

# 一种海洋拟诺卡氏菌产生的胞内中性 $\beta$ -葡萄糖苷酶

吴少杰<sup>1,2</sup>, 马桂珍<sup>1</sup>, 王淑军<sup>1</sup>, 陈 丽<sup>1,3</sup>, 王淑芳<sup>1</sup>

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物技术重点实验室 淮海工学院, 江苏 连云港 222005; 3. 江苏海洋资源开发研究院, 江苏 连云港 222001)

**摘要:** 从一株海洋放线菌株 HY-G 中纯化得到了一种胞内中性  $\beta$ -葡萄糖苷酶。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Superdex 200 凝胶柱层析估计酶分子质量分别是 43.3 kD 和 45.0 kD, 两者估计值接近, 表明该酶是一个单聚体, 不含亚基。采用对硝基酚基- $\beta$ -D-葡萄糖苷(p-NPG)做底物, 测得该酶的最适 pH 和最适温度分别为 pH 7.5 和 40 °C。该酶在 pH 6.0~7.0 最稳定, 在 70 °C 保温 30 min 仍能保留 56% 的酶活力, 表明具有一定的温度稳定性。基于 16S rRNA 基因的分类研究表明, 该菌株属于拟诺卡氏菌属。

**关键词:** 中性  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 海洋放线菌; 拟诺卡氏菌; 酶性质

中图分类号: Q556+.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)04-0041-06

$\beta$ -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)是一类能够水解结合于末端的非还原性  $\beta$ -D-葡萄糖苷键, 同时释放出  $\beta$ -D-葡萄糖和相应配基的酶。

$\beta$ -葡萄糖苷酶广泛存在于自然界中, 它可以来源于植物、微生物, 也可来源于动物, 有着多种生理活性和应用前景。 $\beta$ -葡萄糖苷酶参与生物体的糖代谢, 对维持生物体正常生理功能起着重要作用。哺乳动物和人类溶酶体内  $\beta$ -葡萄糖苷酶的缺陷, 将使葡萄糖脑苷脂贮积在各器官的单核巨噬细胞中, 累及骨髓、肝脾、骨骼及神经系统, 形成“戈谢氏病”, 而应用基因重组  $\beta$ -葡萄糖苷酶治疗此病已获得成功<sup>[1]</sup>。在药物研究与开发上, 由于大多数中草药活性成分都含有  $\beta$ -葡萄糖苷基, 因此,  $\beta$ -葡萄糖苷酶广泛地用于天然药物的生物转化与合成<sup>[2-3]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶也是纤维素降解酶系的重要组成部分, 但在微生物中分泌量少、活力低, 是纤维素酶解的限速酶、成为纤维素酶解的瓶颈环节; 通过人工添加外源  $\beta$ -葡萄糖苷酶有助于提高纤维素的水解效率<sup>[4]</sup>。此外,  $\beta$ -葡萄糖苷酶能将果、蔬、茶等主、副食品中的风味前体物质水解为具有浓郁天然风味的香气物质, 因而被称为“食品风味酶”<sup>[5]</sup>。目前, 我国尚未具备大规模生产  $\beta$ -葡萄糖苷酶的条件; 对各种来源的  $\beta$ -葡萄糖苷酶开展研究, 具有重要的经济和应用价值。

据报道, 几乎所有的  $\beta$ -葡萄糖苷酶都是酸性酶类, 其最适反应 pH 一般低于 7.0(大多数在 pH 3.5~5.5)<sup>[6]</sup>, 这必然会限制这种酶在某些方面的应用。目

前, 中性或碱性  $\beta$ -葡萄糖苷酶仅有个别报道<sup>[7-8]</sup>, 且大都是来自于芽孢杆菌类。本文报道一株海洋放线菌株 HY-G 及其所产生的中性胞内  $\beta$ -葡萄糖苷酶。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

海洋拟诺卡氏菌(*Nocardiosis* sp.)菌株 HY-G, 由本实验室分离自海洋环境, 目前保存在中国典型培养物保藏中心(保藏号: CCTCC M 2010126)。p-NPG: SIGMA 公司; 蛋白质标样: 江苏碧云天生物技术有限公司; 硅胶薄层层析板: 安徽皖西硅源材料厂; 各种凝胶色谱填料均来自 Pharmacia 公司; 其他药品均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

CR22G 高速冷冻离心机: 日本日立; SPX-250B 生化培养箱: 上海跃进医疗器械厂; HZQ-F160 全温振荡培养箱: 舟山市定海区海源仪器厂; BANDELIN HD2200 型超声波细胞破碎仪: 宁波新芝生物科技股份有限公司; 680 型酶标仪: Bio-rad 公司。BioLogic

收稿日期: 2012-04-26; 修回日期: 2012-09-07

基金项目: 中央财政支持地方高校发展专项资金-应用海洋生物学科科研创新团队项目(CXTD20); 江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题(2010HS05); 淮海工学院引进人才启动基金项目(KQ08015)资助  
作者简介: 吴少杰(1973-), 男, 江西抚州人, 副教授, 博士, 主要从事海洋生物技术研究, 电话: 0518-85895123, E-mail: shjwu@163.com

DuoFlow 快速蛋白纯化系统: Bio-rad 公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 产酶培养条件与胞内酶的提取

产酶培养条件与胞内酶的提取见文献 [3]。

### 1.3.2 酶活力测定

以 p-NPG 为底物, 酶液和 5 mmol/L 的 p-NPG 溶液各 50  $\mu$ L, 置 40  $^{\circ}$ C 水浴保温 10 min 后, 加入 1 mol/L NaOH 100  $\mu$ L 终止反应, 立即用酶标仪测定  $A_{400}$ 。酶活力定义为: 每分钟催化生成 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚所需的酶量。

### 1.3.3 酶的分离纯化

#### 1.3.3.1 硫酸铵分部盐析

4  $^{\circ}$ C 条件下, 加入硫酸铵粉末, 分别至饱和度 40%、60%、80%和 100%, 静置 1 h 后 12 000 r/min 离心 20 min, 分别收集沉淀, 用 pH 6.8 的磷酸缓冲液溶解沉淀, 4  $^{\circ}$ C 透析 24 h 后, 按 1.3.2 的方法测定不同饱和度下的  $A_{400}$  以确定最佳盐析饱和度。

#### 1.3.3.2 Phenyl-Sepharose 疏水层析

用 1.7 mol/L 的硫酸铵溶液平衡 Phenyl-Sepharose 疏水层析柱; 将经过 40%饱和度盐析并除去沉淀后的粗酶液直接上柱分离。用快速蛋白纯化系统进行梯度洗脱, 其中 A 泵为 1.7 mol/L 的硫酸铵溶液, B 泵为 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8), 流动相流速 1 mL/s。洗脱方式为: 1.7 mol/L 的硫酸铵溶液 40 mL、梯度(A 泵 0% ~ 100%)洗脱 70 mL, 磷酸缓冲液(10 mmol/L, pH6.8)75mL, 最后用 1.7 mol/L 的硫酸铵溶液重新平衡层析柱。收集  $A_{280}$  下的各峰并检测酶活性。

#### 1.3.3.3 DEAE-Sepharose 离子交换层析

用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 6.8)平衡柱子后, 将 Phenyl-Sepharose 疏水层析柱上收集的活性组分上样。用快速蛋白纯化系统进行梯度洗脱, 其中 A 泵为 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.8), B 泵为 1 mol/L NaCl 溶液, 流动相流速 1 mL/s。洗脱方法为: 50 mL 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)、梯度(A 泵 0% ~ 100%)130 mL、1 mol/L NaCl 溶液 20 mL, 最后用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)重新平衡层析柱。收集  $A_{280}$  下的各峰并检测酶活性。

#### 1.3.3.4 Superdex 200 HR 10/300 mm 凝胶色谱

用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8)平衡柱子。将 DEAE-Sepharose 阴离子交换层析的活性组分经透析后, 上样, 用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8)洗脱, 收集  $A_{280}$  下的各峰并检测酶活性。用标准蛋白质(含

甲状腺球蛋白, MW 669.0 kD、铁蛋白, MW 440.0 kD、牛血清白蛋白, MW 67.0 kD、 $\beta$ -乳球蛋白, MW 35.0 kD、核糖核苷酸酶 A, MW 13.7 kD、细胞色素 C, MW 13.6 kD、抑肽酶, MW 6.5 kD)作为标准蛋白, 在同样条件下洗脱, 以估计  $\beta$ -葡萄糖苷酶的分子质量。

#### 1.3.3.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

分离胶(水 1.6 mL, 1.5mol/L pH8.8 Tris-HCl 1.3 mL, 10% SDS 溶液 0.05 mL, 30%丙烯酰胺 2 mL, TEMED 0.002 mL, 10%APS 0.05 mL)、浓缩胶(水 3.4 mL pH6.8 0.5 mol/L Tris-HCl 0.63 mL, 10%SDS 0.05 mol/L, 30%丙烯酰胺 0.83 mL, TEMED 0.005mL, 10%APS 0.05mL)。在 Tris-甘氨酸电泳缓冲液中, 80 ~ 100V 电泳一定时间。电泳结束后, 用考马斯亮蓝染液染色。

### 1.3.4 菌株的分子鉴定

用上海赛百盛®细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA,  $-20^{\circ}$ C 保存备用。PCR 引物为通用引物, 序列为: F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3')、R1492 (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): Tag 酶(大连宝生物)0.25  $\mu$ L; Buffer(不含  $Mg^{2+}$ ) 5  $\mu$ L;  $Mg^{2+}$ 溶液 3  $\mu$ L; dNTP 4  $\mu$ L; 模板 DNA 1  $\mu$ L; 引物 F27 和引物 R1492 各 1  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s、55  $^{\circ}$ C 退火 45 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s(循环 33 次), 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 然后用江苏碧云天生物技术有限公司的 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收。将纯化后的 PCR 产物送到上海生工生物工程有限公司测序。使用 DNAMAN 6.0 软件并采用最大似然法构建菌株的系统进化树, 进化树经过 1000 次自举分析。

## 2 实验结果

### 2.1 硫酸铵分级盐析与盐析沉淀的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力测定

通过不同饱和度的硫酸铵分级盐析后离心得到沉淀; 沉淀经透析后用 pH7.0 的硫酸缓冲液稀释成相同体积, 然后测定酶活力(以  $A_{400}$  计), 得到的结果如表 1 所示。

由表中可见, 在 40%的硫酸铵饱和度下, 沉淀没有酶活力, 说明酶蛋白保留在溶液中, 没有被沉淀下来; 而到了 60%的饱和度, 酶蛋白开始沉淀出来; 到了 80%的饱和度, 大部分酶蛋白都已经沉淀。考虑到下一步将采用疏水柱进行纯化, 故将硫酸铵

盐析的饱和度选为 40%(相当于硫酸铵浓度 1.7 mol/L)。在该饱和度下,离心去除沉淀后,上清液可直接用疏水柱分离。

表 1 不同硫酸铵饱和度下沉淀的酶活力( $A_{400}$ )  
Tab. 1 Enzyme activity of deposits with different saturation of ammonium sulfate( $A_{400}$ )

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 饱和度(%)	酶活力
40	0.008
60	0.516
80	2.807
100	0.321

## 2.2 酶的层析分离纯化与分子量估算

经过硫酸铵盐析和疏水、离子交换及分子筛层析分离,将各个步骤下获得的酶蛋白分别电泳,电泳图谱如图 1(左)所示。可见,经过硫酸铵盐析和各种柱层析分离,最终获得了凝胶电泳单一条带的β-葡萄糖苷酶。通过与蛋白 Marker 比较计算,得出其估计分子质量为 43.3 kD。

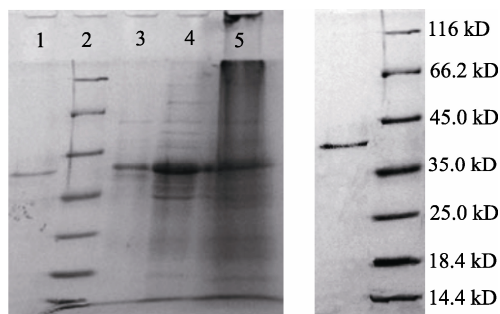


图 1 各纯化步骤对酶的纯化效果(左)及酶蛋白分子质量估测(右)

Fig. 1 The purity of β-glucosidase at different steps (left) and its molecular weight (right)

1. 经 Supdex 200 纯化; 2. 蛋白 Marker; 3. 经 DEAE-Sepharose 纯化; 4. 经 Phenyl-Sepharose 纯化; 5. 经硫酸铵盐析
1. after Supdex 200 chromatography purification; 2. protein markers; 3. after DEAE-Sepharose chromatography purification; 4. after Phenyl-Sepharose chromatography purification; 5. salted out with ammonium sulfate

表 2 蛋白质分子量与 Superdex 200 凝胶柱洗脱体积的关系及 β-葡萄糖苷酶的分子量估算值

Tab. 2 The relationship between  $M_w$  and elution volume, and the estimated  $M_w$  of the β-glucosidase

蛋白质	A	B	C	D	E	F	G	H
分子质量(kD)	669	440	67	35	13.7	13.6	6.5	45.0
洗脱体积(mL)	9.3	10.8	13.9	15.3	17.2	18.4	19.8	15.1

A. 甲状腺球蛋白; B. 铁蛋白; C. 牛血清白蛋白; D. β-乳球蛋白; E. 核糖核苷酸酶 A; F. 细胞色素 C; G. 抑肽酶; H. β-葡萄糖苷酶

在进行凝胶柱层析分离的同时,也能进行蛋白质分子质量的估算。在进行 Superdex 200 HR 10/300 凝胶柱分离时,得出 β-葡萄糖苷酶活性峰的洗脱体积为 15.1 mL。通过与标准蛋白质的洗脱体积相比较,得出如表 2 中所示的洗脱体积与蛋白质分子质量( $M_w$ )的对应关系。上述数值采用 Origin 7.0 进行线性拟合分析,得出了蛋白质分子质量的对数“lg( $M_w$ )”与洗脱体积“V”的线性拟合方程为:  $\lg(M_w) = 5.29067 - 0.23231 V (R^2 = 0.98780)$ 。根据此方程,计算出海洋放线菌株 HY-G 产生的 β-葡萄糖苷酶分子量为 45.0 kD。上述估计值和通过 SDS 凝胶电泳估计的分子量(43.3 kD)相近。

通过上述两种方法得到的分子质量结果相似,表明海洋放线菌株 HY-G 产生的 β-葡萄糖苷酶为单聚体,不含亚基,其分子质量为 43.3 ~ 45.0 kD。

## 2.3 酶性质研究

### 2.3.1 最适 pH 和最适温度

称取一定量冻干的酶,分别用 pH 4.0~11.0 的各种缓冲液溶解,分别测定酶活力,结果如图 2 所示。海洋放线菌株 HY-G 产生的 β-葡萄糖苷酶在以 p-NPG 为底物时,最适 pH 都为 pH 7.0~8.0。据报道,几乎所有的 β-葡萄糖苷酶都属于酸性酶类,其最适反应 pH 值一般低于 7.0(大多数在 pH 3.5~5.5),因而限制了其在某些方面的应用。中性或碱性 β-葡萄糖苷酶迄今仅有个别报道,且都是来自于芽孢杆菌类。而从海洋拟诺卡氏菌株 HY-G 中分离到的 β-葡萄糖苷酶,最适作用 pH 偏碱性,因此可能是一种新型的 β-葡萄糖苷酶。取 pH 7.0 的酶液,分别在 20~70 °C 下测定酶活力。可见,其最适温度为 40 °C,同时,在 30~50 °C 范围内,酶活力变化不大(图 2)。

### 2.3.2 pH 稳定性和温度稳定性

为了测定酶的 pH 稳定性,将不同 pH 值(pH 4.0~11.0)的酶液在 4 °C 冰箱中保存 24 h 后,调整到 pH 7.0,然后分别测定残余酶活力。为了测定酶的温度稳定性,取 pH 7.0 的酶液,分别在 30~80 °C 下保

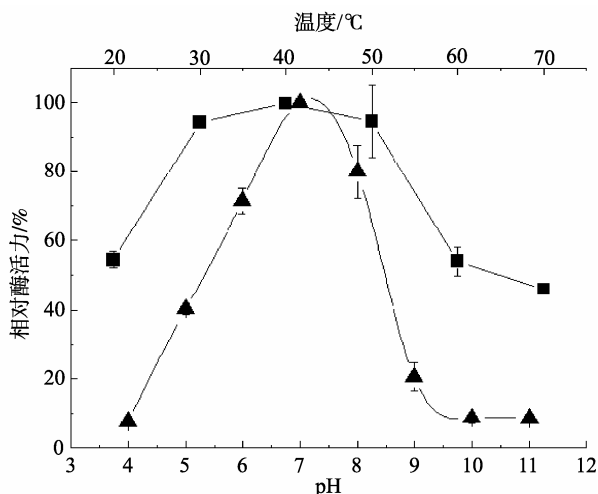


图 2 酶催化的最适 pH 和最适温度( 最适 pH; 最适温度)

Fig. 2 The optimal pH and temperature of the  $\beta$ -glucosidase ( optimal pH; optimal temperature)

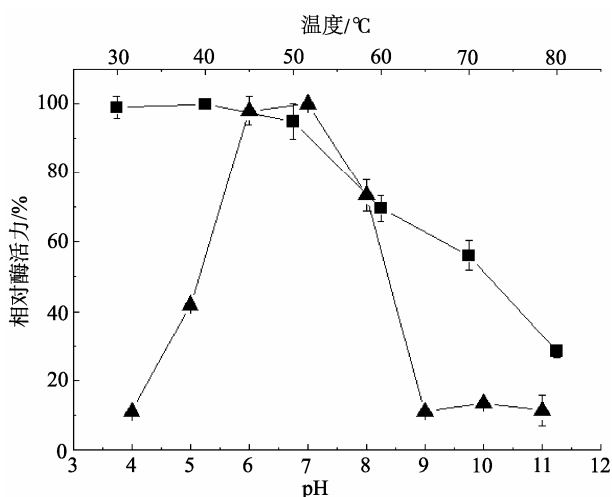


图 3 酶的 pH 和温度稳定性( pH 稳定性; 温度稳定性)

Fig. 3 The pH and temperature stability of the  $\beta$ -glucosidase ( pH stability; temperature stability)

温 30 min 后, 测定残余酶活力。结果如下图所示。可见, 该酶在 pH 6.0 ~ 7.0 时最稳定, pH < 5 或 pH > 8 时, 酶活力迅速下降; 在 70 °C 下 30 min 仍能保存 56% 的酶活力, 说明该酶具有较好的耐热性。

### 2.3.3 金属离子对酶活力的影响

采用含有浓度为 10 mmol/L 不同金属离子的缓冲液(pH 7.0), 然后按照 3.1.2 的方法测定酶活力。以不添加金属离子的酶反应体系为空白对照(相对酶活力为 100%), 确定各金属离子对酶活性的抑制或激

活作用, 结果见表 3。

表 3 金属离子对酶活力的影响(n = 3)

Tab. 3 The effects of ions on the activity of the  $\beta$ -glucosidase

离子	相对酶活力
Fe <sup>3+</sup>	120.6 ± 5.1
Fe <sup>2+</sup>	117.0 ± 6.3
Ca <sup>2+</sup>	96.9 ± 4.8
Mg <sup>2+</sup>	105.6 ± 3.2
Pb <sup>2+</sup>	107.4 ± 7.2
Zn <sup>2+</sup>	55.9 ± 3.7
Ag <sup>+</sup>	33.2 ± 3.1
Cu <sup>2+</sup>	12.7 ± 1.1

由表中可见, Fe<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Fe<sup>3+</sup>对该酶活性有促进作用, 其中 Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>促进作用较大; Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>对该酶活性有抑制作用, 其中 Zn<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>抑制作用较大。

## 2.4 菌株鉴定

经过 PCR 扩增, 得到了海洋拟诺卡氏菌株 HY-G 近全长 16 S rRNA 基因片段。通过测序, 得出了其核酸序列。上述核酸序列与 GenBank 上的序列进行比对分析, 发现该菌株 HY-G 与 *Norcardiopsis* 菌属的许多菌株序列相似度都在 98% 以上, 其中与塘沽拟诺卡氏菌(*Norcardiopsis tangguensis*)和埃及拟诺卡氏菌(*Norcardiopsis aegyptia*)的序列相似度都为 99.9%(1393/1395)。通过构建系统进化树进行进一步分析(图 4), 可以看出, 菌株 HY-G 也与菌株 *Norcardiopsis tangguensis*、*Norcardiopsis aegyptia* 也聚成了一簇, 支持度为 100%, 表明与这两株菌的亲缘关系较近。

## 3 讨论

$\alpha$ -葡萄糖苷酶广泛存在于自然界中。目前已报道的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶中, 中性或碱性酶非常罕见, 下表列出了目前报道的几种不同来源的中性或碱性  $\alpha$ -葡萄糖苷酶。可以看出, 这几种中性或碱性  $\alpha$ -葡萄糖苷酶都是来自于细菌且多数都是来自芽孢杆菌, 如嗜热采油芽孢杆菌(*Geobacillus thermodenitrificans*)、环状芽孢杆菌嗜碱性亚种(*Bacillus circulans* subsp. *alkalophilus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等, 目前, 放线菌未见产生中性或碱性  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的报道。在拟诺卡氏菌中, 有关于拟诺卡氏菌产生

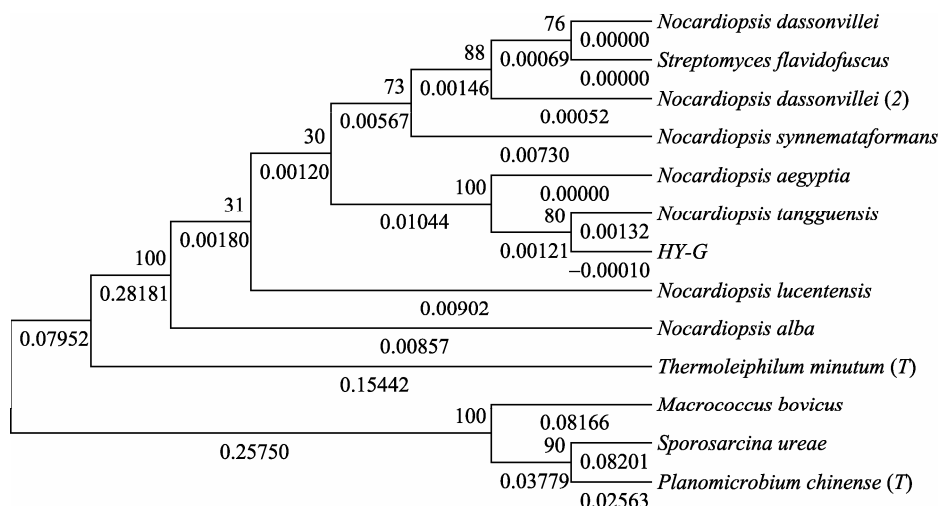


图 4 海洋放线菌菌株 HY-G 的系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic tree showing the relationships among strain HY-G and *Nocardioopsis* species.

表 4 目前报道的几种中性或碱性 β-葡萄糖苷酶

Tab. 4 Features of some reported neutral or alkaline β-glucosidase

来源	分子质量(kD)	最适 pH	最适温度( )	产生部位	参考文献
<i>Bacillus circulans</i> subsp. <i>alkalophilus</i>	51	6-9	55	胞外	[7]
<i>Bacillus subtilis</i> strain M01	43	7.0	50	胞外	[8]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	不详	7.2~7.4	60	不详	[9]
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	52	8.0	70	基因重组酶	[10]
<i>Norcardioopsis</i> sp. HY-G	43.3~45	7.5	40	胞内	本文

耐热型 α-淀粉酶<sup>[11]</sup>、碱性蛋白酶<sup>[12]</sup>和丝氨酸内肽酶<sup>[13]</sup>等报道,但未见该属微生物产生 β-葡萄糖苷酶的报道。该菌株产生的 β-葡萄糖苷酶,分子质量与其他中性或碱性 β-葡萄糖苷酶相近,最适温度也相差不大,但与芽孢杆菌所不同的是,海洋拟诺卡氏菌株 HY-G 中的 β-葡萄糖苷酶是属于胞内酶。

拟诺卡氏菌是一种比较稀有的放线菌,目前已经鉴定的有 30 余种(NCBI - taxonomy, 2012)。海洋拟诺卡氏菌株 HY-G 分离自河北乐亭海滩,由于其地理位置与天津塘沽很近,并且它们的 16S rRNA 基因也高度相似,因此该菌株与塘沽拟诺卡氏菌的关系尚需进一步确认。

海洋高盐碱性这一特殊环境,可能造成海洋微生物能产生不常见的中性或碱性糖苷酶,例如碱性淀粉酶<sup>[14]</sup>、碱性纤维素酶<sup>[15]</sup>等;海洋拟诺卡氏菌株 HY-G 能产生碱性 β-葡萄糖苷酶,可能也与其所生存的海洋环境有关。由于大多数普通 β-葡萄糖苷酶在 pH>7 时活力较低,而中性或碱性 β-葡萄糖苷酶在这种情况下具有最佳的水解活力,因此能够拓展

β-葡萄糖苷酶的应用场合。海洋拟诺卡氏菌株 HY-G 具有营养需求简单、培养条件温和、容易形成菌丝体颗粒而便于收获胞内酶等特点;其产生的 β-葡萄糖苷酶是一种中性酶,不仅酶活力较高,而且酶分子质量较小,便于采用基因工程手段进行克隆和高效表达。因此,该菌株及其所产的酶具有良好的开发应用前景。

参考文献:

- [1] 邵金辉, 韩金祥, 朱有名, 等. β-葡萄糖苷酶在工农医领域的应用 [J]. 生命的化学, 2005, 25(1): 22- 24.
- [2] 刘欣, 崔昱, 杨凌. 糖苷酶与药物研发 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(2): 223- 228.
- [3] 吴少杰, 焦豫良, 朱强, 等. 海洋拟诺卡氏菌株 HY-G 转化大豆异黄酮苷发酵条件的优化 [J]. 食品科学, 2011, 32(7): 273- 278.
- [4] Markku S, Juha K P, Erkko Y, et al. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β-glucosidase BGLII (Cell1A) [J].

- Appl Environ Microbiol, 2002, 68(9): 4546-14553.
- [5] 潘利华, 罗建平.  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究及应用进展 [J]. 食品科学, 2006, 27(12): 803- 807.
- [6] 王志江, 魏红福.  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究 [J]. 饲料工业, 2006, 27(12): 20- 22.
- [7] Paavilainen S, Hellman J, Korpela T. Purification, characterization, gene cloning, and sequencing of a new  $\beta$ -glucosidase from *Bacillus circulans* subsp. *Alkalophilus* [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 927- 932.
- [8] 陈红漫, 赵璐, 杨佳影. 一株产胞外中性  $\beta$ -葡萄糖苷酶菌株的鉴定及酶学特性研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(15): 160- 163.
- [9] Singh A, Hayashi K. Construction of Chimeric  $\beta$ -glucosidases with improved enzymatic properties [J]. J Biol Chem, 1995, 270(37): 21982- 21933.
- [10] 冯露, 王磊, 袁刚, 等. 一种嗜热碱性  $\beta$ -葡萄糖苷酶及其编码基因. 中国专利, 200510116748.9, 2006.
- [11] Stamford T L M, Stamford N P, Coelho L C B B, et al. Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of yam bean [J]. Bioresource Technol, 2001, 76:137- 141.
- [12] Moreira K A, Porto T S, Teixeira M F S, et al. New alkaline protease from *Nocardiopsis* sp.: partial purification and characterization [J]. Process Biochem, 2003, 39:67- 72.
- [13] Dixit V S, Pant A. Comparative characterization of two serine endopeptidases from *Nocardiopsis* sp. NCIM 5124 [J]. BBA-Gen Subjects, 2000, 1523:261- 268.
- [14] 戴世鲲, 郑天凌, 王晓颖, 等. 深海产低温碱性淀粉酶菌 *Halomonas* sp.W7 的筛选及发酵条件研究. 海洋科学, 2007, 31(11): 27-32.
- [15] 徐庆强, 张志明, 王延明, 等. 产碱性纤维素酶海洋细菌的筛选、鉴定及酶学性质研究. 海洋科学, 2009, 33(7): 1-5.

## An intracellular neutral $\beta$ -glucosidase from marine *Nocardiopsis* sp. HY-G

WU Shao- jie<sup>1,2</sup>, MA Gui- zhen<sup>1</sup>, WANG Shu- jun<sup>1</sup>, CHEN Li<sup>1, 3</sup>, WANG Shu- fang<sup>1</sup>

(1. Marine Department, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 3. Jiangsu Marine Resources Development and Research Institute, Lianyungang 222001, China)

Received: Apr.,26,2012

**Key words:** neutral  $\beta$ -glucosidase; marine actinomycetes; *Nocardiopsis*; enzymological characteristics

**Abstract:** An intracellular neutral  $\beta$ -glucosidase was isolated from a marine actinomycetes strain HY-G. The molecular weight of the  $\beta$ -glucosidase was confirmed to be 43.3 kD, by Sodium Dodecyl Sulphate Polyacryl Amide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and 45.0 kD by size exclusion chromatography. suggesting it might be a monomer. The optimal pH and temperature for p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG) hydrolysing were around 7.5 and 40 °C, respectively. The  $\beta$ -glucosidase was most stable at pH 6.0-7.0, and retained 56% activity under 70 °C for 30 min. The taxonomy based on 16S rRNA gene suggested that strain HY-G belongs to genus *Nocardiopsis*.

(本文编辑: 康亦兼)