

绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质

刘颖, 韩春然, 张帅, 张玮玮, 窦博鑫

(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 针对绿色木霉AS3.3711产生的 β -葡萄糖苷酶组分, 先后运用包括乙酸铵沉淀、透析、Sephadex G-150葡聚糖凝胶柱层析在内的一系列分离纯化技术对该纤维素酶进行纯化, 得到 β -葡萄糖苷酶纯化组分, 并对该酶的酶学性质进行研究。纯化后酶液的蛋白质量浓度为8.12 mg/mL、酶活力为4.08 U/mL, 纯化倍数达到18.48, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)测定分子质量为66.0 kD。绿色木霉 β -葡萄糖苷酶在酸性条件下稳定性良好, 最适pH值为5.0; 在温度60~70 °C能长时间保持较高酶活力, 最适反应温度为60 °C。金属离子中, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 对绿色木霉AS3.3711 β -葡萄糖苷酶活力起到促进作用, Ca^{2+} 促进作用最强; 而 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 对该酶有抑制作用, Ag^{+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 重金属离子使 β -葡萄糖苷酶几乎丧失了全部活性。

关键词: 绿色木霉; β -葡萄糖苷酶; 分离纯化; 酶学性质

Separation, Purification and Enzymatic Properties of β -Glucosidase from *Trichoderma viride*

LIU Ying, HAN Chun-ran, ZHANG Shuai, ZHANG Wei-wei, DOU Bo-xin

(College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: An extracellular β -glucosidase produced by *Trichoderma viride* AS3.3711 was separated and purified by ammonium acetate precipitation, dialysis and Sephadex G-150 column chromatography. The results of enzyme characterization showed that the protein concentration of the purified enzyme solution was 8.12 mg/mL, and the β -glucosidase activity was 4.08 U/mL, with a purification factor of 18.48. Its molecular weight was 66.0 kD. The β -glucosidase from *Trichoderma viride* displayed a strong stability under acidic conditions and its optimum pH value was 5.0. In the range of 60–70 °C, it could still maintain a high enzyme activity for a long time with an optimum reaction temperature of 60 °C. Some metal ions including Ca^{2+} , Mg^{2+} and K^{+} improved its activity with Ca^{2+} having the strongest effect. However, Zn^{2+} and Fe^{3+} inhibited the enzyme. Heavy metal ions such as Ag^{+} , Cu^{2+} and Hg^{2+} almost totally inactivated its activity.

Key words: *Trichoderma viride*; β -glucosidase; separation and purification; enzymatic properties

中图分类号: Q815; Q814; Q55

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 05-0150-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201405030

纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖的一类糖蛋白总称。目前认为, 至少需要3种功能不同且又互补的纤维素酶协同作用才能完全降解纤维素, 即内切葡聚糖酶(EC3.2.1.4)、外切葡聚糖酶(EC3.2.1.94)和 β -葡萄糖苷酶(纤维二糖酶, EC3.2.1.21)^[1-3]。其中 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)能催化水解芳基或烃基与糖基原子团之间的糖苷键生成葡萄糖, 防止纤维二糖的积聚, 减轻其对纤维素酶的抑制作用, 决定了纤维素糖化过程的最终效率, 是促进纤维素降解过程的关键酶^[4-8]。同时, β -葡萄糖苷酶也能水解其他有重要生理作用的 β -葡萄糖苷。

有研究发现利用 β -葡萄糖苷酶水解白藜芦醇的糖苷键, 释放出游离白藜芦醇, 将葡萄籽中的白藜芦醇由结合型糖苷转化为具有生理活性的糖苷^[9]。该酶广泛存在于各种微生物中^[10-17], 目前的研究多集中于由真菌、曲霉以及细菌等产生的 β -葡萄糖苷酶的制备、纯化及酶学性质^[17-20], 对绿色木霉(*Trichoderma viride*)的研究并不多见^[21]。不同来源(即使是同一菌种的不同菌株或同一植物的不同组织)的 β -葡萄糖苷酶的分子质量从几十kD到几百kD均有报道。已报道的 β -葡萄糖苷酶的等电点大多数在酸性范围, 一般在pI 3.5~5.5, 但最适pH值可以超过7.0,

收稿日期: 2013-03-30

基金项目: 黑龙江省高校科技创新团队建设计划项目(2010td04); 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(160135); 黑龙江省自然科学基金项目(D01-24)

作者简介: 刘颖(1968—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: dbx0803@163.com

并且酸碱耐受性强。 β -葡萄糖苷酶最适温度在40~110℃均有分布;来自植物的 β -葡萄糖苷酶最适温度在40℃左右,而来自古细菌的 β -葡萄糖苷酶的热稳定性和最适温度要高于普通微生物来源的 β -葡萄糖苷酶^[1,8]。

液态发酵制得的纤维素酶系是一个动态变化的复合酶体系,不同来源、不同类型纤维素酶系中的 β -葡萄糖苷酶糖基化程度、糖链聚合度以及糖链分支均有差异,表现为分子质量的差别、酶学性质多样性^[22-24]。绿色木霉作为生产纤维素酶的重要菌种,近年来多为内切酶、外切酶的研究,而对纤维素降解同样起协同作用的 β -葡萄糖苷酶研究较少。本实验利用一株具有较高纤维素酶活性的绿色木霉AS3.3711为出发菌株,AS3.3711液体发酵生产纤维素酶,针对其中的 β -葡萄糖苷酶进行了包括硫酸铵沉淀、透析、Sephadex G-150葡聚糖凝胶柱层析在内的一系列分离纯化技术,以获得绿色木霉 β -葡萄糖苷酶纯化组分,并研究该酶的分子质量以及酶学性质。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

绿色木霉(*Trichoderma viride*) AS3.3711 中国科学院微生物研究所。

水杨苷、过硫酸铵、*N,N,N',N'*-四甲基乙二胺 美国Sigma公司;硫酸铵 天津大茂化工公司;考马斯亮蓝 北京鼎国生物技术发展中心;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺 上海化学试剂公司;十二烷基硫酸钠、甘氨酸 济南赛恩斯科技有限公司;Tris、甲硫氨酸 上海伯奥生物科技有限公司;低分子质量标准蛋白Marker 上海东风化学试剂公司。

摇瓶发酵培养基:4.0 g/100 mL麸皮和3.0 g/100 mL玉米粉、0.1 g/100 mL (NH₄)₂SO₄、0.2 g/100 mL KH₂PO₄、0.1 g/100 mL吐温-80, pH值自然, 121℃灭菌20 min。

1.2 仪器与设备

蛋白质层析系统 上海科学仪器厂;JY5000电泳仪 北京市君意机电技术有限公司;HLQ-C空气浴振荡培养箱 天津实验仪器厂;YXQ-SG46-280手提式压力消毒器 上海佳腾实验设备有限公司;PHS-25精密数显酸度计 上海精密科学仪器有限公司;TDL-5低速离心机 上海安亭科学仪器厂;722紫外分光光度计 上海分析仪器总厂。

1.3 方法

1.3.1 粗酶液的制备

在马铃薯斜面固体培养基上30℃活化绿色木霉菌种48 h,然后接入马铃薯固体培养基中(种子培养基)30℃恒温培养24 h。用无菌水洗下种子培养基中的孢

子,接入发酵培养基,按体积分数10%量接种,30℃恒温、180 r/min摇床培养72 h,取发酵液4 000 r/min离心10 min,收集上清液。

1.3.2 绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的分离纯化

1.3.2.1 硫酸铵沉淀法初级纯化

取适量等体积的粗酶液5组,均缓慢加入硫酸铵至饱和度25.0%,于4℃静置过夜,4℃、4 000 r/min离心10 min,收集上清液。然后分别向5组离心上清液中加入硫酸铵至饱和度50.0%、60.0%、70.0%、80.0%、90.0%,于4℃静置过夜,4℃、4 000 r/min离心10 min,收集沉淀。将沉淀溶于适量pH 6.0、0.02 mol/L乙酸钠缓冲液中,测定 β -葡萄糖苷酶活力。

1.3.2.2 葡聚糖凝胶柱层析分离纯化

对于初级纯化后的 β -葡萄糖苷酶活力高的组分,4 000 r/min离心10 min,收集沉淀,用pH 6.0、0.02 mol/L乙酸钠缓冲液溶解,进行透析法除盐处理以降低离子强度,达到完全除盐效果。收集透析袋中的溶液,于4℃保存备用。

将透析后的酶液分别进行葡聚糖凝胶Sephadex G-75、Sephadex G-100、Sephadex G-150柱层析洗脱,每15 min收集1管样品,以洗脱峰的分离效果及洗脱峰组分的 β -葡萄糖苷酶活性为指标,确定最佳凝胶型号。洗脱参数:层析柱径高比1.0 cm×100.0 cm;洗脱液为pH 6.0、0.02 mol/L乙酸钠缓冲液,流速0.2 mL/min,检测波长280 nm。

1.3.3 SDS-PAGE电泳测定分子质量

12.5%分离胶,5.0%浓缩胶,100 V恒压电泳,染色剂迁移至距下端2 cm左右时停止电泳。电泳以经一系列分离纯化后的 β -葡萄糖苷酶纯化组分为上样品,以低分子质量标准蛋白Marker为标准蛋白,采用考马斯亮蓝R-250染色处理。

1.3.4 绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的酶学性质研究

1.3.4.1 最适反应温度

温度分别为20、30、40、50、60、70℃反应30 min,测定 β -葡萄糖苷酶酶活力,将最高酶活力定义为100.0%,分别计算不同温度条件下 β -葡萄糖苷酶的相对酶活力(即在不同温度条件下的剩余的酶活力占其中酶活力的最高值的百分比)。

1.3.4.2 最适反应pH值

在浓度为0.2 mol/L、pH值分别为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0的柠檬酸-磷酸氢二钠溶液中,60℃恒温反应60 min,测定 β -葡萄糖苷酶酶活力,将最高酶活力定义为100.0%,分别计算不同pH值条件下 β -葡萄糖苷酶的相对酶活力。

1.3.4.3 热稳定性

温度分别为60、65、70、75、80℃时,酶液分别

保温0、10、20、30、40 min后，测定 β -葡萄糖苷酶活力，将最高酶活力定义为100.0%，考察不同温度对 β -葡萄糖苷酶的相对酶活力的影响。

1.3.4.4 pH值稳定性

酶液分别在pH3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0的缓冲溶液中，60℃恒温反应2 h，测定 β -葡萄糖苷酶活力，将最高酶活力定义为100.0%，考察不同pH值环境对 β -葡萄糖苷酶酶活力的影响^[25-27]。

1.3.4.5 金属离子的影响

分别向反应体系中加入终浓度为1.0 mmol/L的NaCl、KCl、AgNO₃、MgSO₄、CaCl₂、CuSO₄、BaCl₂、MnSO₄、ZnSO₄、HgCl₂、Fe₂(SO₄)₃溶液，于60℃恒温反应30 min，同时以不添加金属离子为对照组，考察不同金属离子对于 β -葡萄糖苷酶酶活力的影响^[28-29]。

1.3.5 分析检测方法

1.3.5.1 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量^[30]。

1.3.5.2 β -葡萄糖苷酶的酶活力测定方法

取0.5 mL一定稀释度的样液，加入0.5 mL、0.5 g/100 mL的水杨苷（溶于0.1 mol/L、pH 4.8醋酸缓冲液中），55℃保温20 min后，加入1 mL DNS试剂充分混合后，于沸水中灭酶处理5 min，待完全冷却后用蒸馏水稀释至10 mL。在520 nm波长处，采用722型分光光度计测定样品光密度值，以加热灭活的酶液作为空白组。在上述条件下，定义每小时由底物产生1.0 μ mol还原糖所需的酶量为一个酶活力单位（1 U）^[29-32]。

2 结果与分析

2.1 绿色木霉AS3.3711 β -葡萄糖苷酶的分离纯化

2.1.1 硫酸铵沉淀法初级纯化

表1 硫酸铵沉淀法初级纯化 β -葡萄糖苷酶的结果

Table 1 Preliminary separation of β -glucosidase from *Trichoderma viride* by ammonium sulfate precipitation

硫酸铵饱和度/%	25.0	50.0	60.0	70.0	80.0	90.0
沉淀中酶活力/(U/mL)	11.35	4.28	8.40	9.73	10.25	10.36
相对酶活力/%	100.0	38.0	74.0	86.0	90.0	91.0

经硫酸铵沉淀法初级纯化后的 β -葡萄糖苷酶活力如表1所示，经饱和度为25.0%的硫酸铵去除部分杂蛋白及菌丝体，4℃静置过夜，离心上清液中的 β -葡萄糖苷酶活力4 060.68 U/mL，除杂效果较好，同时保持了较强的纤维素酶活力，定义此时的相对酶活力为100.0%；然后向5组离心上清液中分别加入硫酸铵至不同饱和度，再次4℃静置过夜，取各离心沉淀分别于25 mL乙酸钠缓冲液中充分溶解。从表1可知，硫酸铵饱和度为80.0%及90.0%时，粗酶液的相对酶活力均可达到90.0%以上，分离纯化

效果显著，但综合考虑硫酸铵沉淀法的纯化效果、实验操作性及经济实用性，选择80.0%饱和度硫酸铵初步分离纯化纤维素酶 β -葡萄糖苷酶。

2.1.2 葡聚糖凝胶柱层析分离纯化

收集先后经饱和度为25.0%、80.0%的硫酸铵沉淀法初级分离纯化后的粗酶液，对其进行充分透析除盐处理，以除去硫酸铵、大部分色素以及其他蛋白质、多肽、糖类等杂质。准确量取1.0 mL经透析后的酶液，分别加样于具有不同交联度的葡聚糖凝胶Sephadex G-75、Sephadex G-100、Sephadex G-150层析柱进行洗脱实验，分离纯化结果如图1~3所示。

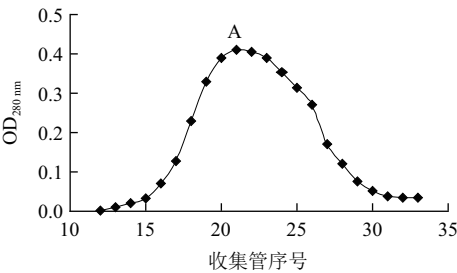


图1 Sephadex G-75凝胶柱层析纯化图谱

Fig.1 Purification of β -glucosidase by Sephadex G-75 gel column chromatography

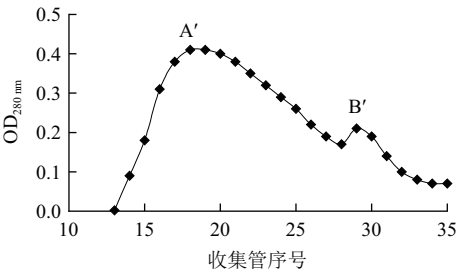


图2 Sephadex G-100凝胶柱层析纯化图谱

Fig.2 Purification of β -glucosidase by Sephadex G-100 gel column chromatography

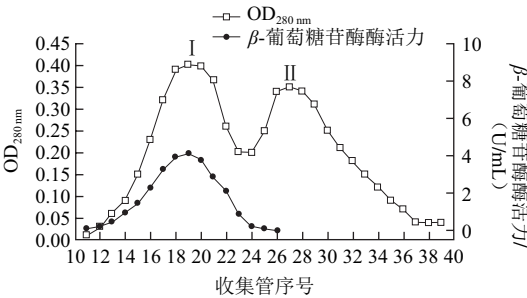


图3 Sephadex G-150凝胶柱层析纯化图谱

Fig.3 Purification of β -glucosidase by Sephadex G-150 gel column chromatography

酶液经Sephadex G-75柱层析纯化后只得到一个洗脱峰A, 分离效果不理想; 经过Sephadex G-100柱层析纯化后, 可以得到2个洗脱峰A'和B', 但洗脱峰B'的峰面积及分离度均较小; 酶液经过Sephadex G-150分离纯化后共得到2个洗脱峰I和II, 峰面积及峰型均最好, 故选择葡聚糖凝胶Sephadex G-150柱层析分离纯化 β -葡萄糖苷酶。通过测定2个主峰的 β -葡萄糖苷酶酶活力可知洗脱峰I具有酶活力, 达到4.08 U/mL, 收集洗脱组分峰I物质。

2.1.3 绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的分离纯化过程分析

表2 分离纯化绿色木霉 β -葡萄糖苷酶效果

Table 2 Summary of purification of β -glucosidase from *Trichoderma viride*

分离纯化步骤	蛋白质含量/(mg/mL)	酶活力/(U/mL)	酶比活力/(U/mg)	纯化倍数
发酵上清液	525.36	16.21	0.031	1.00
硫酸铵初步纯化	46.60	10.25	0.220	7.10
Sephadex G-150	8.12	4.08	0.573	18.48

绿色木霉发酵上清液先后经过硫酸铵沉淀、葡聚糖凝胶柱层析色谱纯化, 获得绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的纯化物质, 该分离纯化过程如表2所示, 纯化倍数达到18.48倍。

2.2 SDS-PAGE电泳测定蛋白质分子质量

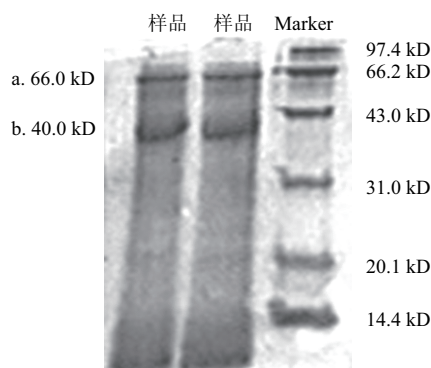


图4 绿色木霉 β -葡萄糖苷酶SDS-PAGE电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE pattern of β -glucosidase from *Trichoderma viride*

采用SDS-PAGE凝胶电泳法测定分离纯化得到的 β -葡萄糖苷酶纯化峰I组分的分子质量, 结果如图4所示。峰I组分可得到两条清晰的谱带a和b。其中谱带a代表分子质量约为66.0 kD的蛋白组分, 谱带b代表分子质量为40.0 kD。由于不同来源的酶在酶学性质上有较大差异, 结合文献报道的纤维素酶的种类和相对分子质量, 谱带a中含有纯化出的绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的可能性较大^[10,21,27-28], 而谱带b与内切葡聚糖酶的分子质量较为相近^[4-5,33], 需要进一步确定其组分。

2.3 绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的酶学性质

2.3.1 最适反应温度

如图5所示, 绿色木霉产生的 β -葡萄糖苷酶在温度20~60℃时, 其相对酶活力显著上升 ($P<0.05$); 而温度60~70℃时, 相对酶活力显著下降 ($P<0.05$), 确定绿色木霉 β -葡萄糖苷酶最适反应温度为60℃。

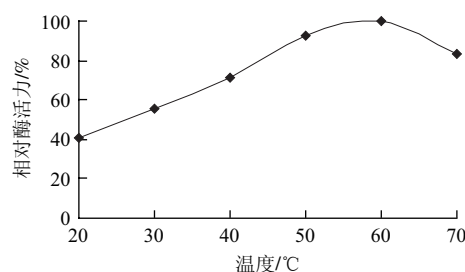


图5 温度对绿色木霉产生的 β -葡萄糖苷酶的影响

Fig.5 Effect of temperature on the activity of β -glucosidase from *Trichoderma viride*

2.3.2 最适反应pH值

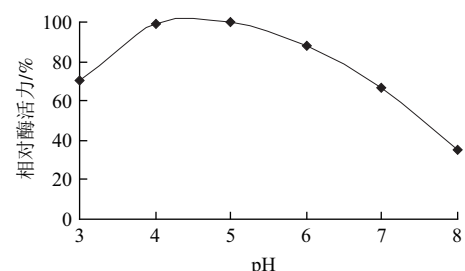


图6 pH值对绿色木霉产生的 β -葡萄糖苷酶的影响

Fig.6 Effect of pH on the activity of β -glucosidase from *Trichoderma viride*

在pH 3.0~8.0的缓冲液中保温, β -葡萄糖苷酶的活力测定结果如图6所示。在pH 3.0~4.0时, 相对酶活力显著上升 ($P<0.05$); pH 4.0~5.0时, 相对酶活力呈平缓上升趋势 ($P>0.05$); 而pH 5.0~8.0时, 相对酶活力显著下降 ($P<0.05$), 下降幅度达到64.34%, 确定绿色木霉 β -葡萄糖苷酶最适反应pH值为5.0。

2.3.3 热稳定性

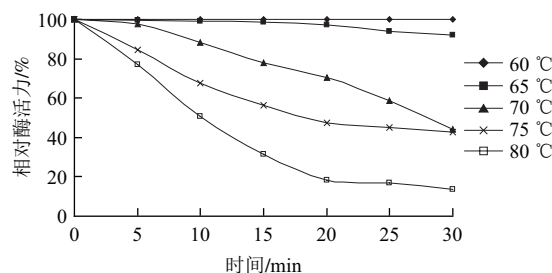
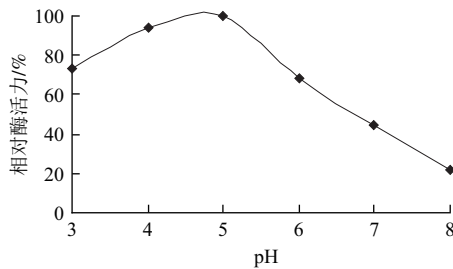


图7 绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的热稳定性

Fig.7 Thermal stability of β -glucosidase from *Trichoderma viride*

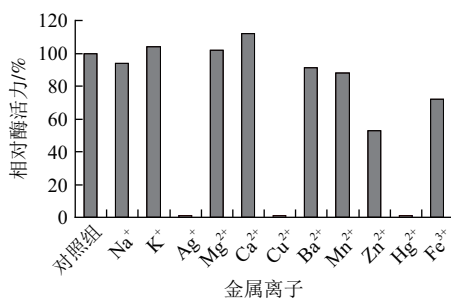
由图7可知, β -葡萄糖苷酶在60℃时, 其酶活力在30 min内几乎保持不变; 在65℃时, 其相对酶活力也比较稳定; 而当温度升至70℃时, β -葡萄糖苷酶半衰期为30 min; 温度继续上升为80℃时, 其半衰期为20 min, 仍具有18.23%相对酶活力。绿色木霉 β -葡萄糖苷酶具有较好的耐热稳定性。

2.3.4 pH值稳定性

图8 绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的pH值稳定性Fig.8 pH stability of β -glucosidase from *Trichoderma viride*

于不同pH值环境中保温处理2 h后测定 β -葡萄糖苷酶的活性,结果如图8所示。绿色木霉 β -葡萄糖苷酶在pH 3.0~6.0酸性条件下,相对酶活力均可保持60.0%以上;而在中性pH 7.0及碱性环境中,酶活力降低,但仍保持21.03%相对酶活力。绿色木霉 β -葡萄糖苷酶耐酸碱稳定性良好。

2.3.5 金属离子对酶活性的影响

图9 金属离子对绿色木霉 β -葡萄糖苷酶活性的影响Fig.9 Effects of different metal ions on the activity of β -glucosidase from *Trichoderma viride*

由图9可知,不同金属离子对该 β -葡萄糖苷酶的活力影响差异十分显著,Ca²⁺对该酶的激活促进作用最强^[28-29],同时Mg²⁺、K⁺对 β -葡萄糖苷酶活力也起促进作用;Zn²⁺、Fe³⁺对该 β -葡萄糖苷酶有一定程度的抑制作用,但酶仍具有活性;而重金属离子如Ag⁺、Cu²⁺、Hg²⁺对 β -葡萄糖苷酶抑制作用明显,使其酶活性几乎全部丧失。

3 结论

本实验先后运用包括硫酸铵沉淀、透析、Sephadex G-150葡聚糖凝胶柱层析在内的一系列纯化技术,对绿色木霉AS3.3711产生的 β -葡萄糖苷酶组分进行了分离与纯化,采用SDS-PAGE电泳测定了酶蛋白组分的分子质量范围,并研究其酶学性质。相关结论如下:

先后采用饱和度分别为25.0%和80.0%的硫酸铵初级

纯化含有 β -葡萄糖苷酶的粗酶液,经饱和度25.0%的硫酸铵纯化后的酶活力为11.35 U/mL;经饱和度80.0%的硫酸铵纯化后的酶活力为10.25 U/mL,相对酶活力达到90.0%,分离纯化效果显著,且酶活力损失较小。

经充分透析除离子及杂质后,采用Sephadex G-150分离纯化经绿色木霉液态发酵产生的 β -葡萄糖苷酶,可得到2个洗脱峰,其中组分峰I具有 β -葡萄糖苷酶活力,其蛋白总含量为8.12 mg/mL,酶活力4.08 U/mL,比活力0.573 U/mg,纯化倍数达到18.48倍。经SDS-PAGE电泳测定洗脱组分I分子质量为66.0 kD。

绿色木霉 β -葡萄糖苷酶的酶学性质:最适pH值为5.0,最适反应温度60℃;在酸性条件下有较强稳定性,耐酸碱性良好;温度60~70℃时,能长时间保持较高酶活力,热稳定性良好;离子浓度为1.0 mmol/L时,Ca²⁺、Mg²⁺、K⁺对 β -葡萄糖苷酶活力起促进作用,其中Ca²⁺促进作用最强,Zn²⁺、Fe³⁺对该酶有不同程度的抑制作用,重金属离子如Ag⁺、Cu²⁺、Hg²⁺几乎使 β -葡萄糖苷酶丧失全部活性。

参考文献:

- [1] 孟宪文,宋小红,陈历俊,等. β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 乳品加工, 2010(10): 42-45.
- [2] GAO Peiji, QU Yinbo, ZHAO Xin, et al. Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 20(8): 581-584.
- [3] 李亚玲. 嗜热真菌热稳定纤维素酶的分离纯化及基因的克隆与表达[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- [4] 杜文娟,王家东,侯红萍. 纤维素酶的制备及其应用研究[J]. 酿酒, 2007(3): 27-28.
- [5] 曾亮亮. 纤维素酶系中内切 β -葡聚糖苷酶的分离纯化及酶学性质的研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2006.
- [6] 宋娜娜,宋向阳,连之娜,等. 纤维素酶液中 β -葡萄糖苷酶的分离纯化[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2011, 35(4): 111-116.
- [7] 李笑梅,胡维,高晗,等. 壳聚糖固定化 β -葡萄糖苷酶酶学性质研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2010, 26(6): 688-691.
- [8] 唐开宇,张全,佟明友. β -葡萄糖苷酶发酵技术的进展[J]. 纤维素科学与技术, 2009, 17(3): 65-69.
- [9] 韦策. β -葡萄糖苷酶的固定化及应用研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2012.
- [10] 朱年青,夏文静,勇强. 里氏木霉纤维素酶的分离纯化及酶学性质[J]. 生物加工过程, 2010(3): 9-12.
- [11] 郑金华,郁建平. 镰刀菌发酵培养液中纤维素酶的分离纯化[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(12): 65-68.
- [12] 潘锋,杨树林,史小丽,等. 黑曲霉纤维素酶的纯化及酶学性质的研究[J]. 生物技术, 2001, 3(6): 8-10.
- [13] ANDRE G, KANCHANAWONG P, PALMAI R, et al. Computational and experimental studies of the catalytic mechanism of *Thermobifida fusca* cellulase Cel6A(E₂) [J]. Protein Engineering, 2003, 16(2): 125-134.
- [14] IMJONGJIRAK C, AMPARYUP I, SITTIPRANEED S. Cloning, genomic organization and expression of two glycosyl hydrolase family 10 (*GHF10*) genes from golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) [J]. Food Technology, 2008, 19(3): 224-236.
- [15] NIKAPITIYA C, DE ZOYSA M, LEE J. Molecular characterization and gene expression analysis of a pattern recognition protein from disk

- abalone, *Haliotis discus*[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2008, 25(5): 638-647.
- [16] 王维维, 邱树毅, 谢晓莉, 等. 胞外单宁酶纯化及酶学性质的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 239-243.
- [17] 胡泊, 吴胜, 杨柳, 等. 嗜冷枯草芽孢杆菌低温脂肪酶纯化与酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 524-527.
- [18] 郭润芳, 李多川, 王荣. 疏绵状嗜热丝孢菌热稳定几丁质酶的纯化及其性质研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 270-273.
- [19] 王琼波, 王福青, 赵凤琴, 等. 灵芝超高压突变株漆酶的纯化和酶学性质[J]. 精细化工, 2007, 24(7): 649-652.
- [20] 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.
- [21] 李文佳, 林亲录. 绿色木霉产纤维素酶的研究进展[J]. 现代食品科技, 2007, 23(5): 90-95.
- [22] 张晓勇, 陈秀霞, 高向阳. 纤维素酶的蛋白质工程[J]. 纤维素科学与技术, 2006, 14(2): 55-58.
- [23] 杨盛, 侯红萍. 高效降解纤维素混合菌的筛选及其产酶条件的研究[J]. 中国酿造, 2008(11): 20-22.
- [24] GUNASEKARAN K, NUSSINOV R. How different are structurally flexible and rigid binding sites? Sequence and structural features discriminating proteins that do and do not undergo conformational change upon ligand binding[J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 365(1): 257-273.
- [25] 张凌飞, 李俊辉. 温度与pH对华贵栉孔扇贝淀粉酶和纤维素酶活力的影响[J]. 水产养殖, 2008(5): 4-6.
- [26] 刘欣, 杨凌, 戴晓冬. 蜗牛酶中一种 β -葡萄糖苷酶的纯化及酶学性质的研究[J]. 中国微生物生态学, 2009, 21(10): 910-915.
- [27] 曹健, 郭德宪, 曾实, 等. 里氏木霉纤维素酶的纯化和性质[J]. 食品科学, 2003, 24(5): 72-76.
- [28] 司振军. 不同微量金属离子对绿色木霉产纤维素酶的影响[J]. 发酵科技通讯, 2012, 41(1): 42-46.
- [29] 陈红漫, 赵璐. 芽孢杆菌 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及特性研究[J]. 河北农业大学学报, 2009, 32(3): 39-42.
- [30] 甘淋, 李娟, 何涛, 等. 几种蛋白质含量测定方法的比较研究[J]. 泸州医学院学报, 2004, 27(6): 500-502.
- [31] 赵晶, 李刚明, 权春善. 响应面法优化黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶培养基的研究[J]. 大连民族学院学报, 2013, 15(1): 12-16.
- [32] 李华, 高丽. β -葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2): 107-111.
- [33] 段旭. 竹虫(*Omphis fuscidentalis*)纤维素酶系的酶学性质及内切- β -1,4-葡萄糖苷酶的分离纯化[D]. 昆明: 西南林业大学, 2011.