* ASKU28 [J]. Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects, 2013, 1830(3):2739-2749.

[38] Zhao L G, Zhou T C, Li X, et al. Expression and characterization of GH3 beta-Glucosidase from *Aspergillus niger* NL-1 with high specific activity, glucose inhibition and solvent tolerance [J]. Microbiology, 2013, 82(3):356-363.

[39] Tang Z Z, Liu S, Jing H J, et al. Cloning and expression of A. oryzae beta-glucosidase in *Pichia pastoris* [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(11):7567-7573.

[40] Ali N, Ting Z, Li H L, et al. Heterogeneous expression and functional characterization of cellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger* for enzymatic hydrolysis of alkali pretreated bamboo biomass [J]. Molecular Biotechnology, 2015, 57(9):859-867.

[41] Pel H J, de Winde J H, Archer D B, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88 [J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(2):221-231.

[31] 张花利, 冯进, 董晓娜, 等. 黑豆皮中黄酮提取及粗提物抑菌效果研究[J]. 大豆科学, 2011(3):497-501.

[32] Gan R Y, Deng Z Q, Yan A X, et al. Pigmented edible bean coats as natural sources of polyphenols with antioxidant and antibacterial effects [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 73:168-177.

[33] Cai Y, Luo Q, Sun M, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer [J]. Life Sciences, 2004, 74(17):2157-2184.

[34] 胡艳, 郭红辉, 王庆, 等. 黑米花色苷提取物对高脂膳食诱导大鼠肥胖形成的影响[J]. 食品科学, 2008(2):376-379.

[35] Pazoki - Toroudi H, Amani H, Ajami M, et al. Targeting mTOR signaling by polyphenols: A new therapeutic target for ageing [J]. Ageing Research Reviews, 2016, 31:55-66.

[36] Jefferson W N, Williams C J. Circulating levels of genistein in the neonate, apart from dose and route, predict future adverse female reproductive outcomes [J]. Reproductive Toxicology, 2010, 31(3):272-279.