GH3家族新型海洋微生物β-葡萄糖苷酶基因的克隆、表达及重组酶性质研究

刘娟娟，方泽民，房　伟，洪宇植，彭　惠，张学成，肖亚中

（安徽大学生命科学学院，生物工程研究中心，合肥　230039）

摘要：从中国南海表层海水微生物宏基因组文库筛选到一β-葡萄糖苷酶阳性克隆pSB16D15，经亚克隆测序分析鉴定，其含一新型GH3家族β-葡萄糖苷酶基因（*bgl3*）开放阅读框（open reading frame，ORF）。*bgl3*由2 535个核苷酸组成，G＋C含量为43.03%，编码蛋白Bgl3由844个氨基酸组成，理论分子量为90 807 u，与来自*Glaciecola* sp. HTCC2999以及*Alteromonas macleodii* ATCC 27126的β-葡萄糖苷酶分别具有98%和61%的序列一致性。以pET22b(＋)为载体，成功实现*bgl3*在*E. coli* BL21(DE3)细胞异源表达，并获得性质稳定的重组蛋白产物。理化性质分析表明：重组蛋白rBgl3氧化pNPG的最适pH值为6.5～7.0，最适温度为45℃. rBgl3在pH值为7.0～9.0范围内具有较高的酶活及稳定性：35℃下保存1 h能保持至少90%的活力。在pH值为7.0、45℃条件下，rBgl3催化pNPG的比酶活为17.07 IU·mg^{-1}，K_m，V_{max}分别为1.80 mmol/L和0.81 μmol·min^{-1}·mg^{-1}. 当溶液中有10 mmol/L Cu^{2+}，Fe^{2+}和Fe^{3+}存在时，rBgl3的活性完全被抑制；葡萄糖、乙醇和EDTA对酶活性也有一定抑制作用。

关键词：分子生物学；β-葡萄糖苷酶；GH3家族；宏基因组文库

中图分类号：Q7　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674-2850(2011)03-0445-8

Cloning, expression and characterization of a novel β-glucosidase of GH3 family from marine microbial metagenome

LIU Juanjuan, FANG Zemin, FANG Wei, HONG Yuzhi, PENG Hui, ZHANG Xuecheng, XIAO Yazhong

(*Biotechnology Center, School of Life Science, Anhui University, Hefei* 230039, *China*)

Abstract: In the present study, a metagenome library of the marine microbes from the surface water of the South China Sea was screened for β-glucosidase. One positive clone named as pSB16D15 was obtained. It was subcloned and further analyzed in sequence. The results showed that there was an open reading frame (ORF) coding for a novel β-glucosidase of GH3 family member, which was nominated as *bgl3*. Further analysis showed that the 2 535-nucleotide-long ORF had a G+C content of 43.03%. The deduced product of *bgl3* consisted of 844 amino acids (aa) with the predicted molecular masses of about 90, 807 u, sharing the highest homology with β-glucosidases from *Glaciecola* sp. HTCC2999 and *Alteromonas macleodii* with 98% and 61% identity, respectively. Using pET22b(+) as vector and *E. coli* BL21(DE3) as host, Bgl3 was overexpressed recombinantly, with substantial enzymic activity obtained. The recombinant protein (rBgl3) was purified with Ni-NTA affinity chromatography and further biochemically characterized. With pNPG as substrate, the optimum pH and temperature for the hydrolytic activity of rBgl3 were determined as 6.5～7.0 and 45℃, respectively. The recombinant protein maintained the highest activity at pH range of 7.0～9.0. Distinguished from most other β-glucosidase, rBgl3 remained 90% of the initial activity after heat treatment at 35℃ for 1 h. Under the optimum conditions, rBgl3 hydrolyzed pNPG with an activity of 17.07 IU·mg^{-1}, a K_m of 1.80 mmol/L and a V_{max} of 0.81 μmol·min^{-1}·mg^{-1}. The activity of rBgl3 was completely inhibited by Fe^{3+}, Cu^{2+}, Fe^{2+} of 10 mmol/L, as well as EDTA, while 10 mmol/L K^+ had a little effect on it. Glucose and ethanol suppressed the activity of rBgl3, with 80% of the original activity lost in 10 mmol/L glucose and 50% lost in 5% ethanol.

Key words: molecular biology; β-glucosidase; GH3 family; metagenome

基金项目：国家高技术研究发展计划（863计划）（2007AA09Z421）；高等学校博士学科点专项科研基金（20093401110006）；安徽省优秀青年科技基金（08040106908）

作者简介：刘娟娟（1986—），女，硕士研究生，主要研究方向：生物化学与分子生物学

通信联系人：肖亚中，教授，主要研究方向：生物化学与分子生物学. E-mail：xiaoyz@yahoo.com

0 引言

β-葡萄糖苷酶（Bgls，EC 3.2.1.21）是一类在亲核试剂间催化转移糖苷的酶，可以在短链的寡糖或纤维二糖内部、带有芳香基团或烷基的碳水化合物的残基之间水解 β-1，4-糖苷键。Bgls 属于纤维素水解酶系，能与外切葡聚糖酶（EC 3.2.1.91）、内切葡聚糖酶（EC 3.2.1.4）协同作用将纤维素彻底降解为葡萄糖[1]。β-葡萄糖苷酶是一类重要的工业用酶，潜在应用广泛，例如：对生物质的降解和生产燃料乙醇[2~4]；作为重要的风味酶，释放出茶叶、葡萄酒以及果汁中的风味成分，起到增香作用[5]；合成重要的糖配体[6]等。

根据酶催化功能结构域的氨基酸序列和结构相似性，可将 β-葡萄糖苷酶归类为糖基水解酶中的 GH1，GH3 和 GH9 3 个家族，其中 GH3 家族主要分布于微生物中[7~13]。然而，许多蕴藏着珍贵基因资源的微生物并不都能够进行纯培养。宏基因组技术通过直接分离未培养微生物基因组 DNA（gDNA），与载体连接克隆到可培养微生物中，通过功能或序列筛选等方法筛选所需要的阳性克隆，提供了一种探知和获取未培养微生物新资源的方法。已经有很多文献报道通过构建宏基因组文库技术成功获得了新型酯酶、蛋白酶等[14~15]。

通过功能筛选方法，前期从中国南海表层海水微生物宏基因组文库中筛选到 6 个具有 β-葡萄糖苷酶生物活性的克隆。报道对其中一新型 GH3 家族阳性克隆 pSB16D15 的研究结果。

1 实验材料

1.1 使用试剂

对硝苯基-β-D-吡喃半乳糖苷（p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside，pNPG），RNase A 购自 Sigma 公司；*Nde* Ⅰ，*Xho* Ⅰ，T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司；pEasy-T Vector，TransTaq-T 购自 Transgene 公司；pUC19 DNA/*Bam*H Ⅰ为 MBI 公司产品；质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒为 Axygen 产品；七叶苷、柠檬酸铁铵购自 BBI 公司；其余试剂均为国产或进口分析纯产品。

1.2 实验菌株

E. coli JM109 及 BL21（DE3）为本实验室保存。

1.3 宏基因组文库构建

宏基因组文库的构建参考 CHU 等[16]的方法，采集南海海洋表层海水，分离微生物细胞，通过低熔点琼脂糖包埋裂解制备基因组 DNA，获得的 DNA 利用 *Hind* III 进行部分酶切，回收 50～150 kb 的 DNA 片段，与 BAC 载体连接，构建海洋微生物宏基因组文库。

2 实验方法

2.1 β-葡萄糖苷酶阳性克隆的筛选

方法参照 FENG 等[15]，使用含有 0.1%七叶苷和 0.25%柠檬酸铁铵的 LB 固体功能筛选培养平板，将构建好的海洋微生物宏基因组文库影印至平板上，37℃倒置培养 20 h，菌落周围有黑褐色反应圈的初步确定为阳性克隆。抽提阳性克隆质粒，电击转化至 *E. coli* EPI 300，重新涂布到功能筛选平板上，周围显黑褐色的确定为含 β-葡萄糖苷酶基因的阳性克隆。

2.2 基因亚克隆及生物信息学分析

使用 *Sau*3*A* Ⅰ部分酶切阳性克隆 BAC 质粒，回收 2～5 kb 片段，并与 pUC19 DNA/*Bam*H Ⅰ载体连接，转化至 *E. coli* JM109，37℃倒置培养 20 h 得到的阳性克隆经序列测定，利用 ORF Finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html）寻找可能的 ORF，并利用 CAZy（http://www.cazy.org/），SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/），SignalP 3.0，PROSITE 等进行相关生物信息学预测及序列分析。

2.3 重组 pEasy-T-bgl3 质粒的构建

根据已获得的基因测序结果设计特异性引物 16SDP 和 16RDP，并在引物两端分别添加 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点，从 BAC 文库阳性克隆质粒中扩增 *bgl*3. 引物序列分别为：

16SDP：5′-CATATGCAAACAGAGTTAGAACAAGTTGA-3′（下划线处标记 *Nde* Ⅰ酶切位点）

16RDP：5′-CTCGAGCTCACATGTCATTGTTTGTTCTG-3′（下划线处标记 *Xho* Ⅰ酶切位点）

PCR 产物经纯化后，与 pEasy-T 载体连接，产物转化至 *E. coli* JM109. 对重组子插入片段进行序列测定。

2.4 β-葡萄糖苷酶重组表达载体的构建

阳性重组质粒用 *Nde* Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切后，与经过同样酶切处理的 pET22b(＋)载体连接，转化至 *E. coli* BL21（DE3），筛选阳性克隆并测序验证序列的正确性。

2.5 Bgl3 表达条件的优化及重组酶纯化

设定重组菌起始诱导菌体浓度 OD_{600}＝0.6，在 16℃和 30℃ 2 种温度条件下，各设定异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷（jsopropyl β-D-l-thiogalactopyranoside，IPTG）终浓度为 0.10，0.25，0.50，0.75，1.00 mmol/L，优化诱导温度和诱导剂 IPTG 终浓度。重组菌体经超声破碎，于 4℃，10 000 r/min 离心 30 min，SDS-PAGE 检测目标蛋白表达量和表达形式，优化并确定合适的 IPTG 终浓度以及培养温度。收集上清，参照 Novagen 使用说明书，利用 Ni-NTA 柱亲和层析纯化蛋白，SDS-PAGE 检测蛋白纯度及分子量，纯化的蛋白于 4℃保存备用。

2.6 β-葡萄糖苷酶活性测定

反应体系包括 25 μL 适当稀释的酶液和 475 μL 含终浓度 5 mmol/L pNPG 的柠檬酸钠缓冲液（200 mmol/L，pH＝7.0），45℃ 反应 10 min 后，加入 500 μL 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应。酶活单位（IU）定义为每分钟从 pNPG 催化生成 1 μmol 对硝基苯芬（p-nitrophenyl，p-NP）所需要的酶量。

2.7 rBgl3 最适反应温度和温度稳定性

最适反应温度通过测定不同温度下的酶活力进行确定，设置温度范围为 15～60℃（间隔 5℃）将酶在不同温度（10～50℃，间隔 5℃）下保温 1 h，测定 rBgl3 的温度稳定性，其中初始时刻测定初始酶活力，1 h 后测定剩余酶活力，计算相对酶活力。

2.8 rBgl3 最适反应 pH 和 pH 稳定性

设定不同 pH 值（4.0～9.5，间隔 0.5 单位），在不同的 pH 缓冲液中测定酶活力，确定最适反应 pH 值。30℃条件下，将酶液保温于不同的 pH（4.0～9.5，间隔 0.5 单位）缓冲液中，初始时刻测定初始酶活力，1 h 后测定剩余酶活力，计算相对酶活力，确定重组酶的 pH 稳定性。

2.9 rBgl3 动力学常数和比酶活的测定

595 nm 下测定酶液的蛋白含量。420 nm 下，p-NP 的摩尔消光系数为 77 000 $mol \cdot L^{-1} \cdot cm^{-1}$. 以 pNPG 为底物，反应体系包括 25 μL 适当稀释的酶液和 475 μL 含不同浓度底物的200 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液（pH＝7.0），45℃反应 5 min，测定吸光度 OD_{420}，根据酶活计算公式换算相应底物反应所释放的 p-NP 浓度并计算 rBgl3 的比酶活。以底物 pNPG 的浓度 1/[S]为横坐标（μmol/L），以产物 pNP 的生成速率 1/V（$\mu mol \cdot L^{-1} \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$）为纵坐标，根据 Lineweaver-Burk 作图法绘制标准曲线，以计算不同底物的 K_m 和 V_{max}.

2.10 金属离子、EDTA、葡萄糖和乙醇对 rBgl3 活力的影响

测定 10 mmol/L K^+，Fe^{2+}，Fe^{3+}，Cu^{2+} 金属离子对酶活力的影响，以及 10 mmol/L 葡萄糖、EDTA、不同浓度乙醇（体积比）存在条件下 rBgl3 的相对酶活力。对照不加上述试剂。

3 结果

3.1 β-葡萄糖苷酶阳性克隆的筛选

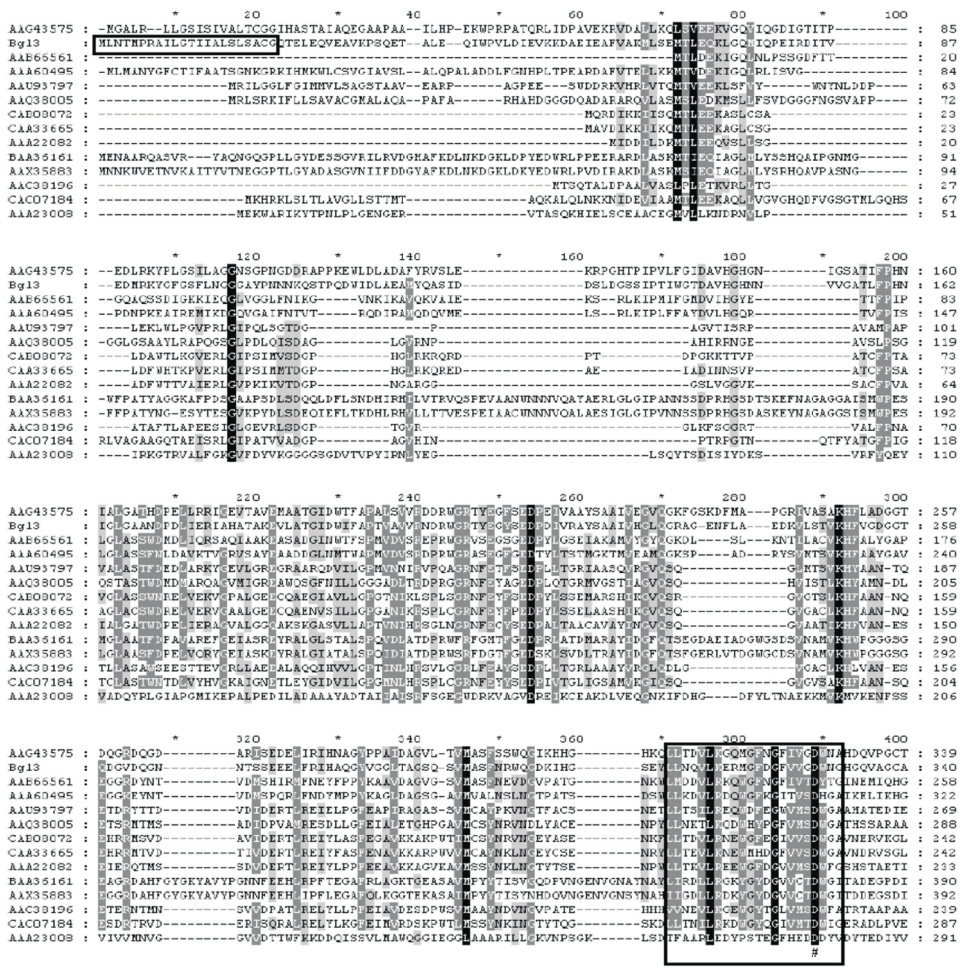
通过功能筛选法，从包含 20 000 个克隆的海洋宏基因组文库中筛选到 β-葡萄糖苷酶阳性克

隆 pSB16D15.

3.2　亚克隆筛选及序列分析

对 pSB16D15 进行亚克隆和序列测定，得到 3.9 kb 的片段。通过 ORF finder 在线分析发现有 3 个 ORF，其中 1 个编码 β-葡萄糖苷酶基因 ORF，命名为 *bgl*3（GenBank 登录号为 GU952111）. *bgl*3 由 2 535个碱基组成，G+C 含量为 43.03%，编码 844 个氨基酸，编码蛋白 Bgl3 理论分子量为 90 807 u，等电点 pI 为 4.54. BLAST 分析显示：Bgl3 与来自 *Glaciecola* sp. HTCC2999 以及 *Alteromonas macleodii* ATCC 27126 的 β-葡萄糖苷酶蛋白分别具有 98%和 61%的序列一致性，而与其他序列的一致性均低于 40%. 然而，这些序列均来自全基因组测序，没有进行系统的酶学性质研究。

SignalP 软件分析表明，Bgl3 序列的 1～22 个氨基酸残基为信号肽序列（如图 1 所示）。通过 SMART 对编码区进行蛋白质结构功能域的分析发现，Bgl3 的 134～357 区段为 Glyco-hydro-3 功能域（Pfam：PF00933，E-value：7.40e-75），434～648 区段为 Glyco-hydro-3-C 功能域（Pfam：PF01915，E-value：4.00e-49）；活性位点 D^{329} 周围氨基酸残基为 LLNQVLKERMGFDG^{324} FVVGD^{329} WNG，与 GH3 家族活性位点典型保守模式[LIVM](2)-[KR]-**X**-[EQKRD]-**X**(4)-G-[LIVMFTC]-[LIVT]-[LIVMF]-[ST]-D-X(2)-[SGADNIT](PROSITE：PS00775)一致，如图 1 所示。



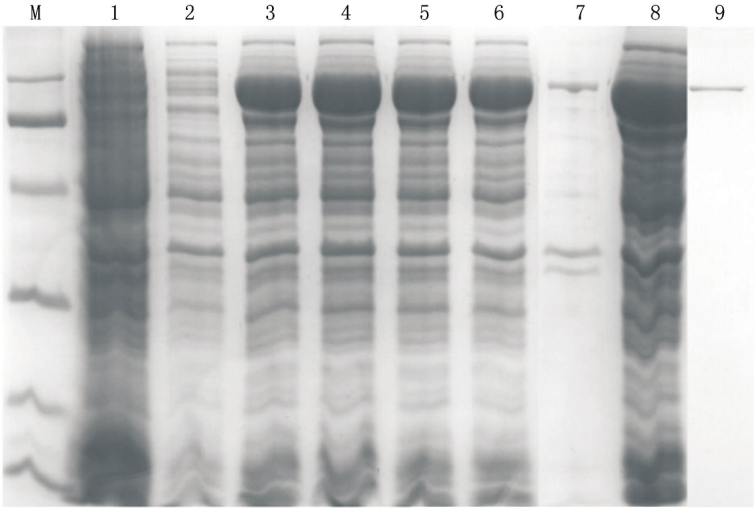
注：序列比对使用 ClustalW version 1.81 和 GENEDOC；序列 N 端方框标注为 Bgl3 推定信号肽序列；序列末端方框显示 GH3 家族的一致性序列；Bgl3 的活性位点在序列的底部以“#”标出

图 1　Bgl3 全序列比对图

Fig. 1　Multialignment of Bgl3 with some GH3 family members

3.3 β-葡萄糖苷酶的表达及纯化

重组表达载体 pET22b(＋)－*bgl3* 得到成功构建，β-葡萄糖苷酶 rBgl3 在宿主 BL21（DE3）中获得高效表达。优化了目标重组蛋白的表达条件，结果显示：IPTG 终浓度为 0.25 mmol/L 时，在 16℃条件下诱导培养 24 h 就能够获得最大的目标蛋白表达效率。16℃条件下表达的蛋白 95％以可溶状态存在(如图 2 所示)，而 30℃条件下蛋白主要以包涵体形式表达。通过 Ni-NTA 柱亲和层析纯化了目标蛋白，达到 SDS-PAGE 电泳纯，SDS-PAGE 检测显示只有单一目标蛋白条带。



注：泳道 1－0.25 mM IPTG 诱导表达 24 h；泳道 2－未诱导培养 24 h；泳道 3～6－0.10，0.25，0.50，0.75 mM IPTG 诱导 24 h；泳道 7－重组表达细胞裂解离心沉淀；泳道 8－重组表达细胞裂解离心上清；泳道 9－Ni-NTA 纯化的 rBgl3

图 2 16℃ rBgl3 表达及纯化 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE for the overexpressed and Ni-NTA purified rBgl3 at 16 ℃

3.4 rBgl3 的最适反应温度和温度稳定性

使用 pH＝7.0 的 200 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液，rBgl3 的最适反应温度为 45℃，15℃以下未能检测到酶活力，在 15～60℃范围内均能检测到酶活，30℃时酶活能达到最大值的 40％，35～55℃酶活也均保持在 60％以上（如图 3a 所示）。pH＝7.0 时将酶在不同温度下保温 1 h，结果显示：rBgl3 在 35℃以下都较稳定，35℃保温 1 h 仍能保存 92％的活力，35℃以后酶活力迅速下降，40℃时能保持 73％的活力；45℃时仅保存 37％的活力（如图 3b 所示）。

3.5 rBgl3 的最适反应 pH 和 pH 稳定性

45℃时，rBgl3 的最适反应 pH 值为 6.5～7.0，在 pH 值为 4.5～9.5 范围内均能检测到酶活，在 pH 值为 5.5～8.0 范围内也能检测到 50％以上的活力（如图 3c 所示）。30℃，pH＝7.0 保温 1 h 仍能保存 100％的活力，pH 值为 6.5～9.5 范围内重组酶都很稳定，pH＝9.0 时能保持 82％的活力；pH＝9.5时也能保存 67％的活力；pH＝6.0 时保温 1 h 后酶活力迅速降低（如图 3d 所示）。

3.6 rBgl3 动力学常数

pNPG 是 rBgl3 的有效作用底物，在 pH＝7.0，45℃的最适反应条件下，rBgl3 催化 pNPG 的 K_m 为 1.80 mmol/L，V_{max}为 0.81 μ mol·L^{-1}·min^{-1}.

3.7 K^+，EDTA，葡萄糖和乙醇对重组酶活力的影响

当金属离子和 EDTA 存在时，Fe^{2+}，Fe^{3+}，Cu^{2+}能够完全抑制 rBgl3 的活力，10 mmol/L K^+稍有促进作用，使其达到原有活力的 106％，而 10 mmol/L EDTA 则使 rBgl3 催化 pNPG 的活力降低至原来的 95％. 在 10 mmol/L 葡萄糖存在下，rBgl3 只能达到原有活力的 13％，100 mmol/L 葡萄糖几乎完全抑制酶活力。乙醇抑制 rBgl3 的活力，随着乙醇浓度的增加酶活力迅速降低，5％的乙醇使原有活力降低 50％（如图 4 所示）.

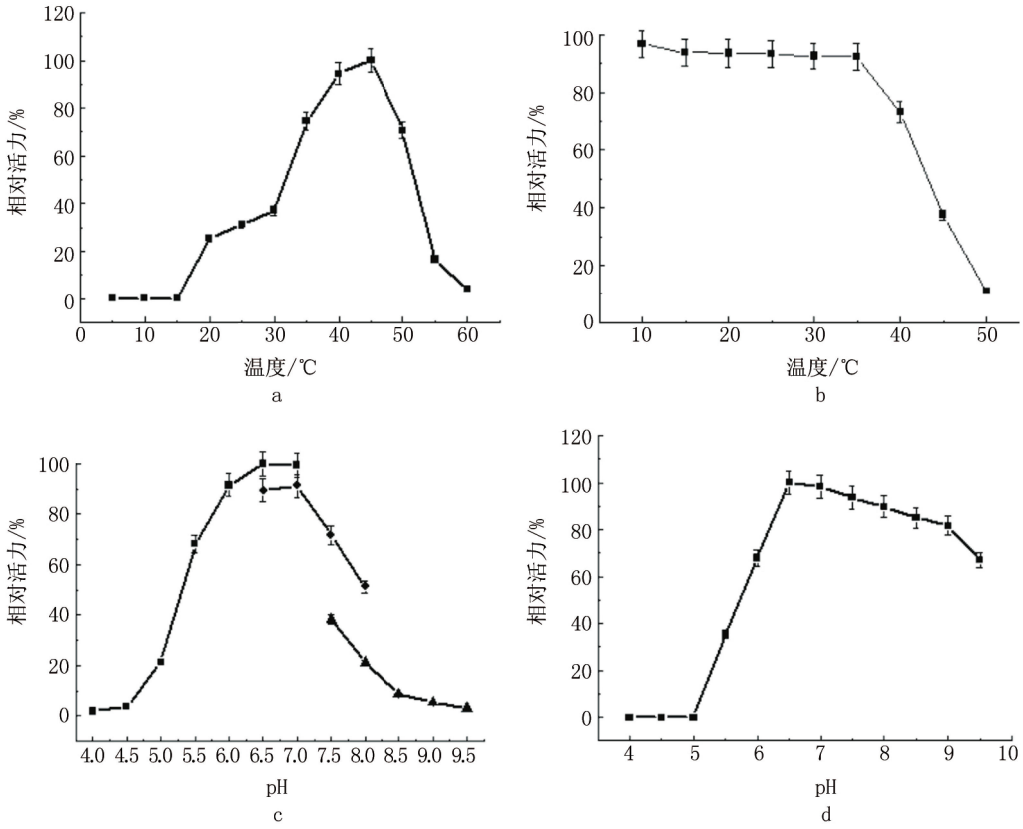


图 3　温度和 pH 对 rBgl3 酶活的影响

Fig. 3　Effect of temperature and pH on the enzymic activity of the recombinant Bgl3 to pNPG

a－rBgl3 的最适反应温度；b－rBgl3 温度稳定性；c－rBgl3 的最适反应 pH 值（柠檬酸盐缓冲液，pH 值为 4.0～7.0；磷酸钠缓冲液，pH 值为 6.5～8.0；Tris-HCl 缓冲液，pH 值为 7.5～9.5）；d－rBgl3 的 pH 稳定性

a-Temperature dependence of rBgl3 enzymic activity; b-Thermalstability of the rBgl3;

c-pH dependence of rBgl3 enzymic activity (citrate-phosphate buffer, pH 4.0～7.0;

sodium phosphate buffer, pH 6.5～8.0; Tris-HCl buffer, pH 7.5～9.5); d-pH stability of the rBgl3

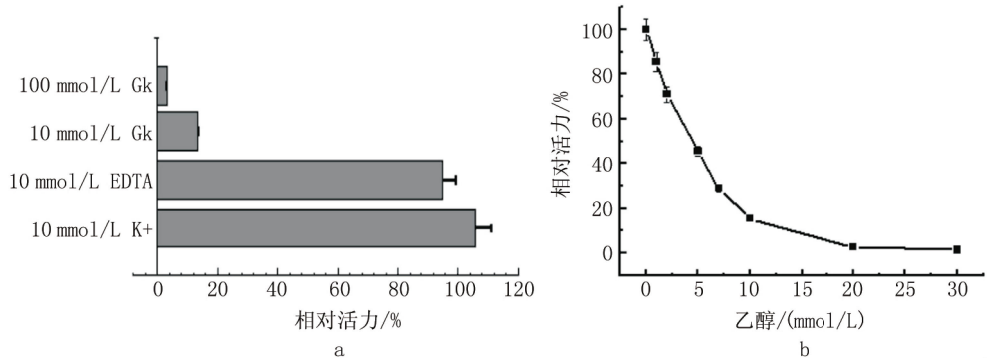


图 4　不同物质对 rBgl3 活性影响，对照分别为不加上述试剂的体系

Fig. 4　Effect of different substances on the enzymic activity of rBgl3 to pNPG. Using systems without these reagents as comparisons

a－K^+，EDTA，葡萄糖；b－乙醇

a-K^+, EDTA, Glucose; b-Ethanol

4 讨论

海洋是地球上最大的生态系统，分布的微生物总数达到 10^{30}，海洋微生物具有种群多样性、生理生化类群多样性、生态功能多样性、遗传特征多样性等特点，其中蕴藏有不同于其他环境微生物来源的遗传资源，成为微生物研究的热点领域[17]。研究所使用的宏基因组文库是采样点海水所有微生物基因的总和，除了可培养微生物，还包含了未培养微生物的遗传信息，从中获得了多种新型酶蛋白和次生代谢产物[16,18]。从文库中筛选得到一新型 β-葡萄糖苷酶基因开放阅读框 *bgl*3，序列分析表明，*bgl*3 编码蛋白的催化域含有 GH3 家族特有的氨基酸保守序列。根据预测，这是第一个来自海洋未培养微生物的 GH3 家族的 β-葡萄糖苷酶。

rBgl3 表现出较好的热稳定性，40℃时能保持 73%的活力，50℃时活力降低至原来的 11%．文献[19]报道，20℃左右多数 β-葡萄糖苷酶只能维持最高活性的 10～20%，而 rBgl3 在此温度下却能维持 94%的活力。rBgl3 的最适反应 pH 值为 6.5～7.0，在 pH 较高的环境中具有相对比较好的稳定性，有别于目前纯化得到的许多来源于真菌的酸性 β-葡萄糖苷酶，如来自 *Penicillium brasilianum* 的 β-葡萄糖苷酶的最适催化 pH 值为 4.8[20]，来自 *Thermotoga neapolitana* 的 β-葡萄糖苷酶的最适催化 pH 值为 5.5[21]．鉴于 rBgl3 在温度和 pH 方面的优点，工业上可有应用于中性或偏碱性酶制剂开发的潜力。

β-葡萄糖苷酶的来源不同，其比酶活也相差较大。微生物分泌的 β-葡萄糖苷酶比酶活约为 5～979 IU/mg[22~24]，研究以 pNPG 为底物时，rBgl3 的比酶活为 17.07 IU/mg，相对较小。一般情况下，β-葡萄糖苷酶对其水解产物葡萄糖都很敏感，极低浓度的葡萄糖就可以抑制 β-葡萄糖苷酶的活性[3]。葡萄糖对 β-葡萄糖苷酶活力的抑制常数 K_i 通常为 0.2～100 mmol/L[25~26]，也有极少数来自真菌和酵母的 β-葡萄糖苷酶，其对葡萄糖的一致常数超过 200 mmol/L[3,22]．研究中，rBgl3 对葡萄糖较敏感，K_i 小于 10 mmol/L，在反应的过程中，葡萄糖作为反应的终产物存在，同时其对酶的反应具有反馈抑制作用，通过抑制酶与底物结合来影响酶的反应速度。

[参考文献] (References)

[1] HOWELL J A, STUCK J D. Kinetics of solka floc cellulose hydrolysis by *trichoderma viride* cellulose[J]. Biotechnol. Bioeng., 1975, 17(6): 873-893.

[2] COUGHLAN M P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comments on their production and application[J]. Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 1985, 3(17): 39-109.

[3] SAHA B C, BOTHAST R J. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel β-glucosidase from *Candida peltata*[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(9): 3165-3170.

[4] AN C L, LIM W J, HONG S Y, et al. Analysis of *bgl* operon structure and characterization of β-glucosidase from *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* LY34[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2004, 68(11): 2270-2278.

[5] 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]. J. Agri. Food Chem., 1996, 44(8): 2336-2340.

[6] MAKROPOULOU M, CHRISTAKOPOULOS P, TSITSIMPIKOU C, et al. Factors affecting the specificity of β-glucosidase from *Fusarium oxysporum* in enzymatic synthesis of alkyl-β-D-glucosides[J]. Int. J. Biol. Macromol., 1998, 22(2): 97-101.

[7] ROJAS A, AROLA L, ROMEU A. β-Glucosidase families revealed by computer analysis of protein sequences[J]. Biochem. Mol. Biol. Int., 1995, 35(6): 1223-1231.

[8] HENRISSAT B, BAIROCH A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases[J]. Biochem. J., 1996, 316(2): 695-696.

[9] GOYAL K, SELVAKUMAR P, HAYASHI K. Characterization of a thermostable β-glucosidase (BglB) from *Thermotoga maritima* showing transglycosylation activity[J]. J. Mol. Catal. B Enzym., 2001, 15(1-3): 45-53.

[10] MARQUES A R, COUTINHO P M, VIDEIRA P, et al. *Sphingomonas paucimobilis* β-glucosidase BglI: a member of a new bacterial subfamily in glycoside hydrolase family 1[J]. Biochem. J., 2003, 370(3): 793-804.

[11] MURRAY P, ARO N, COLLINS C, et al. Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3 β-glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*[J]. Protein Expres. Purif., 2004, 38(2): 248-257.

[12] BHATIA Y, MISHRA S, BISARIA V S. Purification and characterization of recombinant *Escherichia coli*-expressed *Pichia etchellsii* β-glucosidase II with high hydrolytic activity on sophorose[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2005, 66(5): 527-535.

[13] HONG J, TAMAKI H, KUMAGAI H. Unusual hydrophobic linker region of β-glucosidase (BGLII) from *Thermoascus aurantiacus* is required for hyper-activation by organic solvents[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 73(1): 80-88.

[14] STREIT W R, DANIEL R, JAEGER K E. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms[J]. Current Opinions in Biotechnology, 2004, 15(4): 285-290.

[15] FENG Y, DUAN C J, PANG H, et al. Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, 75(2): 319-328.

[16] CHU X M, HE H Z, GUO C Q, et al. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 80(4): 615-625.

[17] YOOSEPH S, SUTTON G, RUSCH D B, et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: expanding the universe of protein families[J]. PLoS Biol., 2007, 5(3): e16.

[18] FANG W, FANG Z, XIAO Y, et al. Cloning and characterization of a β-glucosidase from marine metagenome[J]. Chin. J. Biotech., 2009, 25(12): 1914-1920.

[19] GUNATA Z Y, DUGELAY I, SAPIS J C, et al. Role of enzymes in the use of the flavour potential from grape glycosides in inemaking[J]. In progress in flavour precursor studies, 1993: 219-234.

[20] KROGH K B, HARRIS P V, OLSEN C L, et al. Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 beta-glucosidase from Penicillum brasilianum[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2010, 86(1): 143-154.

[21] TURNER P, SVENSSON D, ADLERCREUTZ P, et al. A novel variant of Thermotoga neapolitana beta-glucosidase B is an efficient catalyst for the synthesis of alkyl glucosides by transglycosylation[J]. J. Biothennol., 2007, 130(1): 67-74.

[22] BRONNENMEIER K, STAUDENBAUER W L. Purification and properties of an extracellular β-glucosidase from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1988, 28(4-5): 380-386.

[23] LI X, CALZA R E. Purification and characterization of an extracellular β-glucosidase from the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188[J]. Enzyme and Microb. Technol., 1991, 13(8): 622-628.

[24] KWON K S, KANG H G, HAH Y C. Purification and characterization of two extracellular β-glucosidases from *Aspergillus nidulans*[J]. FEMS Microbiol. Lett., 1992, 97(1-2): 149-153.

[25] 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 Microbiol. Lett., 2007, 270(1): 162-170.

[26] MAMMA D, HATZINIKOLAOU D G, CHRISTAKOPOULOS P. Biochemical and catalytic properties of two intracellular β-glucosidases from the fungus Penicillium decumbens active on flavonoid glucosides[J]. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2004, 27(4-6): 183-190.