

# $\beta$ -葡萄糖苷酶高产菌株及其应用研究\*

梁翠谊<sup>1</sup>, 许敬亮<sup>1</sup>, 袁振宏<sup>1</sup>, 张宇<sup>1</sup>, 徐惠娟<sup>1</sup>, 庄新姝<sup>1</sup>, 高月淑<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院广州能源研究所//中国科学院可再生能源与天然气水合物重点实验室, 广东广州 510640; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 对 *Hypocrea* sp. W<sub>63</sub> 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶学性质研究表明, 该酶液体发酵最高酶活高达 482.1 U/mL, 最适反应 pH 值为 4.8, 最适反应温度为 65 °C; 乙醇体积分数为 10% 时对酶活有最大促进效果, 乙醇耐受能力高达 30%; 将该酶应用于同步糖化发酵研究中, 发现发酵至 120 h 乙醇质量浓度可高达 41.25 g/L, 与对照相比, 乙醇产量均提高近 2 倍。该菌株所产的  $\beta$ -葡萄糖苷酶较高的酶活力、耐热性能、乙醇耐受性和同步糖化发酵促进效果, 预示着该菌在纤维素乙醇产业化应用中具有广阔的应用前景。

**关键词:**  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 耐高温; 耐乙醇; 同步糖化发酵

中图分类号: Q936; Q939.9 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2013) 01-0118-06

## Application Studies on High Activity $\beta$ -Glucosidase Producing Strain

LIANG Cuiyi<sup>1</sup>, XU Jingliang<sup>1</sup>, YUAN Zhenhong<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>1</sup>,  
XU Huijuan<sup>1</sup>, ZHUANG Xinshu<sup>1</sup>, GAO Yuechu<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Renewable Energy and Gas Hydrate//Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** Studies of  $\beta$ -glucosidase enzymatic properties from *Hypocrea* sp. W<sub>63</sub> show that, enzyme activity determined by pNPG (4-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside) can attain to 482.1 U/mL. The optimum reaction pH value and temperature are 4.8 and 65 °C, respectively. 10% of ethanol has the greatest promotion, the  $\beta$ -glucosidase activity can nearly increased double and the ethanol tolerance of  $\beta$ -glucosidase can attain to 30%. When simultaneous saccharification and fermentation (SSF) carried out for 120 h with  $\beta$ -glucosidase adjunction, 41.25 g/L of ethanol can be obtained. Compared with control, the ethanol production can increase nearly 2-fold. The  $\beta$ -glucosidase with high enzyme activity, thermostable and alcohol tolerance for SSF application, indicate that the  $\beta$ -glucosidase producing strain has great potent application on cellulosic ethanol production.

**Key words:**  $\beta$ -glucosidase; thermostable; ethanol tolerance; simultaneous saccharification and fermentation

目前, 全球的纤维素年产量在 1 000 亿 t 以上, 是自然界中分布最广、含量最多的一类可再生性糖类资源。所以, 如何充分利用好纤维素资源, 已经成为世界各国关注的热点话题。利用微生物产生的

纤维素酶分解纤维素成为葡萄糖和纤维二糖, 再进一步转化成乙醇和丁醇等生物燃料, 被认为是一种非常有潜力的纤维素高效利用策略<sup>[1]</sup>。

$\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -Glucosidase, EC

\* 收稿日期: 2012-11-02

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2011BAD22B01); 国家自然科学基金资助项目 (21176237, 21211140237); 国家高新技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2013AA065803)

作者简介: 梁翠谊 (1986 年生), 女, 研究助理; 通讯作者: 许敬亮; E-mail: xjl@ms.giec.ac.cn

3.2.1.21) 属于纤维素酶类复合组分的其中之一, 能催化水解芳香基或烃基与糖基原子团之间的糖苷键生成葡萄糖<sup>[2]</sup>, 能有效解除纤维素酶解过程中纤维二糖对纤维素酶活性的抑制, 是纤维素酶组分中的关键酶类。目前市面上的产纤维素酶木霉菌株中,  $\beta$ -葡萄糖苷酶含量都很低(黑曲霉除外), 其分泌的纤维素酶中  $\beta$ -葡萄糖苷酶含量还不到 1%, 远达不到实际应用的水平<sup>[3]</sup>; 再者, 在反应过程中, 由于高温失活作用,  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性会在反应过程中逐渐损失掉<sup>[4]</sup>, 可利用的  $\beta$ -葡萄糖苷酶就更少<sup>[5]</sup>。而对于工业应用来说, 酶的热稳定性越高对应用越有利<sup>[6]</sup>, 近年来, 耐热(嗜热)  $\beta$ -葡萄糖苷酶成为纤维素酶学领域研究的热点<sup>[7]</sup>。目前对  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究主要集中在酵母、细菌和霉菌等, 而其中对曲霉、康氏木霉的研究最多<sup>[8]</sup>, 但少有高产、嗜温、耐乙醇的  $\beta$ -葡萄糖苷酶肉座菌产酶菌株报道。

本研究从武夷山常年堆放腐烂枯枝、烂叶的土壤中分离筛选得到 1 株高产  $\beta$ -葡萄糖苷酶的肉座菌 *Hypocrea* sp. W<sub>63</sub>, 对其酶学性质进行了研究, 发现其具有嗜温、耐乙醇的特性, 并探讨了其在汽爆秸秆同步糖化发酵产乙醇上的应用效果, 以期开发该菌株的潜在用途。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 pNPG (对硝基酚- $\beta$ -D-葡萄糖苷) 购自 Sigma 公司, 实验中用到的化学试剂均为分析纯级。汽爆秸秆由中国科学院工程研究所提供, 其主要组成 (*w*) 为纤维素 22.87%; 半纤维素 11.51%; 木质素 31.50%, 其他成分 34.12%; 纤维素酶购自和氏璧生物技术有限公司, 其滤纸酶活力为 880 U/g。

### 1.1.2 培养基

1) CMC-刚果红筛选培养基。

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g, 纤维素粉(微晶纤维, CMC) 2.0 g, 刚果红 0.2 g, 琼脂 18~20 g, 加水补足 1 L, pH 值自然。

2) 发酵产酶培养基。

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.25 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03 g,  $\text{CaCl}_2$  0.03 g, 稻秆 5 g, 微量元素液 200  $\mu\text{L}$ , 加水至 100 mL。

微量元素液配方:  $\text{CuSO}_4$  0.1 g,  $\text{MnSO}_4$  0.1 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{CoCl}_2$  0.1 g, 定容至 100 mL

3) 同步糖化发酵培养基。

500 mL 摇瓶中装反应液 200 mL, 气爆秸秆 20 g, 其中无机盐成分为 ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025 g/L), 酵母膏 1.0 g/L。其余为 pH 4.8 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌株分离 取一定量的土壤, 加入装有 100 mL 无菌水的摇瓶中, 内加几粒玻璃珠, 振荡 10~20 min; 取 2 mL 混浊液做梯度稀释, 分别取  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  涂布刚果红筛选培养基和 PDA 培养基, 30  $^\circ\text{C}$  保温培养。挑取水解透明圈较大的单菌落在 PDA 培养基上纯化, 纯化的菌株进行 PDA 斜面保存。

菌株产  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力复筛: 将 PDA 斜面保存的纯化菌株分别接种到等量的复筛发酵培养基中, 30  $^\circ\text{C}$ , 120 rpm, 培养 72 h 以上。冷冻离心取上清液粗酶液, 分别用标准 pNPG 法测定各菌株产的  $\beta$ -葡萄糖苷酶粗酶活力。

1.2.2 菌株鉴定 采用改良 CTAB 法提取菌株总 DNA, 选择扩增真菌 18S rDNA 序列的通用引物 NS1 (5'-GTATCATATGCTTGTCTC-3') 和 NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') 对总 DNA 进行 18S rDNA 序列的扩增。送检测序, 将该序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对分析, 构建系统发育树。

1.2.3 酶活力测定 对硝基苯酚 (4-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, pNPG) 作为底物, 反应体系为 2 mL, 先将 1 mL pNPG (5 mmol/L) 和 0.9 mL pH 5.0  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液混匀, 再加入 0.1 mL 适当稀释的  $\beta$ -葡萄糖苷酶粗酶制剂, 50  $^\circ\text{C}$  反应 10 min, 立即加入 3 mL 1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应, 室温静置 5 min, 于 400 nm 处测光吸收值 (*A*)<sup>[9]</sup>。

酶活定义: 1 min 内催化产生 1  $\mu\text{g}$  对硝基酚的量定义为一个酶活力单位。

### 1.2.4 $\beta$ -葡萄糖苷酶粗酶性质研究

1) 温度对酶活的影响。

酶催化底物反应 10 min, 在 40~80  $^\circ\text{C}$  温度梯度范围内, 分别测定  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活, 设最高酶活为 100%; 将粗酶液在 40~80  $^\circ\text{C}$  温度梯度内保温 1 h, 然后用标准 pNPG 法测定酶活, 设最高酶活为 100%。

2) pH 值对酶活的影响。

配制不同 pH 值的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液 (0.1 mol/L) 调节反应体系的 pH 值, 在 50  $^\circ\text{C}$  条

件下, 分别在 pH 值为 4.0 ~ 5.4 条件下测定  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活, 设最高酶活为 100%; 将粗酶液在 pH 值为 4.0 ~ 5.4 条件下放置 1 h, 然后用标准 pNPG 法测定酶活, 设最高酶活为 100%。

### 3) 乙醇体积分数对酶活的影响。

在测定酶活反应体系中分别添加体积分数为 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50% 的乙醇, 测定  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活保留情况。以未加入乙醇处理的作为阴性对照组, 设其酶活为 100%。

### 1.2.5 $\beta$ -葡萄糖苷酶粗酶同步糖化发酵应用

反应体系为: 500 mL 摇瓶中装反应液 200 mL, 该反应体系含有汽爆秸秆 20 g, 其中液体组分包括无机盐成分 ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025 g/L), 酵母膏 1.0 g/L, 其余为 pH 4.8 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -柠檬酸缓冲液。

向反应体系加入纤维素酶 (30 FPU/g 底物) 酶量, 50 °C 预水解 24 h; 然后加入  $\beta$ -葡萄糖苷酶 (30 FPU/g 底物) 到反应体系中, 最后按 5% (体积比) 接种量接种经活化的酿酒酵母至反应体系, 37 °C 发酵, 以接种酵母时计为 0 h, 并于 0、4、8、12、24、48、96 和 120 h 定点取样, HPLC 检测乙醇生成和还原糖的减少情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶菌株筛选

经刚果红平板法重复筛选 3 次, 并利用发酵产酶培养基进行发酵产酶复筛, 对所产粗酶液进行  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活测定, 发现其中 1 株菌  $W_{63}$  具有高产  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力, 该菌所产  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活可高达 482.1 U/mL。

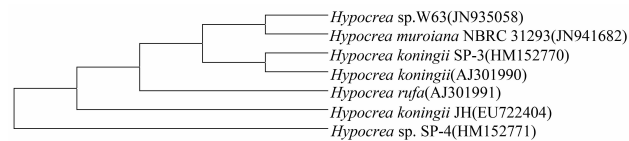


图 1 肉座菌 *Hypocrea* sp.  $W_{63}$  的 18S rDNA 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *Hypocrea* sp.  $W_{63}$  based on 18S rDNA sequence

根据真菌 18S rDNA 通用引物 (NS1, NS8) 所获得的序列长度为 1666 bp, 为了确定  $W_{63}$  的分类地位<sup>[10]</sup>, 将  $W_{63}$  的 18S rDNA 序列在 NCBI 上的比对分析, 并结合 MEGA 5.0 软件构建系统发育分析, 菌株  $W_{63}$  与肉座菌属 *Hypocrea* sp. 的同源性为

99%; 又根据同源序列搜索, 并且下载一些相关菌株的 18S rDNA 序列, 从中挑取 6 个菌株的 18S rDNA 进行分子系统发育树分析, 结果如图 1 所示。结果发现, 菌株  $W_{63}$  与 *Hypocrea muroiana* 的进化距离最短, 其亲缘关系也是最接近的, 这与 BLAST 比对的结果相一致。两者的遗传距离为 0.0001。序列相似性 99.8%。

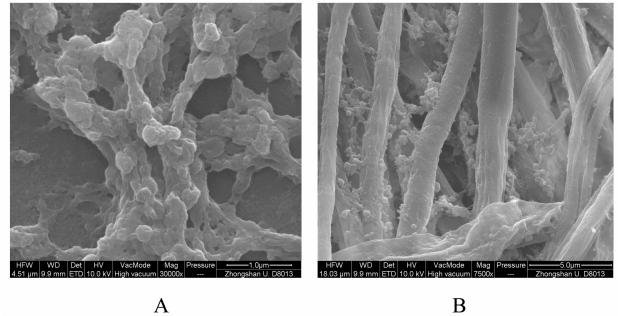


图 2 肉座菌 *Hypocrea* sp.  $W_{63}$  电镜扫描图

Fig. 2 Scanning electron microscopy of *Hypocrea* sp.  $W_{63}$  (A: 7 500 ×; B: 30 000 ×)

形态观察发现, 该菌在 PDA 平板上培养, 培养 1 d 迅速长出白色菌丝, 培养 3 d 以上开始产绿色孢子。菌丝体呈白色, 菌丝小而致密, 呈棉絮状, 培养后期可产绿色的木霉。扫描电镜观察发现, 其菌丝体成节生长, 没有鞭毛, 孢子呈棉絮状, 附着在菌丝体上, 子囊壳包埋在肉质的子座中, 子座由拟薄壁组织组成 (图 2)。

因此, 根据 18S rDNA 比对分析和形态学、显微镜观察结果, 将其命名为肉座菌 *Hypocrea* sp.  $W_{63}$ 。

### 2.2 粗酶的最适温度及其热稳定性

一般情况下, 真菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适作用温度在 40 ~ 50 °C, 相比之下, 真菌的嗜热  $\beta$ -葡萄糖苷酶最适作用温度可达 55 ~ 75 °C<sup>[11]</sup>。本研究发现的 *Hypocrea* sp.  $W_{63}$  所产的  $\beta$ -葡萄糖苷酶在 65 °C 时具有最大酶促反应速度, 在 60 °C 以下能保持较长时间的稳定, 60 °C 温浴条件下酶活能保留 98.5%。当温度高于 70 °C 时, 酶蛋白快速变性, 酶活迅速丧失。根据 Michael W. Bauer 等<sup>[12]</sup>对来自嗜热性和非嗜热性  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究认为, 两者在相互演化过程中发生的酶修饰作用并不改变酶的活性中心, 也不改变其专一性, 只是将酶蛋白结构作部分调整以适应高温环境。通常情况下, 木质纤维素酶解作用在 50 °C 下反应 24 ~ 72 h, 在这期间酶活逐渐降低成为酶解反应的制约因素,  $\beta$

- 葡萄糖苷酶的持续热稳定性能极大提高酶对生物物质混合物的酶解效果<sup>[13]</sup>。

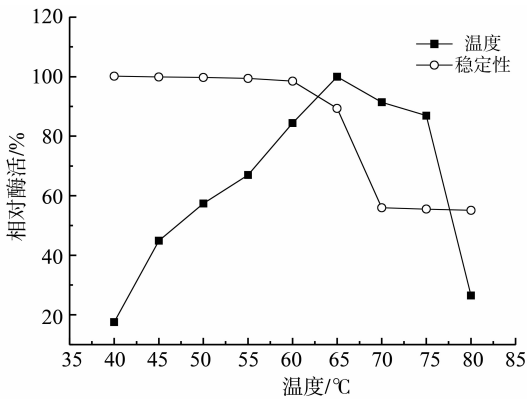


图3 温度对肉座菌 *Hypocrea* sp. W<sub>63</sub> 产的  $\beta$ -葡萄糖苷酶粗酶活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature on crude  $\beta$ -glucosidase enzyme activity

该酶的最适反应温度如图 3 所示, 目前大多数纤维素糖化反应在 50 °C 条件下进行, 将 *Hypocrea* sp. W<sub>63</sub> 所产的嗜温  $\beta$ -葡萄糖苷酶糖化反应温度由 50 °C 提高到 60 °C, 其活性可提高约 20%, 它可以大大提高酶糖化效率和适用范围。

### 2.3 粗酶的最适 pH 及其酸碱稳定性

测定不同 pH 对酶活的影响, 从图 4 可知, 该酶的 pH 测定范围在 4.0 ~ 5.5 之间, 在 pH 值为 4.5 ~ 5.5 时酶活稳定性较好, 达 80% 以上。其最适水解 pH 值为 4.8, 且在 pH 为 4.8 时酶活稳定性最高, 与大多数纤维素酶相似<sup>[14-15]</sup>, 该酶属于酸性水解酶类。

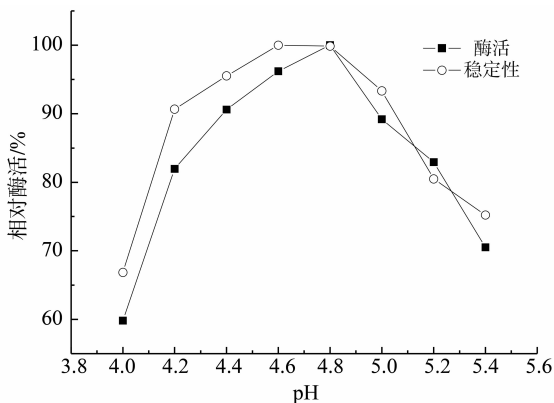


图4 肉座菌 *Hypocrea* sp. W<sub>63</sub> 产的  $\beta$ -葡萄糖苷酶最适 pH 值及 pH 稳定性

Fig. 4 The optimum pH value and stability about  $\beta$ -glucosidase

里氏木霉 *T. reesei* 作为最常用的纤维素酶产酶菌株, 很多木霉的种类与肉座菌密切相关, 而肉座菌属为木霉的有性发育阶段的其中一个种属, 肉座菌为木霉的有性型, 两者在某个发育阶段的名称互相通用。我们研究中得到的嗜热  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 具有较高的酶活反应温度和 pH 值稳定性, 昭示着该酶在用木质纤维素原料水解应用中具有较好的应用前景<sup>[16]</sup>。

### 2.4 乙醇体积分数对酶活力的影响

在不同体积分数乙醇情况下, 乙醇体积分数对  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活力影响结果如图 5 所示。低体积分数乙醇能有效提高  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活, 其中乙醇体积分数为 10% 时, 对酶活力提高有较明显的促进效果, 即使乙醇体积分数高达 30%, 仍然对  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活无任何抑制作用。同时, 该酶在乙醇体积分数 20% 以下能保持较好的稳定性。综合上述研究,  $\beta$ -葡萄糖苷酶较强的嗜温、耐温、耐乙醇性能, 尤其适合应用于木质纤维素原料的同步糖化发酵应用中。

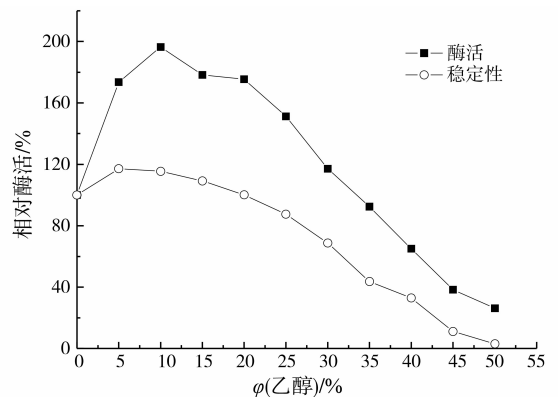


图5 肉座菌 *Hypocrea* sp. W<sub>63</sub> 产的  $\beta$ -葡萄糖苷酶对乙醇的耐受性

Fig. 5 Ethanol tolerance about  $\beta$ -glucosidase

研究表明, 有机溶剂对  $\beta$ -葡萄糖苷酶的激活是由于乙醇的存在改变了水的电势, 使得  $\beta$ -葡萄糖苷酶具有更明显的亲核活性, 从而导致更高的亲核取代反应率<sup>[17]</sup>。本研究所得的  $\beta$ -葡萄糖苷酶稳定性在高温和有机溶剂存在的增加, 在提高现有的生物技术的应用潜力和新的可持续技术有很好的前景<sup>[18]</sup>。此外, 来源不同的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 其酶学性质会存在着差异。此类  $\beta$ -葡萄糖苷酶在非水相中不易失活, 可望用于有机合成或生物转化方面的应用, 但反应介质的不同, 对酶的活性及酶选择性影响很大<sup>[19]</sup>。

## 2.5 $\beta$ -葡萄糖苷酶应用于同步糖化发酵

内切型葡聚糖酶和外切型葡聚糖酶都会受到纤维二糖的反馈抑制作用,而 $\beta$ -葡萄糖苷酶能够将纤维二糖降解成葡萄糖,解除纤维二糖的抑制作用<sup>[20]</sup>。纤维质原料同步糖化发酵(SSF)是一种运用纤维素酶解产生的葡萄糖立即为酵母所发酵利用的工艺技术。但在SSF反应过程中也会随着发酵乙醇体积分数增加,进而对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力乃至整个酶解过程产生抑制作用<sup>[21]</sup>。而本研究获得的耐醇 $\beta$ -葡萄糖苷酶可以有效避开这一缺陷。

针对纤维素酶系中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的相对不足,可通过基因工程手段提高 $\beta$ -葡萄糖苷酶的分泌量、或和某些 $\beta$ -葡萄糖苷酶高产菌株混合培养、或水解过程中添加外源 $\beta$ -葡萄糖苷酶的方法来解决,其中添加外源 $\beta$ -葡萄糖苷酶的工艺相对简单易行,容易在工业规模上实现<sup>[22-23]</sup>。添加外源 $\beta$ -葡萄糖苷酶有利于降低水解糖液中的纤维二糖含量,提高终产物葡萄糖的含量,从而提高纤维素水解得率和水解糖液中可发酵性糖的比例,从而提高终产物乙醇体积分数。本研究将筛选所得肉座菌 *Hypocrea* sp. W<sub>63</sub> 菌株产的 $\beta$ -葡萄糖苷酶粗酶液添加到同步糖化发酵中,结果如图6所示。研究表明,可发酵性总糖质量浓度明显增加,发酵所得乙醇产量明显高于阴性(不添加外源 $\beta$ -葡萄糖苷酶)、阳性(添加Sigma公司 $\beta$ -葡萄糖苷酶)对照反应,发酵至120 h乙醇产量最高,乙醇含量高达41.25 g/L,与阴性、阳性对照相比,乙醇产量提高近2倍。

研究中采用的酶液为粗酶液,除主要有 $\beta$ -葡萄糖苷酶外,还含有部分纤维素内切酶、外切酶、半纤维素酶等, $\beta$ -葡萄糖苷酶能有效降低水解液

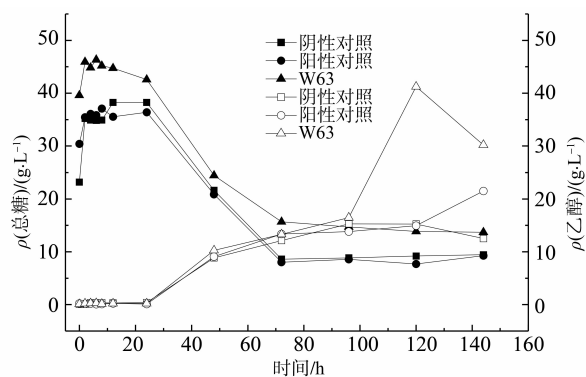


图6  $\beta$ -葡萄糖苷酶添加对同步糖化发酵效果的影响 (实心曲线代表 $\rho(\text{总糖})$ ,空心曲线代表 $\rho(\text{乙醇})$ )

Fig. 6 Effects of adding  $\beta$ -glucosidase on simultaneous saccharification and fermentation

中纤维二糖质量浓度,提高纤维素水解得率及可发酵性糖比例,直接提升了同步糖化发酵中乙醇的产量。研究表明,肉座菌 *Hypocrea* sp. W<sub>63</sub> 菌株所产的 $\beta$ -葡萄糖苷酶性质有利于纤维素同步糖化发酵应用,有效消除终端产物纤维二糖的抑制。并且该菌株所产的 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活力较高,应用于同步糖化发酵过程具有明显的促进效果,对于加速纤维素乙醇的产业化进程具有广阔的应用前景。

## 3 结论

肉座菌 *Hypocrea* sp. W<sub>63</sub> 所产 $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活可高达482.1 U/mL,其 $\beta$ -葡萄糖苷酶最适反应温度为65 $^{\circ}\text{C}$ ,在60 $^{\circ}\text{C}$ 时有高度稳定性,最适反应pH为4.8。低体积分数乙醇能有效提高 $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活,其中乙醇体积分数为10%时,对酶活力提高有较明显的促进效果,即使乙醇体积分数高达30%,仍然对 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活无任何抑制作用。

添加本研究所得的 $\beta$ -葡萄糖苷酶应用于同步糖化发酵,有效消除终端产物纤维二糖的抑制,明显提高可发酵性糖比例,发酵至120 h,乙醇含量高达41.25 g/L,所得乙醇产量比阴性、阳性对照提高了近2倍。

## 参考文献:

- [1] 袁振宏. 能源微生物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 85.
- [2] 闰会平, 陈士华, 吴兴泉. 黑曲霉 $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 纤维素科学与技术, 2007, 15(1): 59-63.
- [3] 石彩蕊, 王义强, 陈介南, 等. 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶微生物育种研究进展[J]. 生物技术通报, 2011, 3: 59-65.
- [4] GAUTAM S, SIMON L. Partitioning of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 30: 104-108.
- [5] RASTOGI G, BHALLA A, ADHIKARI A, et al. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 8798-8806.
- [6] 孟宪文, 宋小红, 陈历俊, 等.  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 乳品加工, 2009, 10: 42-44.
- [7] 黄琴, 朱婷, 蒋承建, 等. 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶的菌种的筛选鉴定及其酶学特性[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 5(30): 590-595.

- [8] 曾辉,高启辉,陈雪,等. 深圳市 1988 - 2007 年间湿地景观动态变化及成因分析[J]. 生态学报,2010,30(10):2706 - 2714 .
- [9] WANG Y Q,ZHANG X S. A dynamic modelling approach to simulating socioeconomic effects on landscape changes [J]. *Ecological Modelling*,2001,140:141 - 162.
- [10] 傅伯杰,陈利顶,马克明. 景观生态学原理与应用[M]. 北京:高等教育出版社. 2001.
- [11] 史培军,宫鹏,李晓兵,等. 土地利用覆盖变化研究的方法与实践[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [12] 李俊祥,王玉洁,沈晓虹,等. 上海市城乡梯度景观格局分析[J]. 生态学报,2004,24(9):1973 - 1980
- [13] 李伟峰,欧阳志云,肖焱. 景观生态学原理在城市土地利用分类中的应用[J]. 生态学报,2011,31(3):593 - 601
- [14] ZHOU S G, LIU J J, CHEN R X. New method to extract roads in urban area from high-resolution remote sensing imagery. *Computer Engineering and Applications*[J]. 2010, 46(32): 216 - 219.
- [15] 徐丽华,岳文泽,曹宇. 上海市城市土地利用景观的空间尺度效应[J]. 应用生态学报,2007,18(12):2827 - 2834.
- [16] 刘宇. 吕一河. 傅伯杰. 景观格局 - 土壤侵蚀研究中景观指数的意义解释及局限性[J]. 生态学报,2011,31(1):267 - 275
- [17] GRAEME S C. Spatial resilience: integrating landscape ecology, resilience, and sustainability [J]. *Landscape Ecology*, 2011,26(7):899 - 909.
- [18] ROXANA A, MARTIN O, GONZALO I, et al. Stability of ecosystem functioning and diversity of grasslands at the landscape scale[J]. 2011,26(7):1011 - 1022.
- [19] 杨志峰,徐琳瑜. 城市生态规划学[M]. 北京:北京师范大学出版社. 2008.
- [20] 王如松,胡聃,李锋,等. 区域城市发展的复合生态管理[M]. 北京:气象出版社,2010.

(上接第 122 页)

- [8] WEN Z, LIAO W, CHEN S. Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture and on dairy manure[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 3087 - 3094.
- [9] 陈向东,藤尾雄策. 日本根霉 IFO5318 胞外  $\beta$ -葡萄糖苷酶的纯化及部分特性[J]. 微生物学报,1997,37(5):368 - 373.
- [10] 邓先余,邹谋勇,黄志坚,等. 一株产纤维素酶细菌的分离鉴定及其酶学特性研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,2012,51(5):93 - 99.
- [11] HENRIQUE F, SOUZA M, NASCIMENTO C V, et al. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose and xylose - stimulated  $\beta$  - glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens* [J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45: 272 - 278.
- [12] PARRY J, DAVID E. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable  $\beta$  - glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus* [J]. *Biochem J*, 2001, 353: 117 - 127.
- [13] SINGHANIA R R, SUKUMARAN R K, RAJASREE K P, et al. Properties of a major  $\beta$  - glucosidase - BGL1 from *Aspergillus niger* NII - 08121 expressed differentially in response to carbon sources [J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46: 1521 - 1524.
- [14] HSIEH M C, GRAHAM T L. Partial purification and characterization of a soybean  $\beta$  - glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58: 995 - 1005.
- [15] SUE M, ISHIHARA A, IWAMURA H. Purification and characterization of a  $\beta$  - glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings [J]. *Plant Sci*, 2000, 155: 67 - 74.
- [16] 瞿丽莉,朱均均,刘敏,等.  $\beta$ -葡萄糖苷酶的制备及在纤维素辅助水解上的应用研究[J]. 林产化学与工业 2009;29(1):13 - 17.
- [17] OPASSIRI R, POMTHONG B, ONKOKSOONG T, et al. Analysis of rice glycosyl hydrolase family I and expression of Os4bglu12  $\beta$  - glucosidase [J]. *BMC Plant Biol*, 2006, 6: 33
- [18] TURNER P, MAMO G, KARLSSON E N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining [J]. *Microb Cell Fact*, 2007, 6: 9.
- [19] 赵林果,游丽金,孟鹏,等. 黑曲霉胞外耐高糖  $\beta$ -葡萄糖苷酶的分离纯化及部分特性研究[J]. 林产化学与工业,2007;27(6):41 - 46.
- [20] SHEN H, BYERS L D. Thioglycoside hydrolysis catalyzed by  $\beta$  - glucosidase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(3): 717 - 720.
- [21] WYMAN C E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics and opportunities [J]. *Bioresour Technol*,1994, 50: 3 - 16.
- [22] CHEN M, QIN Y Q, LIU Z Y, et al. Isolation and characterization of a  $\beta$  - glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46: 444 - 449
- [23] SUKUMARAN R K, SINGHANIA R R, MATHEW G M, et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production [J]. *Renew Energy*, 2009, 3: 421 - 426.