



一种来源于兼性嗜碱菌 *Bacillus pseudofirmus* 703 的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶

姜顺, 郝少华, 向腊, 宋俐, 周玉玲, 蒋思婧*, 张桂敏*

湖北大学生命科学学院, 湖北省生物资源绿色转化协同创新中心, 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

摘要: β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶作用于肽聚糖或几丁质, 从其非还原末端水解产生 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖单体, 该酶在细胞壁代谢过程中起重要作用, 在医药和生物技术领域也有广泛的应用。【目的】克隆表达来源于兼性嗜碱菌 *Bacillus pseudofirmus* 703 的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 NagZ703, 为获得乙酰氨基葡萄糖单体奠定基础。【方法】以 *B. pseudofirmus* 703 基因组 DNA 为模板, 克隆得到了 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶基因 NagZ703, 通过构建 pET28a-nagZ703 表达载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达 NagZ703, 利用镍柱纯化得到 NagZ703 纯蛋白, 并对其酶学和生化性质进行分析。【结果】NagZ703 与其同源蛋白多序列比对分析结果表明, NagZ703 属于糖苷水解酶 3 家族(GH3), 由 2 个结构域构成, 催化活性中心由位于 N 端结构域的 Arg232-His234-Arg318 组成, 和研究最多的 *Bacillus subtilis* 168 来源的 BsNagZ 氨基酸的序列相似性为 37%。酶学性质分析表明, 以对硝基酚- β -乙酰氨基葡萄糖苷 (pNP- β -GlcNAc)为底物, NagZ703 的最适反应温度和 pH 分别为 60 °C 和 pH 6.5, 比酶活为 10.79 U/mg, 其 K_m 和 V_{max} 分别为 0.276 mmol/L 和 0.612 mmol/(mg·min)。该酶具有较好的稳定性, 在 50 °C 处理 30 min, 或在 pH 6.0–10.5 条件下, 4 °C 保存 12 h 后, 仍保留 80%以上的酶活力。EDTA 不影响该酶的活性, 推测其为非金属依赖酶, 且 Hg^{2+} 可完全抑制酶活性。【结论】本研究将兼性嗜碱菌 *Bacillus pseudofirmus* 703 来源的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 NagZ703 在大肠杆菌中成功表达和纯化, 并分析了其酶学性质; NagZ703 的最适 pH 为 6.5, 没有表现出耐盐嗜碱的特征; NagZ703 能水解胶体几丁质产生 GlcNAc, 为酶解生产 GlcNAc 提供了一条可行的思路。

关键词: β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 多序列比对, 异源表达, 酶学性质分析, 乙酰氨基葡萄糖

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0501506); 湖北省技术创新专项重大项目子课题(2018ABA113); 2016 武汉黄鹤英才人才项目

*通信作者. 蒋思婧, Tel: +86-27-88663882, E-mail: jiangsijing@hubu.edu.cn; 张桂敏, Tel: +86-27-88663882, E-mail: zhangguimin@hubu.edu.cn, zhangguimin6@hotmail.com

收稿日期: 2019-03-09; 修回日期: 2019-05-13; 网络出版日期: 2019-10-17

几丁质是由 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖(GlcNAc) 单体通过 β -1,4 糖苷键连接而成的聚合物, 是地球上仅次于木质纤维素的第二大类可再生多糖资源, 在虾、蟹和昆虫壳体、真菌以及藻类中含量特别丰富^[1], 每年海产品产生的几丁质就超过了 8 万 t^[2]。氨基葡萄糖(GlcN)和乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)是形成软骨细胞的重要营养素, 是健康关节软骨的天然组织成分; 能促进人体粘多糖的合成、提高关节滑液的粘性、改善关节软骨, 并能刺激软骨细胞的生长, 因此它被广泛用于治疗风湿性关节炎、骨质增生和半月板损伤等病症; 它还具有促进抗生素注射效能的作用, 可供糖尿病者作营养补助剂; GlcNAc 能替代皮质醇治疗肠炎, 对黑色素瘤、肺癌、肾癌等也有一定的疗效; 可以添加于化妆品、饲料和食品中^[3]。目前一般是通过酸水解几丁质来制备乙酰氨基葡萄糖单体, 这种工艺酸碱用量大, 对设备的腐蚀比较严重, 副产物多, 产品得率低, 且废水排放量大, 环境污染严重^[4]。因此, 迫切需要发展条件温和、产品纯度高和环境友好的酶法生物转化工艺。酶法水解几丁质制备 GlcNAc 需要内切几丁质酶(endochitinases, C 3.2.1.14)和 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl- β -D-glucosaminidase, C 3.2.1.30)^[5]的协同作用。

内切几丁质酶随机水解几丁质内部的糖苷键, 产生几丁寡糖, N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase)能从非还原端水解几丁寡糖、几丁二糖和胞壁肽等寡糖的 O-糖苷键, 产生 N-乙酰氨基葡萄糖单体(GlcNAc)单体^[6], 因此, 这两类酶组合可以用于 GlcNAc 的酶法生产。因为几丁质酶还可以用于医药、植物病害防治等方面, 因此几丁质酶基因克隆表达获得几丁质酶的研究很多。是

NAGase 的研究主要集中在其胞内生理功能研究上, 体外表达和表征的研究也越来越受到关注。

NAGases 广泛存在于动植物和微生物中, 在细胞中承担重要的生理功能, 如参与细胞壁的代谢循环^[7]。自上世纪 70 年代枯草芽孢杆菌来源的 NAGases NagZ 首次被分离纯化以来^[8], 从不同微生物体内均发现了 NAGases, 一系列细菌(如 *E. coli*、*Enterobacter* sp.、*Pseudomonas fluorescens*、*Streptomyces thermoviolaceus* 等)和真菌(如 *Rhizomucor miehei*、*Talaromyces emersonii* 等)来源的 NAGases 陆续被分离纯化, 并对这些不同来源 NAGases 的酶学性质、底物特异性和催化机制都进行了研究, 相应的编码基因也被克隆并进行异源表达^[7,9-10], 积累了很多 NAGases 的基因和蛋白质序列信息, 并对酶的蛋白质结构进行了表征^[11]。氨基酸序列的同源比较分析显示, 目前已发现的 NAGases 分别属于糖苷水解酶 GH 3、20、73 和 84 这 4 个家族(<http://www.cazy.org/>), 其中, GH 3 家族的 NAGases 成员最多。基因组测序的广泛使用提供了大量新的 NAGases 基因信息, 这些 NAGases 的分子和生化性质尚需进一步通过实验来解析。

本课题组从湖北省天门市的水稻田土壤中分离得到的一株嗜碱菌假强芽孢杆菌 *Bacillus pseudofirmus* 703^[12], 它与 *Bacillus pseudofirmus* OF4 的 16S rDNA 序列相似性为 100%; 而 *B. pseudofirmus* OF4 菌株的全基因组测序已完成, 其基因组测序数据已上传至 NCBI 的基因组数据库中。全基因组的基因功能注释揭示了该基因组中有一个 GH3 的 NAGase, 目前关于 *B. pseudofirmus* 来源的 NAGase 还未见报道。因此, 本研究以 *B. pseudofirmus* 703 为模板, 得到 NagZ703 基因,

实现了 NagZ703 在大肠杆菌细胞内的可溶性表达, 并对纯化的重组酶 NagZ703 进行生化分析。

1 材料和方法

1.1 菌株和试剂

1.1.1 菌株: *Escherichia coli* XL10-Gold 克隆菌株和 BL21(DE3) 表达菌株购自 Transgene 公司, *B. pseudofirmus* 703 由本实验室筛选并保存。

1.1.2 质粒: pET28a 购自 Stratagene 公司。

1.1.3 培养基: LB 液体培养基: 0.5% 酵母提取物, 1% 蛋白胨, 0.5% NaCl; LB 固体培养基是在 LB 液体培养基的基础上添加 1.5% 琼脂。Horikoshi-I 液体培养基: 1% 葡萄糖, 0.5% 酵母提取物, 0.5% 蛋白胨, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$, 1% Na_2CO_3 。

1.1.4 酶: *Bam*H I、*Sal* I 等限制性内切酶、Solution I、Ex *Taq* 酶均购自 TaKaRa 公司;

1.1.5 生化试剂: IPTG、对硝基酚- β -乙酰氨基葡萄糖苷(pNP- β -GlcNAc)购自 Sigma 公司, His Bind Kits 购自 Novagen 公司, 卡那霉素、质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、Quick Start Bradford、标准牛血清白蛋白、SDS-PAGE 检测试剂等其他常规试剂采用进口分装或国产分析纯产品。

1.2 引物

根据 *B. pseudofirmus* OF4 的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶的基因序列(GenBank 收录号 ADC51622.1) 设计并合成一对扩增 NagZ703 的引物(表 1)。

1.3 序列分析

用 ClustalX 软件, 按默认参数进行多序列比对分析, 分析结果用 Esript 导出^[12], 用 SignalP 4.1Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析 NagZ703 有无信号肽序列。

1.4 NagZ703 基因的获得

将 *B. pseudofirmus* 703 接入 Horikoshi-I 液体培养基中, 37 °C 培养过夜, 然后收集菌体, 从中抽提出基因组 DNA; 以基因组 DNA 为模板、NagZ703 F/R 为引物进行 PCR 扩增(反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 2 min 10 s, 循环 35 次; 72 °C 10 min), 得到一个约 2 kb 的 NagZ703 基因片段; 经琼脂糖凝胶电泳后, 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收该基因片段。

1.5 重组表达质体构建

将扩增得到的 NagZ703 片段分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行酶切后, 与经这两种酶消化的质粒载体 pET28a 连接; 连接混合物转化 *E. coli* XL 10-Gold 后, 涂布于添加了卡那霉素(终浓度 50 μ g/mL)的 LB 平板上, 37 °C 培养 12–16 h; 挑取转化平板上的单菌落于 3 mL 添加了卡那霉素(终浓度 50 μ g/mL)的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养过夜, 然后收集菌体, 从中抽提质粒; 经琼脂糖凝胶电泳筛选出比 pET28a 大的质粒, 再用 *Bam*H I 和 *Sal* I 对质粒进行酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测, 产生了大小分别为 2 kb 和 5.4 kb 两个 DNA 片段的质粒初步判定为重组质粒 pET28a-NagZ703, 将该质粒送至公司测序分析。

表 1. 扩增 NagZ703 的引物序列

Table 1. Primer sequence used to amplify NagZ703

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size/bp
NagZ703 F	CGCGGATCCGATAACTCGCTTAAAGATCTTGTC (<i>Bam</i> H I was underlined)	33
NagZ703 R	ACGCGTCTGACTTAATAGTTCAAATAGTGGCCAA (<i>Sal</i> I was underlined)	33

1.6 NagZ703 在大肠杆菌中的表达和纯化

将 pET28a-NagZ703 转入 *E. coli* BL21 (DE3), 获得了表达 NAGase 的 *E. coli* 工程菌; 将该菌接入添加了卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 摇瓶培养至 OD_{600} 为 0.6 时, 加入 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L), 18 °C 诱导培养 12 h。离心收集菌体, 用 PBS buffer 重悬细胞后, 超声波破碎细胞, 然后离心收集细胞破碎上清液; 用 His Bind Kits 纯化得到带 His 标签的 NagZ703, 用 Amicon Ultracentricon 超滤浓缩, 随后对该酶进行脱盐处理, 去除咪唑; 整个纯化过程都在 4 °C 进行。以牛血清白蛋白(BSA)作为标准品, 采用 Bradford 法测定纯化过程中每步蛋白质的浓度。

1.7 酶活力和酶学性质分析

NAGase 的酶活力以该酶水解对硝基酚- β -乙酰氨基葡萄糖苷(pNP- β -GlcNAc)底物后释放的 4-硝基苯(pNP)的量来计算^[13]。酶活力测定方法: 取 10 μ L 酶液, 加入 90 μ L 0.5 mol/L 的 pNP- β -GlcNAc 底物, 在合适的条件下反应 10 min, 然后加入 200 μ L 0.2 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 在 405 nm 检测反应物的吸光度。酶活力单位(1U)定义为: 在适宜条件下, 每分钟水解底物产生 1 μ mol 的 pNP 所需的酶量。

最适温度和热稳定性的测定: 在 35–85 °C 的温度范围内、pH 6.0 (50 mmol/L 的 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液)条件下, 测定 NagZ703 的酶活力, 找出酶的最适反应温度; 将 NagZ703 分别在 45、50、55、60 °C 处理 10、20、30、40 min, 然后在最适条件下测定酶的残余活性, 未处理 NagZ703 酶活力设定为 100%。

最适 pH 和 pH 稳定性的测定: 在 pH 4.0–9.0

(50 mmol/L HAc-NaAc 缓冲液, pH 4.0–5.5; 50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液, pH 5.0–8.0; 100 mmol/L 的 Tris-HCl, pH 8.0–9.5)范围内、60 °C 反应温度下, 测定 NagZ703 的酶活力, 找到最适反应 pH。将 NagZ703 用不同的 pH 缓冲液(pH 4.0–5.5, 50 mmol/L HAc-NaAc 缓冲液; pH 5.0–8.0, 50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液; pH 8.0–9.0, 100 mmol/L 的 Tris-HCl; pH 9.5–10.5, 50 mmol/L Glycine-NaOH)稀释后在 4 °C 放置 16 h, 然后在最适条件下测定酶的残余活性, 未处理 NagZ703 酶活力设定为 100%。

1.8 金属离子对酶活性的影响

在酶解反应体系中分别加入终浓度为 5 mmol/L 不同的金属离子溶液, 在最适反应条件下水解 pNP- β -GlcNAc 底物, 然后测 NagZ703 的酶活力, 以不加金属离子测得的酶活力为 100%对照。

1.9 酶动力学参数的测定

以浓度分别为 1、2、3、4、5、6、7、8 mmol/L 的 pNP- β -GlcNAc 为底物, 酶浓度为 0.36 mg/mL, 在 60 °C、pH 6.5 条件下反应, 用酶标仪每隔 15 s 连续在 OD_{405} 处测样品的吸光值; 计算每个底物浓度下酶反应的初速度, 然后用双倒数法作图。

1.10 胶体几丁质的酶解及产物检测

胶体几丁质的制备按照 Hsu 等的方法^[14]进行, 以胶体几丁质作为底物进行水解实验, 250 μ L 3% 的胶体几丁质中加入 150 μ L NagZ703 酶液 (7 U/mL), 在 pH 6.5、温度 50 °C 条件下水解 2 h。

NagZ703 联合几丁质酶来水解胶体几丁质: 1 mL 2% 的胶体几丁质溶液中, 加入 20 μ L 几丁质酶, 在 pH 6.0、温度 37 °C 条件下水解 1 h 后, 再

加入 100 μL NagZ703 酶液(3 U/mL), 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下继续水解 1 h。

将酶解过后的样品高速离心, 取上清进行 HPLC(安捷伦高效液相色谱站)检测, 样品进样量为 20 μL , 流动相为 70%乙腈(乙腈:水=70:30, V/V), 检测流速为 0.5 mL/min, 检测温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 190 nm。

2 结果和分析

2.1 NagZ703 保守结构域和催化活性中心的分析

序列分析显示 NagZ703 属于糖苷水解酶 3 家族的水解酶, N 端含有 29 个氨基酸组成的信号肽; 为了预测其保守的结构域和催化活性中心, NagZ703 与一致性较高、大小比较相似且已经分析了生化性质的 4 个 NAGase (来源于 *B. subtilis* 168、*Cellulomonas fimi*、*Streptomyces thermoviolaceus*、*Alteromonas* sp. strain O-7, GenBank 收录号分别为 CAB11942.1、AF478460.1、AB00877.1、D17399.1, 一致性分别为 36.97%、20.64%、28.45%、25.46%) 进行多序列氨基酸同源比对(图 1)。并以解析了三维结构的 *B. subtilis* NagZ (BsNagZ)为模板, 分析这 4 个不同来源的 NAGase 的结构特征, 结果发现 4 个酶所含 α 螺旋和 β 折叠的数量和位置极为类似, 这表明 NagZ703 与糖苷水解酶 3 家族乙酰葡萄糖胺酶亚家族的结构相似, 有 2 个独立的结构域, N 端由 $(\beta/\alpha)_8$ 形成桶状催化结构域, C 端结构域是由 $\alpha\beta\alpha$ 形成的三明治结构; N 端具有高度保守的 KH(F/I)PG(H/L)GX(4)D(S/T)H 的序列, 识别底物的乙酰氨基基团, 而其中第 232 位的天冬氨酸(D)和第 234 位的组氨酸(H)构成催化二联体, 这 2 个位点和 318 位天冬氨酸(D)构成酶的催化活

性中心, 这是 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶典型特征。

2.2 NagZ703 基因的克隆和重组质粒的构建

通过 PCR, 从 *B. pseudofirmus* 703 基因组中扩增得到去除了信号肽序列、长 2013 bp 的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因 NagZ703, 将该基因克隆至表达载体 pET28a 的 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点之间, 得到重组质粒 pET28a-NagZ703; 测序结果表明 NagZ 基因和表达载体上 N 端的 HIS 标签正确融合。

2.3 NagZ703 在大肠杆菌中的表达及纯化

将 pET28a-NagZ703 质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3), 获得了重组表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-NagZ703, 用 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导, 实现了 NagZ703 在大肠杆菌细胞内可溶性表达; 超声波破碎细胞后, 细胞裂解液经 Ni 柱纯化, 得到纯的 NagZ703, 然后对纯化的酶进行脱盐处理。SDS-PAGE 分析显示纯化的蛋白质是大约 73 kDa 单一分子(图 2), 与预测的分子量大小一致; 对纯化过程每一步得到的 NagZ703 的酶活力也进行了分析, 结果表明酶在纯化过程中是稳定的(表 2)。

2.4 NagZ703 酶学性质的研究

2.4.1 温度对 NagZ703 活性及稳定性的影响: 在 30–85 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内, 测定 NagZ703 对底物 pNP- β -GlcNAc 的活性, 结果显示, 酶的最适作用温度是 60 $^{\circ}\text{C}$ (图 3-A), 在 50–65 $^{\circ}\text{C}$ 温度范围内, NagZ703 能表现出 80%以上的相对活性, 当反应温度高于 70 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活性迅速下降。NagZ703 的热稳定性分析结果显示, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 30 min 后, NagZ703 仍保留了接近 80%的残余酶活力, 而在 55 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min 后, 残余酶活力降至 40%以下(图 3-B)。

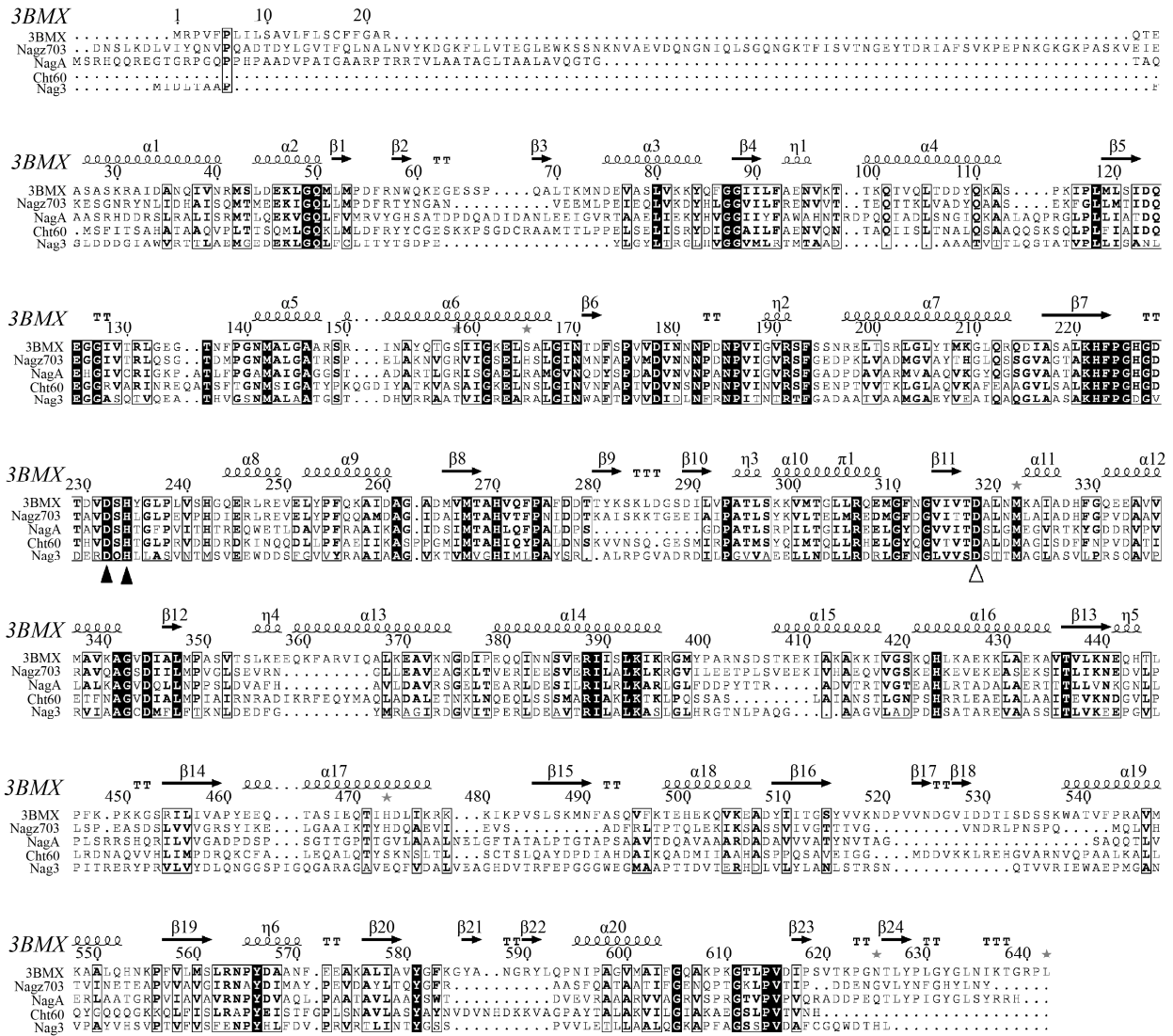


图 1. NagZ703 与 GH3 家族的 β-N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶的氨基酸序列比对分析

Figure 1. Multiple sequences alignments of NagZ703 with GH3 GlnNAases. Secondary structure elements are presented on top: α helices with squiggles, β strands with arrows, η strands with random coil. Strictly conserved residues are indicated in white letters on a black background. The conserved regions are shown in black boxes. The residues equivalent to the putative catalytic dyad are indicated by a solid triangle, which constitute the catalytic active site with the third residue marked by a hollow triangle. These residues are believed to play a vitally important role in the reaction of NagZ703 with its substrates.

表 2. 重组 NagZ703 蛋白纯化表

Table 2. Purification of recombinant NagZ703

Purification	Total protein/mg	Total activity/U	Specific activity/(U/mg)	Purified fold	Recovery rate/%
Crude enzyme	36.03	150.56	4.18	1.00	100.00
Ni-column	12.13	121.96	10.05	2.40	81.00
Desalting column	9.51	102.60	10.79	2.58	68.15

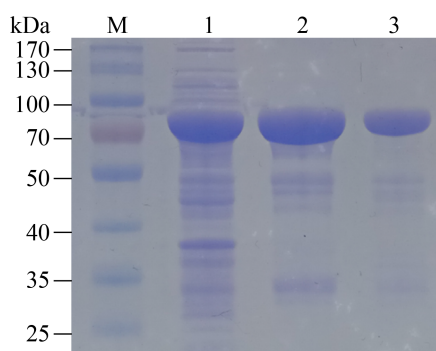


图 2. 表达和纯化的 NagZ703 的 SDS-PAGE 分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis of the recombinant NagZ703 at each purification step. Samples were resolved on a 12% polyacrylamide gel and then stained with Coomassie Blue R-250. M: Protein marker; 1: Lysate supernatant of induced *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-NagZ703 cells; 2: Purification of NagZ703 on Ni-NTA affinity column; 3: Purification of NagZ703 on desalting column.

2.4.2 pH 对 NagZ703 活性及稳定性的影响: 不同 pH 值的缓冲液对 NagZ703 的活性有很大的影响, 其最适反应 pH 为 6.5, 在 pH 5.5–7.0 展现出 50%以上相对活性(图 4-A), 当 pH 低于 5.5 或高于

7.5 时, 酶活力迅速下降。pH 稳定性分析表明: NagZ703 在 pH 6.0–10.5 内都很稳定, 在此 pH 范围内, 4 °C 保存 12 h 后, 该酶仍保持 80%以上的残余活力; 当 pH 降到 5 以下时, 该酶丧失大部分活性(图 4-B)。

2.4.3 金属离子对 NagZ703 活性的影响: β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶是非金属依赖酶, EDTA 对酶活性没有明显的影响; 不同金属离子对重组酶 NagZ703 活性的影响见表 3, 除 Mg^{2+} 外, 很多二价金属离子对酶活性都有抑制, 其中 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ni^{2+} 均使酶丧失了 80%以上的活性, 而 Hg^{2+} 完全抑制了 NagZ703 的酶活力; 甲醛也使 NagZ703 几乎完全丧失了酶活力(表 3)。

2.4.4 NagZ703 的酶动力学: 控制 pNP- β -GlcNA 底物浓度分别为 1、2、3、4、5、6、7、8 mmol/L, 测定不同底物浓度下酶反应的初速度, 采用双倒数法作图(图 5), 并计算得到 K_m 和 V_{max} 的值分别为 0.276 mmol/L 和 0.612 mmol/(mg·min)。

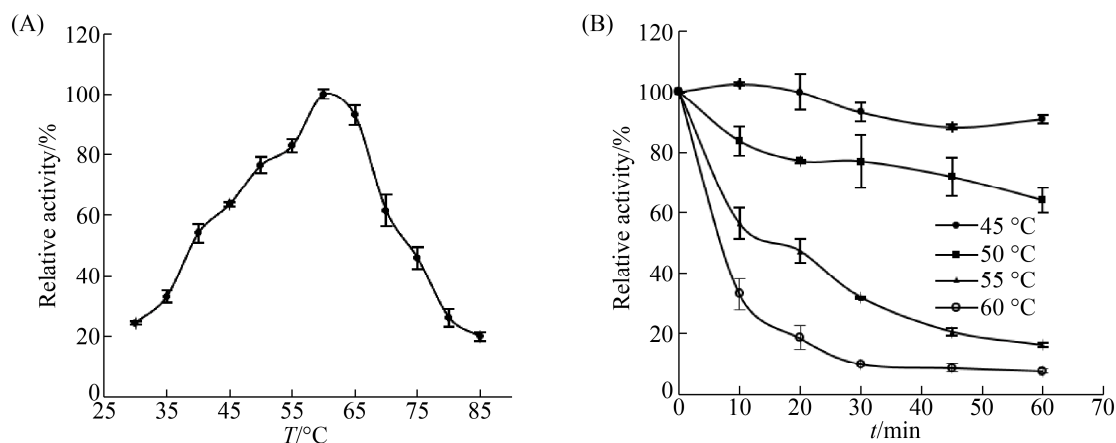


图 3. 反应温度对 NagZ703 酶活性和稳定性的影响

Figure 3. Effects of temperature on the activity and stability of NagZ703. A: Effects of temperature on the activity of NagZ703. To determine the optimal temperature of NagZ703, the reaction was conducted from 30 °C to 85 °C in 50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (pH 6.0). B: Effect of temperature on the stability of NagZ703. The thermal stability of NagZ703 was determined at the indicated temperature in 50 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (pH 6.0) for 10, 20, 30 and 40 min. After pre-incubation, the residual activity of NagZ703 was measured at pH 6.0 and 60 °C. Each value of the assay was the arithmetic mean of triplicate measurements.

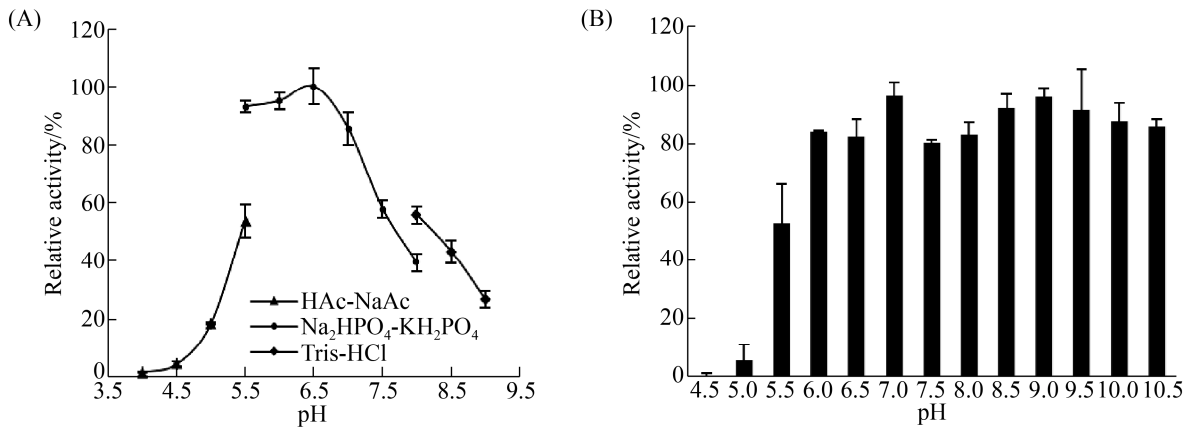


图 4. pH 对 NagZ703 酶活性和稳定性的影响

Figure 4. Effects of pH values on the activity and stability of NagZ703. A: Effects of pH on the activity of NagZ703. The reaction was conducted at 60 °C in different buffers: HAc-NaAc (pH 4.0–5.5), Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 5.0–8.0), Tris-HCl (pH 8.0–9.5). B: Effects of pH on the stability of NagZ703. The stability of NagZ703 was determined at different pH values ranging from 4.0 to 10.5 (pH 4.0–5.5, HAc-NaAc; pH 5.0–8.0, Na₂HPO₄-NaH₂PO₄; pH 8.0–9.0, Tris-HCl; pH 9.5–10.5, Glycine-NaOH) at 4 °C for 12 h. After pre-incubation, the residual activity was measured at pH 6.5 and 60 °C. Each value of the assay was the arithmetic mean of triplicate measurements.

表 3. 金属离子和化学试剂对 NagZ703 活性的影响

Table 3. Effects of metal ions and chemical reagents on the activity of NagZ703

Metal ions or chemical reagents	Concentration/ (mmol/L)	Relative activity/%	Metal ions or chemical reagents	Concentration/ (mmol/L)	Relative activity/%
No addition	0	100±2.16	Ni ²⁺ (Ni ₂ SO ₄)	5	7.06±0.47
Li ⁺ (LiCl)	5	105.13±8.50	Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	5	18.4±3.77
Na ⁺ (NaCl)	5	101.14±2.00	Fe ³⁺ (FeCl ₃)	5	61.08±4.86
K ⁺ (KCl)	5	100.30±3.19	EDTA	5	102.52±11.17
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	5	91.86±0.73	Methanol	5	75.72±3.35
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	5	54.22±0.35	Alcohol	5	73.81±2.84
Mn ²⁺ (Mn ₂ SO ₄)	5	75.76±3.49	Glycerine	5	66.52±2.50
Cu ²⁺ (Cu ₂ SO ₄)	5	9.69±4.72	Formaldehyde	5	4.09±0.22
Co ²⁺ (CoCl ₂)	5	56.03±3.10	DMSO	5	102.94±2.10
Hg ²⁺ (HgCl ₂)	5	0.05±2.2	Acetone	5	82.04±3.64

2.5 NagZ703 水解胶体几丁质产生 GlcNAc

酶解胶体几丁质后,通过 HPLC 分析酶解产物(图 6),以 N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)和 N-N'-乙酰氨基壳二糖(GlcNAc₂)作为标准品(图 6-A),发现酶解有少量的 GlcNAc 产生(图 6-B)。这说明 NagZ703 确实可以从胶体几丁质末端水解其糖苷键,生成单糖;由于 β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶只能

从非还原端逐次切下单糖单元,而且底物的乙酰程度会影响酶反应,因此仅用 β-N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶水解几丁质的水解效率十分低下。

为了提高水解效率,我们先用本实验室表达的几丁质二糖酶 ChiA3 来水解胶体几丁质,然后再加入 NagZ703 继续酶解。HPLC 分析水解产物后发现,几丁质酶可以先将胶体几丁质水解成 GlcNAc₂

(图 6-C), 然后在 NagZ703 的作用下, GlcNAc₂ 逐渐被水解成 GlcNAc 单糖, 随着水解时间增加, 单糖的产量也逐步提高, 1 h 后, 二糖被完全水解成单糖(图 6-D-F), 这表明 NagZ703 的确具有 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性。

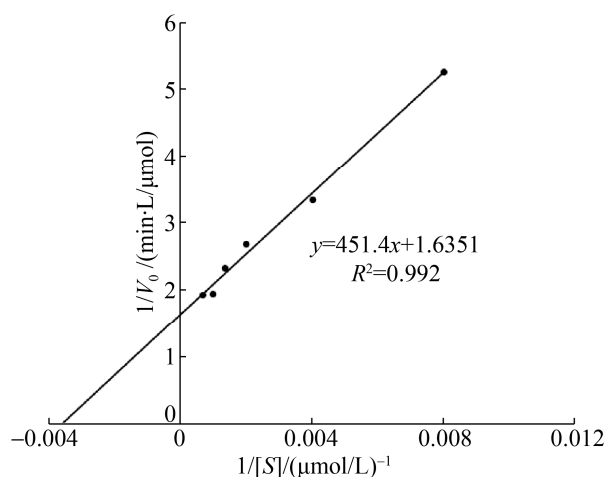


图 5. NagZ703 的酶动力学参数

Figure 5. Kinetic parameters of recombinant NagZ703.

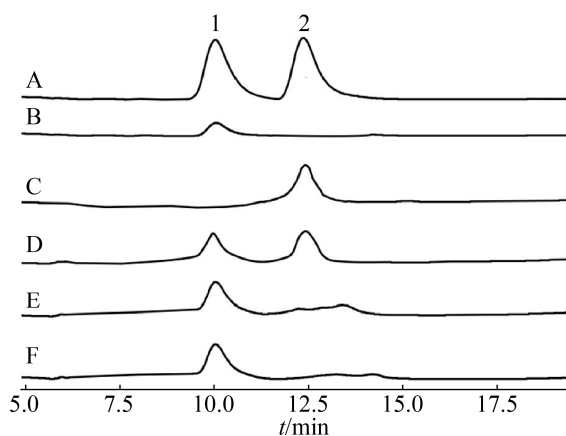


图 6. NagZ703 的水解产物分析

Figure 6. Enzymatic production of GlcNAc by NagZ703. A: Standard of GlcNAc (peak 1) and N, N'-Diacetylchitobiose (peak 2). B: The hydrolysis product of colloidal chitin by recombinant NagZ703. C: The hydrolysis product of colloidal chitin by ChiA3 for 1 h. D-F: The hydrolysis product of colloidal chitin by ChiA3 for 1 h and then recombinant NagZ703 for 20, 40, 60 min.

3 讨论

近些年, 因为能适应特殊环境, 耐盐碱的酶受到了广泛的关注。本实验室从分离得到的一株嗜碱芽孢杆菌 *B. pseudofirmus* 703 中获得了一种碱性淀粉酶 Amy703, 该酶在 pH 9.0 时表现出最佳反应活性^[12], 这个性质使得它在纺织业有良好的应用前景。芽孢杆菌属的细菌能产生多种多糖水解酶, 是否该菌株产生的多糖水解酶都具有耐碱性的特点呢? 我们分析了 NCBI 基因组数据库中公布的 *B. pseudofirmus* OF4 菌株的全基因组序列, 发现了一个假定的 GH3 家族的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的编码基因 *NagZ703*, 其编码的蛋白 NagZ703 与枯草芽孢杆菌来源的 BsNagZ 序列相似性为 37%。GH3 家族的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶有两类, 一类比较小, 只有一个结构域——N 端结构域, 而另一类比较大, 除了 N 端结构域外, 还有一个 C 端结构域, 这两类酶的 N 端结构域均有能识别底物中乙酰氨基基团的保守序列^[11]。利用 BLAST 将该基因编码的蛋白质与已解析过结构的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 BsNagZ 进行氨基酸序列比对, 比对结果显示, 虽然氨基酸序列一致性不高, 但 NagZ703 与 BsNagZ 一样, 有 2 个结构域, 其 N 端有保守的乙酰氨基基团的底物识别序列 KH(F)PG(H)GX(4)D(S)H (图 1), 该序列中精氨酸 D 和组氨酸 H 能组成催化二联体, 而 318 位也存在一个精氨酸 D, 这 3 个氨基酸形成了一个典型的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的“D-H-D”催化活性中心, 这也是 *NagZ703* 被判断为 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶编码基因的依据。因此, 本研究克隆了 *B. pseudofirmus* 703 来源的这个 *NagZ703* 基因, 并在大肠杆菌中实现了可溶性表达 NagZ703。

由于 NagZ703 与枯草芽孢杆菌来源的 BsNagZ

的一致性不高(37%), 而且 *B. pseudofirmus* 703 是一株嗜碱芽孢杆菌, 因此我们系统研究了重组 NagZ703 的酶学特征, 其结果如下。

(1) 纯化的 NagZ703 具有外切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的活性, 能水解 pNP- β -GlcNAc 和胶体几丁质, 水解胶体几丁质后能得到 GlcNAc, 也能将几丁质二糖酶 ChiA3 酶解胶体几丁质后得到的二糖 GlcNAc₂ 水解成单糖。以 pNP- β -GlcNAc 为底物时, 其 K_m 为 0.276 mmol/L, 而 BsNagZ 的 K_m 值为 0.15 mmol/L^[9], 这表明 NagZ703 对 pNP- β -GlcNAc 的亲合性低于 BsNagZ, 这也是 NagZ703 的比酶活比 BsNagZ 低的原因之一。

(2) 与 BsNagZ 一样, NagZ703 在 60 °C 表现出最佳反应活性, 55 °C 保温 20 min 后, 该酶丧失了 50% 的活力, 同样条件下, BsNagZ 还保留了 80% 以上的活力, 因此 NagZ703 的热稳定性不如 BsNagZ。

(3) NagZ703 是一个中性外切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 其最适 pH 为 6.5, 略高于枯草芽孢杆菌的 NagZ (最适 pH 6.0)^[15]。通过 pH 稳定性研究发现, NagZ703 在 pH 6.0–10.5 范围内比较稳定; 而 BsNagZ 则是在 pH 4.0–8.0 范围内比较稳定, 表明 NagZ703 比 BsNagZ 更耐碱。

通过金属离子对酶活性影响的分析, 我们没有发现对酶活性有明显促进作用的金属离子, 因而 NagZ703 与 BsNagZ 一样, 是一个非金属依赖酶, 而 EDTA 对酶活性没有抑制作用, 这进一步证实了该酶的非金属依赖性。几种常见的二价金属离子均对 NagZ703 的活性产生抑制作用, 其中 Hg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 表现出强烈的抑制。5 mmol/L Hg^{2+} 使该酶完全丧失了活性, 5 mmol/L Zn^{2+} 使酶的活性丧失了 80% 以上, 这与 Hg^{2+} 和 Zn^{2+} 对 BsNagZ 的抑制效果是相似的^[16], Kim 等在研究 *Thermotoga*

neapolitana 来源的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 CbsA 时, 发现它也受 $ZnCl_2$ 的强烈抑制^[16]。

通过性质分析, 我们发现嗜碱菌 *B. pseudofirmus* 703 来源的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 NagZ703 与枯草芽孢杆菌来源的 BsNagZ 的性质比较相似, 其最适反应温度是一样的, 热稳定比 BsNagZ 略差一点; 最适 pH 比 BsNagZ 略高一点 (pH 6.5 对 6.0), 它 pH 稳定性范围与 BsNagZ 相比并未扩大, 只是都增加了 2, 向 pH 碱性范围偏移, 这可能是与 *B. pseudofirmus* 703 这个嗜碱芽孢杆菌的生长环境相适应的一个变化; 在 1 mmol/L NaCl 溶液的环境中 NagZ703 的活性也下降了 80%, 没有嗜盐的倾向。为什么 NagZ703 和 BsNagZ 氨基酸序列的一致性这么低, 而且这两个酶的产生菌性质差异这么大, 但它们的酶学性质差异却并不大呢? 我们分析, 微生物产生的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶主要是参与细胞壁的代谢, 它的功能是保守的, 而这两个菌都是芽孢杆菌属, 亲缘关系近, 所以性质比较相似。此外, 本课题组曾从嗜碱菌 *B. pseudofirmus* 703 分离到了一种淀粉酶 Amy703, 它表现出很明显的耐盐嗜碱的特性, 而 NagZ703 虽然耐碱但是并不耐盐。序列分析显示 NagZ703 带有信号肽序列, 与 Amy703 一样, 是分泌蛋白。同样的, BsNagZ 也是分泌蛋白, Litzinger 等^[11] 用实验证实了 BsNagZ 参与细胞壁代谢, 从胞壁肽的非还原端切除 GlcNAc; 而且他们还发现 BsNagZ 从细胞内分泌出去后, 与细胞壁结合在一起。因此我们推测 NagZ703 的作用机理可能与 BsNagZ 相似, 也是在细胞内合成后, 通过分泌通道来到细胞表面, 和胞壁肽结合在一起, 参与细胞壁的主要成分胞壁肽的营救, 并没有在细胞外的盐碱环境下进行酶反应, 所以 NagZ703 是中性酶, 在

中性条件下活性最高。

参考文献

- [1] Patil NS, Waghmare SR, Jadhav JP. Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation. *Process Biochemistry*, 2013, 48(1): 176–183.
- [2] Zhou JP, Song ZF, Zhang R, Chen CH, Wu Q, Li JJ, Tang XH, Xu B, Ding JM, Han NY, Huang ZX. A *Shinella* β -N-acetylglucosaminidase of glycoside hydrolase family 20 displays novel biochemical and molecular characteristics. *Extremophiles*, 2017, 21(4): 699–709.
- [3] Chen JK, Shen CR, Liu CL. N-acetylglucosamine: production and applications. *Marine Drugs*, 2010, 8(9): 2493–2516.
- [4] Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(2): 54–72.
- [5] Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(6): 773–782.
- [6] Cohen-Kupiec R, Chet I. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, 9(3): 270–277.
- [7] Cheng QM, Li HS, Merdek K, Park JT. Molecular characterization of the β -N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and its role in cell wall recycling. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(17): 4836–4840.
- [8] Ortiz JM, Gillespie JB, Berkeley RCW. An exo- β -acetylglucosaminidase from *Bacillus subtilis* B: extraction and purification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 1972, 289(1): 174–186.
- [9] Litzinger S, Duckworth A, Nitzsche K, Risinger C, Wittmann V, Mayer C. Muropeptide rescue in *Bacillus subtilis* involves sequential hydrolysis by β -N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(12): 3132–3143.
- [10] Huang YW, Hu RM, Lin CW, Chung TC, Yang TC. NagZ-dependent and NagZ-independent mechanisms for β -lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(4): 1936–1941.
- [11] Litzinger S, Fischer S, Polzer P, Diederichs K, Welte W, Mayer C. Structural and kinetic analysis of *Bacillus subtilis* N-acetylglucosaminidase reveals a unique Asp-His dyad mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(46): 35675–35684.
- [12] Lu ZH, Tian CG, Li AY, Zhang GM, Ma YH. Identification and characterization of a novel alkaline α -amylase Amy703 belonging to a new clade from *Bacillus pseudofirmus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(5): 783–793.
- [13] Yem DW, Wu HC. Purification and properties of β -N-acetylglucosaminidase from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1976, 125(1): 324–331.
- [14] Chen JK, Shen CR, Yeh CH, Fang BS, Huang TL, Liu CL. N-acetyl glucose mine obtained from chitin by chitin degrading factors in *Chitinbacter tainanesis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(2): 1187–1195.
- [15] Berkeley RCW, Brewer SJ, Ortiz JM, Gillespie JB. An exo- β -N-acetylglucosaminidase from *Bacillus subtilis* B; characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 1973, 309(1): 157–168.
- [16] Kim JS, Yoon BY, Ahn J, Cha J, Ha NC. Crystal structure of β -N-acetylglucosaminidase CbsA from *Thermotoga neapolitana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 464(3): 869–874.

A new N-acetylglucosaminidase from facultative alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* 703

Shun Jiang, Shaohua Hao, La Xiang, Li Song, Yuling Zhou, Sijing Jiang*,
Guimin Zhang*

State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei Province, China

Abstract: β -N-acetylglucosaminidases (NAGases) participate in the removal of N-acetylglucosamine (GlcNAc) from the non-reducing end of peptidoglycan or chitin, and are important for many biological functions and industrial applications. **[Objective]** A new NAGase encoding gene *NagZ703* was cloned from a facultative alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* and expressed in *Escherichia coli*, for the enzymatic production of GlcNAc. **[Methods]** The gene *NagZ703* was cloned into the expression vector pET28a to get the recombinant plasmid pET28a-*NagZ703*. The recombinant NagZ703 was induced for expression in *E. coli* BL21 (DE3) and purified through His-Trap column. Then the purified NagZ703 was characterized. **[Results]** The multiple sequence alignments showed that NagZ703 belonged to GH 3 NAGase with 2 domains, and the catalytic active sites were composed of 3 conserved residues (Arg232, His234 and Arg318) at the N-terminal domain. NagZ703 shared only 37% identity with the most studied BsNagZ from *B. subtilis*. The purified NagZ703 exhibited optimal activity at 60 °C and pH 6.5, the specific activity was 10.79 U/mg, and the K_m and V_{max} of NagZ703 were 0.276 mmol/L and 0.612 mmol/(mg·min) toward p-nitrophenyl β -N-acetylglucosaminide, respectively. NagZ703 retained more than 80% residual activity after pre-incubation at 50 °C for 30 min, or at pH 6.0–10.5 for 12 h. NagZ703 was a non-metalloenzyme because EDTA could not affect its activity, whereas Hg^{2+} completely inhibited its activity. NagZ703 hydrolyzed colloidal chitin to produce GlcNAc *in vitro*. **[Conclusion]** A NAGase NagZ703 from facultative alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* was characterized carefully. The ability of NagZ703 to produce GlcNAc from colloidal chitin provided a promising approach for the production of GlcNAc by enzymatic hydrolysis.

Keywords: β -N-acetylglucosaminidases, multiple sequence alignment, heterologous expression, enzymatic assay, GlcNAc

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key R & D Program (2017YFD0501506), by the Technical Innovation Program of Hubei Province (2018ABA113) and by the 2016 Wuhan Yellow Crane Talents (Science) Program

*Corresponding authors. Sijing Jiang, Tel: +86-27-88663882, E-mail: jiangsijing@hubu.edu.cn; Guimin Zhang, Tel: +86-27-88663882, E-mail: zhangguimin@hubu.edu.cn, zhangguimin6@hotmail.com

Received: 9 March 2019; Revised: 13 May 2019; Published online: 17 October 2019