

棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶 I 的毕赤酵母多拷贝体系构建及其在高密度发酵中的表达

陈文勇, 胡霞艳, 康雅君, 郑穗平

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: β -葡萄糖苷酶目前广泛应用于合成烷基糖苷、芳基糖苷和辅助纤维素酶水解纤维素。本研究将来自棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 的 β -葡萄糖苷酶 I (ABGL) 在毕赤酵母中通过构建多拷贝表达盒的方法实现高效表达, 利用同尾酶 *Bgl II/BamH I* 反复酶切和用 DNA 连接酶连接的方法, 成功构建了含多拷贝表达盒 5'AOX-ABGL-TT 的 pHKA-(ABGL)₃ 的分泌重组质粒, 并线性化重组质粒转化毕赤酵母 GS115, 经过七叶苷显色筛选平板筛选获得高表达的 GS115/pHKA-(ABGL)₃ 菌株, 且在 50 L 发酵罐实现高密度发酵表达。研究表明, 以 pNPG 为水解底物, 在甲醇诱导 120 h 时摇瓶发酵液上清酶活可达 83.15 U/mL, 较之前报道的酶活提高了 3.35 倍; 同时在 50 L 发酵罐实现高密度发酵, 在甲醇诱导 120 h 时发酵罐上清酶活可达 979 U/mL, 较对照菌株的发酵罐上清液酶活提高 2.94 倍, 且总蛋白表达量可以达到 12 g/L。

关键词: 棘孢曲霉 NO.F-50; β -葡萄糖苷酶; 多拷贝表达盒; 毕赤酵母; 分泌表达; 高密度发酵

文章编号: 1673-9078(2014)6-70-75

Construction and High Expression of β -glucosidase I Gene from *Aspergillus aculeatus* NO.F 50 in *Pichia pastoris*

CHEN Wen-yong, HU Xia-yan, KANG Ya-jun, ZHENG Sui-ping

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: β -Glucosidase is widely used in synthesis of alkyl glucosides and aryl glucosides, as well as degradation of cellulose. The β -glucosidase I gene from *Aspergillus aculeatus* No.F50 was cloned, and multiple copies of expression cassette 5'AOX-ABGL-TT was inserted into secreted expression vector pHKA, which could cut apart by the restriction enzymes *Bgl II* and *BamH I*. And then they were connected together by the use of DNA ligase. The constructed pHKA-(ABGL)₃ recombinant plasmid was linearized and integrated into *Pichia Pastoris* GS115 strain by electroporation. Esculin high-throughput screening method was used to detect positive clones which were cultured in shake flask. In the methanol induction of 120 hours, the supernatant activity was detected using pNPG as substrate. The strain had the maximum supernatant activity of 83.15 U/mL, 3.35 fold higher than previous report. Then it was selected to realize high-density fermentation using 50 L fed-batch fermentor. The supernatant hydrolytic activity of fermentation in 50 L fermentor was up to 979 U/mL, which was 2.94 fold higher than control, and protein expression level reached 12.0 mg/mL.

Key words: *Aspergillus aculeatus* NO.F-50; β -glucosidase; multi-copy expression cassette; *Pichia pastoris*; secreted expression; high-density fermentation

β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase EC 3.2.1.21) 属于纤维素酶类, 能催化水解芳基糖苷、烷基糖苷、纤维素和纤维低聚糖等非还原性糖链末端的 β -D-葡萄糖苷键释放出糖基配体。根据 Henrissat 对于糖苷水解酶 (GH) 家族氨基酸序列的分类^[1], β -葡萄糖苷酶属于

收稿日期: 2013-10-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171633); 广东省工业科技攻关项目 (2010B011000004); 中央高校科研业务费项目 (2012ZZ0094)

作者简介: 陈文勇 (1989-), 男, 硕士生, 研究方向: 生物制药

通讯作者: 郑穗平 (1972-), 男, 教授, 研究方向: 代谢工程

GH1、GH3、GH5、GH9、GH30 家族。研究较多的 GH1 家族有较多的酶分子晶体结构报道, 而 GH3 家族目前只有 4 种酶分子的晶体结构收录于 PDB 数据库^[2], 两者都可应用于糖苷的水解和合成, 既可以水解糖苷生产寡聚糖和辅助纤维素酶水解纤维素, 也可以通过热力学的逆水解反应或动力学的转糖苷反应合成烷基糖苷和芳基糖苷等具有工业应用前景的物质。

棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶 (ABGL) 归类于 GH3 家族, 实验室报道在毕赤酵母表达胞外游离的 ABGL 在摇瓶发酵诱导第五天酶活达到 24.8 U/mL, 其上清液

冻干酶粉以葡萄糖和丁醇为底物, 逆水解催化合成丁基葡萄糖苷的产率可以达到 51.4%^[3]。酿酒酵母表面展示的 ABGL 以伯醇和 pNPG 为底物催化合成烷基糖苷^[4], 还可与酿酒酵母胞内表达的木糖还原酶、木糖醇脱氢酶和木酮糖激酶共同加速木糖同化作用和纤维寡糖的降解, 有效提高从木质纤维素转化为乙醇的产量^[5]。 β -葡萄糖苷酶还可辅助纤维素酶水解纤维素^[6], 在产纤维素酶的里氏木霉菌株同时表达 ABGL, 基因操作复杂, 其水解纤维素 72 h 的转化率从 43% 提升到 88%^[7]。因此采用基因工程及高密度发酵手段提高 ABGL 在毕赤酵母的表达量, 通过外源添加 ABGL 的方式改变纤维素酶和 ABGL 的添加比例, 优化提高纤维素的转化水解率, 快速水解纤维素, 同时还可降低合成短链糖苷的成本。

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是广泛应用的真核表达系统, 操作相对简单、表达量高、分泌能力强, 具有比较完善的翻译后加工修饰功能; 且以 AOX1 为启动子, 在诱导期间以甲醇为唯一碳源, 常通过体外多拷贝串联表达盒的策略^[8]和高密度发酵实现外源蛋白的高效表达^[9-10]。

本实验通过体外多拷贝的方法构建含目的基因 ABGL 的多拷贝串联表达盒质粒, 将其转化到巴斯德毕赤酵母 GS115 中进行高效表达, 并且在 50 升罐的高密度发酵中实现了棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶在毕赤酵母中的大量分泌表达, 为棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶 I 在水解糖苷和合成糖苷的研发和应用中降低成本和提供便利。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

Pichia pastoris GS115、菌株 *E. coli* Top10FTM 购自 Invitrogen 公司; 质粒 pHKA 和 pPIC9k-ABGL 由华南理工大学生物科学与工程学院微生物酶学实验室构建保藏。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母抽提物, 1% 氯化钠, 根据需要添加卡那霉素使其终浓度为 50 mg/L。培养基 YPD、MD、BMGY、BMMY 参考“Invitrogen 公司操作手册”。

发酵罐基础无机盐 BSM 培养基 (25 L): CaSO₄ 23.5 g, MgSO₄·7H₂O 372.5 g, K₂SO₄ 455 g, KOH 103.25 g, H₃PO₄ 667.5 mL, 甘油 1000 g, PTM1 108.75 mL, 生物素 10.83 mL。七叶苷显色筛选平板^[11]: 0.3%

七叶苷, 0.05% 柠檬酸铁, 1.34% YNB, 0.3% 酵母抽提物, 0.5% PVDA, 100 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0), 2% 琼脂, 121 °C 灭菌 20 min, 待培养基冷却不烫手加 1.0% 甲醇, 制成固体平板筛选培养基。

1.1.3 试剂

酵母氮源 YNB (Yeast Nitrogen Base)、蛋白胨, Difco 公司; 酵母抽提物, Oxford 公司; Solution I 连接酶、DNA Marker 和 SYBR[®]Premix Ex Taq[™] II, TaKaRa 公司; KOD FX DNA 聚合酶, Toyobo 公司; 限制性内切酶, Fermentas 公司; 质粒提取试剂盒, Biomax 公司; 胶回收试剂盒购自基因公司; PCR 纯化试剂盒, Magen 公司; pNPG (对硝基苯酚吡喃葡萄糖苷), Sigma 公司; 七叶苷, Adamas 公司; 生物素、蛋白质分子量标准和 G250 染色液, 美津生物技术有限公司; 其他试剂均为市售国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计

检索 GeneBank 的棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶 I 的成熟肽碱基序列 (accession number: D64088)

设计引物克隆 ABGL 基因, 上游引物 ABGL_{sense} 含 NotI 酶切位点 (下划线示出) 及保护碱基: 5'AAATTAGCGGCCGCATGGATGAAGCTGGCGTTC3'; 下游引物 ABGL_{antisense} 含 XbaI 酶切位点 (下划线示出) 及保护碱基: 5'CTAGTCTAGATTATTGACCTTCGGGAG3', 引物合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成。

1.2.2 基因 ABGL 的克隆

以实验室保藏的 pPIC9K-ABGL 质粒为模板, 以上游引物 ABGL_{sense} 和下游引物 ABGL_{antisense} 进行 PCR 扩增。体系为模板 2 μ L; 25 μ L 2 \times KOD Fx Buffer; 2 mmol dNTPs 10 μ L; 10 μ mol/L 的上下游引物各 2.5 μ L; KOD Fx DNA 聚合酶 1 μ L, 加无菌水至总体积为 50 μ L。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min 40 s, 共 30 个循环; 最后延伸 72 °C 7 min, PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, Gelred 染色照胶检测, 并切胶回收纯化。

1.2.3 构建含串联表达盒的重组质粒 pHKA-ABGL 及获取 ABGL 串联表达盒

将 PCR 产物和 pHKA 质粒都用 NotI 和 XbaI 双酶切, 构建含串联表达盒的重组质粒 pHKA-ABGL, 然后用 CaCl₂ 转化法转入 *E. coli* Top10[™] 感受态, 在含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基平板上涂板, 培养约 16 h 后挑取菌落进行 PCR 鉴定, 初步鉴定为阳性转化

子的质粒进行 NotI 和 XbaI 双酶切鉴定。凝胶电泳鉴定条带后,委托上海美吉生物工程有限公司进行测序。将构建好的重组质粒用 Bgl II/BamH I 双酶切,得 ABGL 串联表达盒。

1.2.4 重组多拷贝质粒 pHKA-(ABGL)₃ 的构建

利用同尾酶 BamH I 和 Bgl II 识别不同酶切位点,连接后的 DNA 片段不能被上述两种同尾酶识别的原理,构建 ABGL 串联表达盒。将已构建好的一拷贝质粒 pHKA-ABGL 用 BamH I 单酶切,酶切产物去磷酸化处理后与 ABGL 表达盒连接,转化大肠杆菌。阳性转化子双酶切鉴定正确后,命名二拷贝质粒为 pHKA-(ABGL)₂。按上述方法构建三拷贝质粒 pHKA-(ABGL)₃。

1.2.5 重组毕赤酵母的构建

将 Kpn2 I 线性化的重组质粒 pHKA-(ABGL)₃ 用电转的方法转化宿主菌 GS115,转化物涂布于 MD 平板,30 °C 培养 2 d。

1.2.6 重组酵母转化子的菌落 PCR 鉴定及七叶苷显色平板的筛选

从 MD 平板挑取酵母菌落进行 PCR 鉴定,将初步鉴定成功的阳性转化子转接于七叶苷筛选平板进行产酶初筛,30 °C 培养 24 h,分泌的 β -葡萄糖苷酶水解七叶苷产生七叶苷原,与 Fe 反应产生黑色水解圈。黑色水解圈越大,说明产生 β -葡萄糖苷酶的能力越强。

1.2.7 重组转化子的摇瓶培养及诱导表达

挑选黑色水解圈较大的 5 个重组转化子 GS115/pHKA-(ABGL)₃ 进行摇瓶培养复筛,接种于 25 mL BMGY 培养基中,30 °C,250 r/min 振荡培养 24 h,测定菌液 OD₆₀₀,离心收集菌体,重悬浮转接 25 mL 的 BMMY 培养基中,控制菌液起始 OD₆₀₀ 为 1,30 °C,250 r/min 继续振荡培养,每隔 24 h 向 BMMY 培养基中添加 2.0% 的甲醇进行诱导表达,同时取 0.5 mL 发酵液,测其 OD₆₀₀ 后离心 13000 r/min,保留上清液于 4 °C 冰箱中冻存,采用 pNPG 法测定 β -葡萄糖苷酶酶活。同时以 GS115/pPIC9K-ABGL 作为阳性对照。

1.2.8 制备种子培养液和 50 升罐发酵重组多拷贝 β -葡萄糖苷酶

挑取构建好的毕赤酵母多拷贝重组转化子#3,经过一级种子和二级种子活化后,进行 50 升罐发酵。发酵条件为:控制诱导起始 OD₆₀₀ 为 350,生长温度为 30 °C,生长 pH 为 5.5,诱导温度为 25 °C,诱导 pH 为 6.0。

1.2.9 重组多拷贝 β -葡萄糖苷酶的酶活测定及分析

测定 β -葡萄糖苷酶活力的方法采用以 pNPG 为底物的比色法。反应体系体积为 500 μ L,250 μ L 适当稀释的酶液与 250 μ L 5 mmol/L pNPG 于 50 °C 分别预热 5 min 后,混合反应 10 min,反应结束后加入 500 μ L 1 mol/L Na₂CO₃ 终止反应增强显色,于酶标仪中用 405 nm 测定吸光值。一个酶活力单位(U)定义为每分钟水解底物生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量。

1.2.10 表达产物的 SDS-PAGE 分析

重组转化子 GS115/pHKA-(ABGL)₃ 和阳性对照菌 GS115/pPIC9K-ABGL 诱导培养 120 h 后,取样离心取发酵上清液 20 μ L,加 5 μ L 巯基乙醇混合,沸水浴 5 分钟后,以 15 μ L 上样,进行 12% SDS-PAGE 电泳分析,考马斯亮蓝 R250 染色,脱色后检测目的蛋白的表达。

1.2.11 表达产物总蛋白量的测定

参照 Bradford 的方法测定总蛋白含量。

1.2.12 重组多拷贝 ABGL 的拷贝数测定

参照实时荧光定量 PCR 的双标准曲线的方法测定菌株拷贝数。

2 结果与分析

2.1 ABGL 的克隆

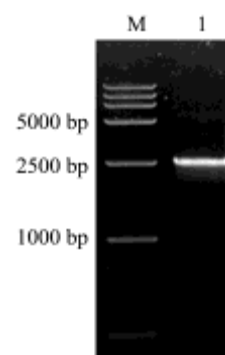


图 1 棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶 I 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of β -glucosidase I gene from *Aspergillus aculeatus*

注: M: DL15000 DNA marker; 1: 从 pPIC9k-ABGL 质粒克隆 ABGL 基因。

2.2 重组质粒 pHKA-ABGL、pHKA-(ABGL)₂

和 pHKA-(ABGL)₃ 的构建

以扩增 ABGL 的 PCR 产物按方法“1.2.3”和“1.2.4”构建重组质粒 pHKA-ABGL、pHKA-(ABGL)₂ 和 pHKA-(ABGL)₃,构建示意图如图 2,且重组质粒经双酶切鉴定显示已成功构建一拷贝、二拷贝和三拷

贝质粒(图3)。将一拷贝的重组质粒送上海美吉生物工程技术有限公司测序,结果插入的基因片段全长2547 bp,与韦斌如报道的ABGL序列一致。

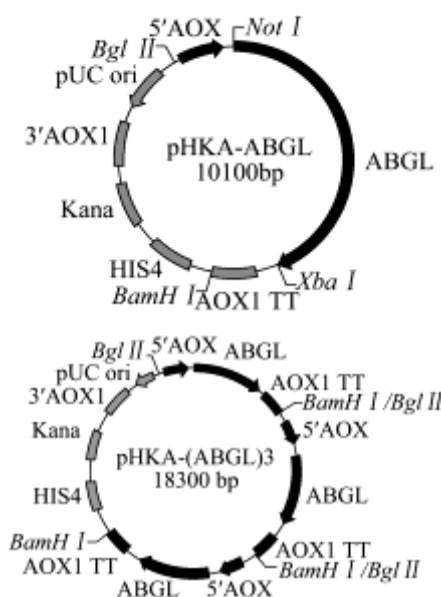


图2 重组含多拷贝表达盒的一拷贝质粒(左)和三拷贝质粒(右)构建示意图

Fig.2 Skech of construction of recombinant expression plasmids pHKA-ABGL(left)and pHKA-(ABGL)₃(right)

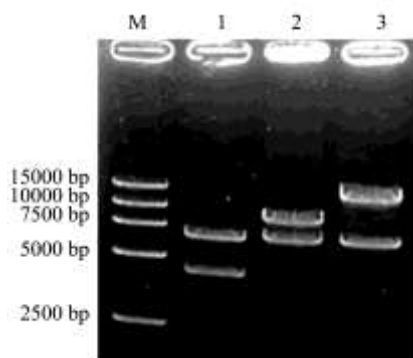


图3 含多拷贝表达盒质粒酶切鉴定图

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pHKA-ABGL, pHKA-(ABGL)₂ and pHKA-(ABGL)₃

注: M: DL15000 DNA marker; 1: pHKA-ABGL 经 Bgl II and BamH I 双酶切; 2: pHKA-(ABGL)₂ 经 Bgl II and BamH I 双酶切; 3: pHKA-(ABGL)₃ 经 Bgl II and BamH I 双酶切。

2.3 重组酵母的筛选及鉴定

在 MD 平板上随机挑选转化子,用 ABGL_{sense} 和 AOX 通用引物下游引物进行菌落 PCR 鉴定,鉴定成功的转化子转接于七叶苷筛选平板进行产酶初筛,培养 24 h,观察黑色水解圈的大小,结果显示对照菌 GS115/pPIC9K-ABGL 的水解圈明显小于 ABGL 多拷贝转化子,挑选黑色水解圈较大的 5 株进行 250 mL

摇瓶培养复筛,作为筛得的重组转化子 GS115/pHKA-(ABGL)₃。

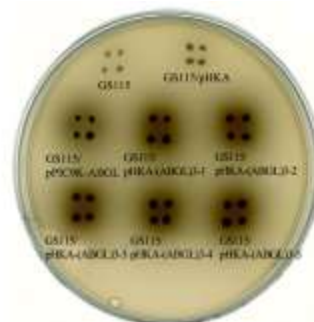


图4 七叶苷显色筛选平板筛选转化子

Fig.4 Screening of recombinant *Pichia pastoris* GS115/pHKA-(ABGL)₃

2.4 重组多拷贝 ABGL 毕赤酵母的摇瓶发酵及其菌株拷贝数测定

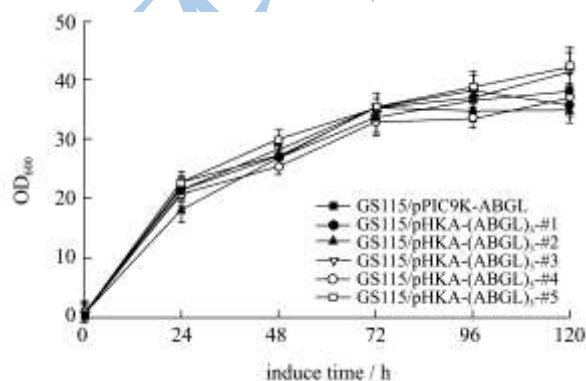


图5 重组酵母 GS115/pHKA-(ABGL)₃ 及对照菌 GS115/pPIC9K-ABGL 摇瓶发酵

Fig.5 OD₆₀₀ of recombinant *Pichia pastoris* GS115/pHKA-(ABGL)₃ (GS115/pPIC9K-ABGL as control)

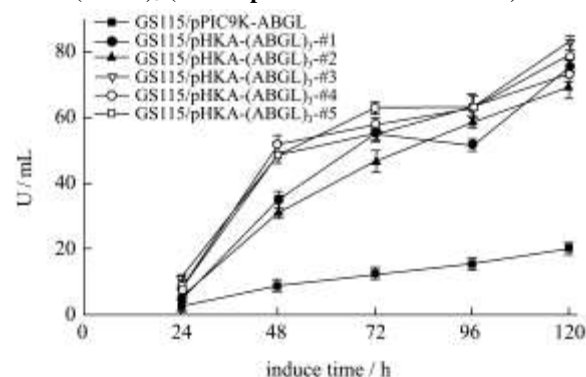


图6 重组酵母 GS115/pHKA-(ABGL)₃ 及对照菌 GS115/pPIC9K-ABGL 产酶曲线

Fig.6 Supernatant activity of recombinant *Pichia pastoris* GS115/pHKA-(ABGL)₃ (GS115/pPIC9K-ABGL as control)

筛选获得的重组菌 GS115/pHKA-(ABGL)₃ 及对照菌 GS115/pPIC9K-ABGL 在 BMMY 培养基中的生长情

况如图 5。从图上看, 重组菌和对照菌生长没有差别。同时, 重组菌和阳性对照菌发酵产酶过程(图 6)中的发酵上清液中 β -葡萄糖苷酶的活力逐渐增加, 在甲醇诱导 120 h 的时候, 重组菌的酶活可以达到 83.15 U/mL, 较同期的对照菌的酶活提高了 3.35 倍。

实时荧光定量 PCR 的双标准曲线方法的测定菌株拷贝数结果, #1、#2、#3、#4 和 #5 的拷贝数分别为 3.13、2.76、3.38、4.39 和 3.77 拷贝。

2.5 重组多拷贝 ABGL 毕赤酵母的 50 升罐发酵

酵及总蛋白表达量的测定

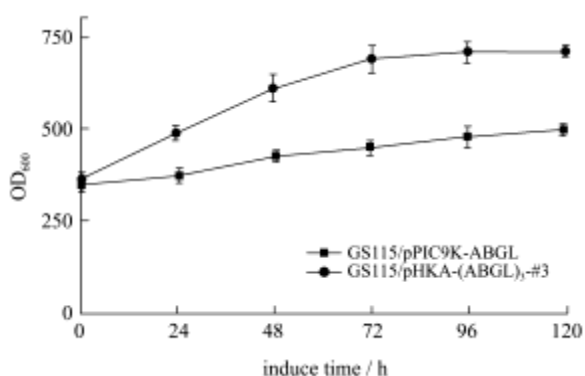


图 7 重组酵母 S115/pHKA-(ABGL)₃ 及对照菌 GS115/pPIC9K-ABGL 50 升罐发酵

Fig.7 OD₆₀₀ of recombinant *Pichia pastoris* GS 115/ pHKA-(ABGL)₃ (GS 115/pPIC9K-ABGL as control) 50L fermentor

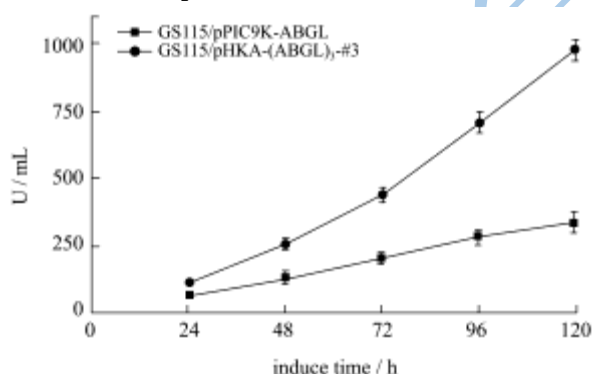


图 8 重组酵母 GS115/pHKA-(ABGL)₃ 及对照菌 GS115/pPIC9K-ABGL 50 升罐发酵产酶曲线

Fig.8 Supernatant activity of recombinant *Pichia pastoris* GS 115/ pHKA-(ABGL)₃ (GS 115/pPIC9K-ABGL as control) 50L fermentor

选取摇瓶酶活最高的重组菌 GS115/pHKA-(ABGL)₃-#3 和对照菌株 GS115/pPIC9K-ABGL 进行 50 升罐发酵, 生长情况如图 7, 从图上可以看出, 重组菌生长较为迅速, 在诱导 72 h 的时候 OD₆₀₀ 已经达到 690, 随后逐步趋向缓和; 对照菌生长较慢, 在诱导 120 h 的时候 OD₆₀₀ 达到 498, 较重组菌诱导 120 h 的

OD₆₀₀ 值为 710 要小。

在发酵诱导产酶过程中(图 8), 重组菌的发酵上清液酶活在诱导初期相距较小, 随着诱导时间的增加, 重组菌的发酵上清液酶活和对照菌相比, 相距越来越大。诱导 120 h 的时候, 重组菌的酶活可以达到 979 U/mL, 较对照菌株的酶活提高了 2.94 倍, 且总蛋白表达量可达到 12 g/L。

2.6 SDS-PAGE 分析表达产物

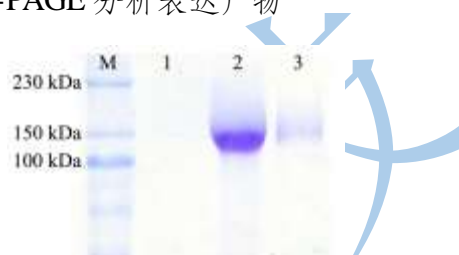


图 9 重组多拷贝 ABGL 和对照菌的分泌蛋白 SDS-PAGE 图
Fig.9 Expression analysis of recombinant GS 115/pHKA-(ABGL)₃ and GS 115/pPIC9K-ABGL supernatant by SDS-PAGE

注: M: 蛋白 Marker, 1: GS115/pHKA 摇瓶发酵甲醇诱导 120 h 发酵上清, 2: GS115/pHKA-(ABGL)₃ 甲醇发酵罐诱导 120 h 稀释 5 倍的发酵上清, 3: GS115/pPIC9K-ABGL 甲醇发酵罐诱导 120 h 稀释 5 倍的发酵上清。

重组酵母 GS115/pHKA-(ABGL)₃ 50 升罐发酵诱导 120 h 的上清液及对照 GS115/pPIC9K-ABGL 50 升罐发酵诱导 120 h 的上清液经 SDS-PAGE 分析, 如图 9 所示。两者的条带均在 150 KD 附近, 重组菌的条带比对照菌的条带较大, 显示重组菌分泌的目的蛋白的表达量明显大于对照菌的分泌目的蛋白的量。测定离心后的沉淀中的菌体酶活显示, 多拷贝菌株和对照菌株都有酶蛋白在胞内残留, GS115/pHKA-(ABGL)₃ 的菌体酶活有 776 U/g, 相比于对照菌株的菌体酶活 254 U/g, 有三倍的酶活量在胞内残留, 进一步说明多拷贝菌株的总表达量高于对照菌株。

3 结论

本文将来源于棘孢曲霉的 β -葡萄糖苷酶 I 通过基因工程的方法, 构建并转化含多拷贝串联表达盒表达载体, 在毕赤酵母表达系统中实现高效表达, 摇瓶发酵重组菌, 产棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶的活力在诱导第五天达到 83.5 U/mL, 较文献报道的 ABGL 的酶活提高了 3.35 倍。同时, 在 50 升罐的高密度发酵中, 发酵上清液酶活在诱导 120 h 的时候达到 979 U/mL, 总

蛋白表达量达到 12 g/L, 且离心后的多拷贝菌株的菌体酶活约 3 倍大于对照菌株的菌体酶活。酶活表达量提高的最本质原因是毕赤酵母多拷贝表达菌株基因量和强启动子数量的提高, 提升利用甲醇作为碳源的生长繁殖速率, 进而促进表达更多量的酶蛋白。因此利用毕赤酵母高效表达 ABGL 为 ABGL 在辅助纤维素酶水解和水解糖苷生成寡糖、合成烷基糖苷和芳基糖苷的等工业化应用降低了成本和提供了便利。

参考文献

- [1] Bernard Henrissat. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities [J]. *Biochemical Journal*, 1991, 280: 309-316
- [2] Kentaro Suzuki, Jun-ichi Sumitani, Young-Woo Nam, et al. Crystal structures of glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus* [J]. *Biochemical Journal*, 2013, 452: 211-221
- [3] 韦斌如, 刘端玉, 韩双艳, 等. 棘孢曲霉 β -葡萄糖苷酶 I 在毕赤酵母中的表达及烷基糖苷的催化合成. 高等学校化学学报 [J]. 2012, 7(33): 1498-1504
WEI Bin-ru, LIU Duan-yu, HAN Shuang-yan, et al. Expression of *aspergillus aculeatus* β -glucosidase i gene in *pichia pastoris* and its application on the synthesis of alkyl glucoside [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2012, 7(33): 1498-1504
- [4] Junji Ito, Takumi Ebe, Seiji Shibasaki, et al. Production of alkyl glucoside from cellooligosaccharides using yeast strains displaying *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 [J]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2007, 49: 92-97
- [5] Satoshi Katahira, Atsuko Mizuike, Hideki Fukuda, et al. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose and cellooligosaccharide assimilating yeast strain [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72: 1136-1143
- [6] Alex Berlin, Vera Maximenko, Neil Gilkes, et al. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(2): 287-296
- [7] Hikaru Nakazawa, Tetsushi Kawai, Nokiko Ida, et al. Construction of a combinatorial *trichoderma reesei* strain expressing *aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 for efficient biomass conversion [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(1): 92-99
- [8] Hubertus Hohenblum, Brigitte Gasser, Michael Maurer, et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *pichia pastoris* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 85(4): 367-375
- [9] Qiaojuan Yan, Chengwei Hua, Shaoqing Yang, et al. High level expression and extracellular secretion of β -glucosidase gene (PtBglu3) from *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2012, 84: 64-72
- [10] Vasimon Ruanglek, Rutchadaporn Sriprang, Nakul Ratanaphan, et al. Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1, 4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41: 19-25
- [11] 赵林果, 孟鹏, 李丽娟, 等. 利用七叶灵显色技术检验和判断 β -葡萄糖苷酶的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(12): 163-166
ZHAO Lin-guo, MENG Peng, LI Li-juan, et al. Detection and identification of β -glucosidase with esculin as substrate [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2008, 34(12): 163-166