

• 工业生物技术 •

凝结芽孢杆菌耐热 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶在大肠杆菌的分泌表达及其在制备 GlcNAc 中的应用

李丛娜, 姜顺, 杜超, 周玉玲, 蒋思婧, 张桂敏

湖北大学 生命科学学院 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

李丛娜, 姜顺, 杜超, 等. 凝结芽孢杆菌耐热 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶在大肠杆菌的分泌表达及其在制备 GlcNAc 中的应用. 生物工程学报, 2021, 37(1): 218-227.

Li CN, Jiang S, Du C, et al. Expression and characterization of β -N-acetylglucosaminidases from *Bacillus coagulans* DSM1 for N-acetyl- β -D glucosamine production. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 218-227.

摘要: β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 可作用于几丁质或壳聚糖等天然底物, 从末端水解产生 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖 (GlcNAc) 单体, 其在医药和农业领域有较广泛的用途。文中克隆了耐热菌凝结芽孢杆菌 *Bacillus coagulans* DMS1 的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶基因 (*BcNagZ*), 并成功在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 进行了分泌表达, 蛋白表达量达到 0.76 mg/mL。纯化后的 *BcNagZ* 分子量为 61.3 kDa, 测得的比活力为 5.918 U/mg; 进一步对该酶进行表征, 结果显示酶的最适反应 pH 为 5.5, 最适反应温度为 75 °C, 在 65 °C 处理 30 min 后还有 85% 的残余酶活力, 表明该酶具有良好的热稳定性。该酶的米氏常数 K_m 为 0.23 mmol/L, V_{max} 为 0.043 1 mmol/(L·min)。重组 *BcNagZ* 可以水解胶体几丁质得到微量的 GlcNAc, 可以将二糖水解为单糖; 偶联已报道的外切几丁质酶 AMCase, 可以有效地将胶体几丁质水解为 GlcNAc, 得率达到 86.93%。

关键词: β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 分泌表达, 重组酶学性质, N-乙酰氨基葡萄糖

Received: April 7, 2020; **Accepted:** June 3, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0901102), Sub-project of Hubei Province Technology Innovation Special Major Project (No. 2018ABA113), 2016 Wuhan Yellow Crane Talent Project.

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

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0901102), 湖北省技术创新专项重大项目子课题 (No. 2018ABA113), 2016 武汉黄鹤英才人才项目资助。

网络出版时间: 2020-09-03

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200902.1000.001.html>

Expression and characterization of β -N-acetylglucosaminidases from *Bacillus coagulans* DSM1 for N-acetyl- β -D glucosamine production

Congna Li, Shun Jiang, Chao Du, Yuling Zhou, Sijing Jiang, and 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, China

Abstract: β -N-acetylglucosaminidases (NAGases) can convert natural substrates such as chitin or chitosan to N-acetyl- β -D glucosamine (GlcNAc) monomer that is widely used in medicine and agriculture. In this study, the *BcNagZ* gene from *Bacillus coagulans* DSM1 was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant protein was secreted into the fermentation supernatant and the expression amount reached 0.76 mg/mL. The molecular mass of purified enzyme was 61.3 kDa, and the specific activity was 5.918 U/mg. The optimal temperature and pH of the *BcNagZ* were 75 °C and 5.5, respectively, and remained more than 85% residual activity after 30 min at 65 °C. The Michaelis constant K_m was 0.23 mmol/L and the V_{max} was 0.043 1 mmol/(L·min). The recombinant *BcNagZ* could hydrolyze colloidal chitin to obtain trace amounts of GlcNAc, and hydrolyze disaccharides to monosaccharide. Combining with the reported exochitinase AMcase, *BcNagZ* could produce GlcNAc from hydrolysis of colloidal chitin with a yield over 86.93%.

Keywords: β -N-acetylglucosaminidases, heterologous expression, enzymatic properties, GlcNAc

N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖 (GlcNAc) 是细菌细胞壁肽聚糖的结构元件, 是虾壳蟹壳、大多数真菌细胞壁的主要成分^[1-3], 具有保护软骨组织及骨关节的作用, 在治疗关节和肠道炎症等方面表现出显著的效果^[4]; GlcNAc 可以帮助透明质酸的合成和胶原蛋白的表达, 改善皮肤皱纹和色素沉积, 可以添加在护肤品中, 因而它在化妆品领域也有广泛的应用^[5]。生产 GlcNAc 的方法主要有 3 种, 即微生物发酵法、酸水解法及酶解法。如 Li 等^[6]从中国台湾土壤样品中分离到一株气单胞菌 DYU-BT4, 以几丁质颗粒为底物进行发酵实验, 最终培养基中 GlcNAc 的浓度为 0.88 g/L。而酸水解法, 主要是通过强酸水解几丁质生产 GlcNAc 单体, 但该方法会产生大量废水, 副产物多且设备损耗严重。对于酶法制备 GlcNAc, 由于酶水解反应专一性强、条件温和, 因而具有产物纯度高、得率高、分离纯化容易和环境友好等优点, 是 GlcNAc 产业发展的技术方向。

几丁质酶包括内切几丁质酶、外切几丁质酶和 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶 (NAGases, EC

3.2.1.30), 广泛存在于微生物、甲壳动物和某些植物中。其中 NAGases 能特异催化水解 β -1,4-糖苷键, 从壳二糖及其聚合物和衍生物等的末端水解产生 N-乙酰氨基葡萄糖^[7]。NAGases 虽然能将几丁质直接水解为 GlcNAc, 但是由于其外切的水解机制和低酶活力, 其水解效率很低。因此要实现几丁质到 GlcNAc 的高效转化, 需要 NAGases 与其他酶的协同作用: 如与内切几丁质酶协同作用, 几丁质在内切几丁质酶的作用下变成几丁寡糖, 随后被 NAGases 水解成 GlcNAc; 或者在外切几丁质酶将几丁质水解为几丁二糖的基础上, NAGases 进一步将几丁二糖水解为 GlcNAc。目前内切几丁质酶和外切几丁质酶的研究工作非常成熟, 已有商品化的内切几丁质酶和外切几丁质酶, 但是 NAGases 的活性均不高, 这限制了酶法制备 GlcNAc 的工业化应用。

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/>), 多个 NAGases 的酶学性质和结构被解析^[8-9], 其中, GH 3 家族的 NAGases 成员最多,

特别是来自枯草芽孢杆菌的 BsNagZ, 其酶学性质和结构都得到了解析, 并鉴定了其催化活性位点^[10]。我们前期通过密码子优化及多拷贝构建, 首次在毕赤酵母中实现了 BsNagZ 的表达^[11], 但是 BsNagZ 的活性不高、稳定性不好, 因此需要挖掘新的 NAGases 资源, 获得稳定性更好的 NAGases。凝结芽孢杆菌 *Bacillus coagulans* 是美国 FDA 批准可以用于饲料的安全菌株, 由于能生成芽孢, 除具有一般乳酸菌的有益性质外, 凝结芽孢杆菌可在 30–65 °C 生长, 所产芽孢耐 90 °C 高温, 因此具有较好的耐热性。从 *B. coagulans* DSM 1 菌株的全基因组数据库中, 我们找到了一个基因功能注释为 GH 3 家族的 *N*-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶 BcNagZ, 与 BsNagZ 的同源性只有 32.3%。本研究以 *B. coagulans* DSM1 的全基因组作为模板, 通过 PCR 反应得到 BcNagZ, 将其转入大肠杆菌中, 实现了 BcNagZ 的分泌表达, 并对该酶进行了表征和水解几丁质制备 GlcNAc 的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* XL10-Gold 克隆菌株和 *E. coli* BL21(DE3) 表达菌株购自 Transgene 公司; pET-26b 质粒购自 Stratagene 公司。

Pfu DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Bam*H I 和 *Not* I 酶购自 TaKaRa 公司; Yeast Extract、Tryptone、pNP- β -GlcNAc、IPTG 和 Tris 试剂购自 Sigma 公司, SDS-PAGE 检测试剂、质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、卡那霉素以及其他常规试剂和药品购自国药集团。

1.2 氨基酸序列分析与蛋白结构模拟分析

用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析 BcNagZ 有无信号肽序列。通过 ClustalX 进行氨基酸多序列比对分析, 并用 ESPript 分析蛋白的氨基酸保守区域。

1.3 重组表达质粒构建

以 *B. coagulans* DSM1 的基因组 DNA 为模板, 以 BcNagZ-F (5'-TCGAGCTCCAAACAGGATGGGCATTGGAGAACAA-3') 和 BcNagZ-R (5'-GTGCGGCCGCGTAATGAAGACCGTGGCCGAACG-3') 为引物 (引物序列中下划线碱基表示限制性内切酶酶切位点), PCR 扩增目的基因 BcNagZ。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 终延伸 72 °C 5 min。PCR 产物用 DNA 凝胶回收试剂盒回收后, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切, 并与经同样酶切的 pET-26b 载体在 T4 DNA 连接酶的介导下连接, 连接产物转化 *E. coli* XL100-Gold, 涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上培养; 经菌落 PCR 和提取质粒酶切分析, 筛选得到重组质粒, 测序验证正确。

1.4 BcNagZ 在大肠杆菌中的表达与纯化

将重组表达质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 得到了表达菌株。将该菌株单菌落接种于 5 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 然后按 1% 的接种量转接到 25 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素的 TB 培养基中, 相同条件下培养, 培养至 OD_{600} 达到 2.2 时, 加入 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L), 28 °C 继续培养 30 h 后, 4 °C 离心收集发酵上清液。将发酵上清液加入到用溶液 A (25 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.0) 预先平衡的 5 mL HisTrap 中, 随后用含 10 mmol/L 咪唑的溶液 A 洗脱, 最后用 500 mmol/L 的溶液 A 将目的蛋白洗脱下来。洗脱下来的蛋白用 Amicon Ultracentricon 超滤浓缩, 然后用脱盐柱 (琼葡糖凝胶 G25 FF) 经 AKATA 进行脱盐, 去除咪唑。纯化后的 BcNagZ 用于酶学性质分析和几丁质降解研究。

1.5 BcNagZ 的性质分析

酶活力测定方法: 以 4-硝基-*N*-乙酰- β -D 氨基葡萄糖 (pNP- β -GlcNAc) 为底物测定酶活力, 取

10 μL 稀释的酶液, 加入 90 μL 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 pNP- β -GlcNAc 底物, 在合适的条件下反应 10 min, 然后加入 200 μL 0.2 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 在 405 nm 处检测反应物的吸光度。酶活力单位 (U) 定义为: 在适宜条件下, 每分钟水解底物产生 1 μmol 的 pNP 所需的酶量。

最适反应温度的测定: 在 30–100 $^{\circ}\text{C}$ 间选择了 15 个不同的温度, 在 pH 5.5 条件下测定酶的活力。

热稳定性的测定: 将纯化的酶液分别置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 、75 $^{\circ}\text{C}$, 分别孵育 10、20、30 min, 立即置于冰水混合物中, 在最适条件下测定残余的酶活力, 以未经热处理的酶活力作为 100% 对照。

最适 pH 的测定: 选择 4.0–8.0 之间 9 个不同的 pH (100 mmol/L 的磷酸盐缓冲液, pH 4.0–8.0), 在 75 $^{\circ}\text{C}$ 测定酶活力。

pH 稳定性测定: 先将酶液分别用不同 pH 的缓冲液稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 12 h, 然后在 75 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.5 条件下测定残余的酶活力, 以未经不同 pH 条件下处理的酶液为 100% 对照。

金属离子对酶活性的影响: 在酶解反应体系中分别加入 5 mmol/L 不同的金属离子溶液, 在最适反应条件下测定 NagZ 的酶活力, 以不加金属离子测得的酶活力为 100% 对照。

动力学参数测定: 以浓度分别为 1、2、3、4、5、6、7、8 mmol/L 的 pNP- β -GlcNA 为底物, 在 75 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.5 条件下反应, 利用酶标仪记录 OD_{405} 处吸光值, 绘制曲线, 计算出每个底物浓度对应的酶反应初速度, 然后用双倒数法作图, 计算动力学参数。

1.6 GlcNAc 标准曲线绘制

用 HPLC 法绘制 GlcNAc 浓度的标准曲线。用去离子水配制 0、100、200、300、400、500 $\mu\text{g/mL}$ 的 GlcNAc 标准品溶液。取 20 μL 过滤液进行 HPLC (安捷伦高效液相色谱站) 检测, 检测流动相为 70% 乙腈 (乙腈: 水=70:30, V/V), 检测流速为 1 mL/min, 检测温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为

190 nm。记录标准品的浓度和对应的峰面积, 作出标准品的浓度和峰面积的标准曲线。

1.7 水解产物检测及 GlcNAc 得率计算

参照 Hsu 等^[12]制备胶体几丁质的方法, 制备胶体几丁质底物。在 350 μL 酶解体系中, 加入 300 μL 5% 的胶体几丁质底物和 50 μL 纯化的 BcNagZ 酶液 (10 U/mL), 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.5 条件下水解 2 h。在联合酶解时, 在 10 mL 酶解体系中, 加入 8 mL 5% 的胶体几丁质底物和 2 mL AMcase (0.252 U/mL), 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 2.0 条件下水解 2 h, 水解完成后, 100 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 10 min, 并调节 pH 至 5.5, 取 300 μL 水解产物, 加入 BcNagZ 50 μL (10 U/mL) 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 继续水解 10、20、30 min。样品在 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 后经高速离心, 上清用 0.45 μm 滤膜过滤, 取 20 μL 过滤液进行 HPLC 检测, 分析水解产物。

GlcNAc 得率计算: 酶解完成后, HPLC 检测水解产物, 并通过标准曲线计算得出水解产物中 GlcNAc 的浓度, 从而计算出水解体系总生成的 GlcNAc 的质量。再采用干燥法计算 5% 胶体几丁质底物中几丁质的总含量, 具体操作是取 1 mL 5% 胶体几丁质, 烘干后称取固体的质量即为几丁质的质量。最后将生成 GlcNAc 的质量除以所用几丁质的质量乘百分之百就得到 GlcNAc 的得率。

2 结果与分析

2.1 NagZ 保守结构域和催化活性中心的分析

BcNagZ 基因由 1 686 bp 组成, 编码 561 个氨基酸; BcNagZ 计算分子量是 61.3 kDa, 等电点为 9.02。SignalP 4.1 Server 分析显示 BcNagZ N 端有 28 个氨基酸的信号肽序列。以去掉 N 端信号肽的 BcNagZ 氨基酸序列进行 Blast 比对, 发现其与已经报道的来源于嗜热链霉菌 *Streptomyces thermoviolaceus* 的 NagA (GenBank 登录号: AB0087771.1)、短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* 的 BpNagZ (GenBank 登录号: MK559425)、枯草芽孢

杆菌 *Bacillus subtilis* 168 的 BsNagZ (GenBank 登录号: CAB11942.1)、假坚强芽孢杆菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 的 NagZ703 (GenBank 登录号: ADC51622.1) 和交替单胞菌属 *Alteromonas* sp. strain O-7 的 Cht 60 (GenBank 登录号: D17399.1) 氨基酸序列同源性分别为 43.32%、34.96%、32.3%、30.24% 和 29.95%。将 BcNagZ 与这 5 个

酶进行多序列氨基酸同源比对, 发现该蛋白有 NAGases 特有的高度保守的 N 端序列 KH(F/I)PG(H/L)GX(4)D(S/T)H, 这是 NAGases 识别底物中乙酰氨基基团的特征序列, 其中第 225 位的天冬氨酸 (D) 与第 227 位的组氨酸 (H) 构成催化二联体, 与后面 300 位天冬氨酸 (D) 构成酶的催化活性中心 (图 1)。

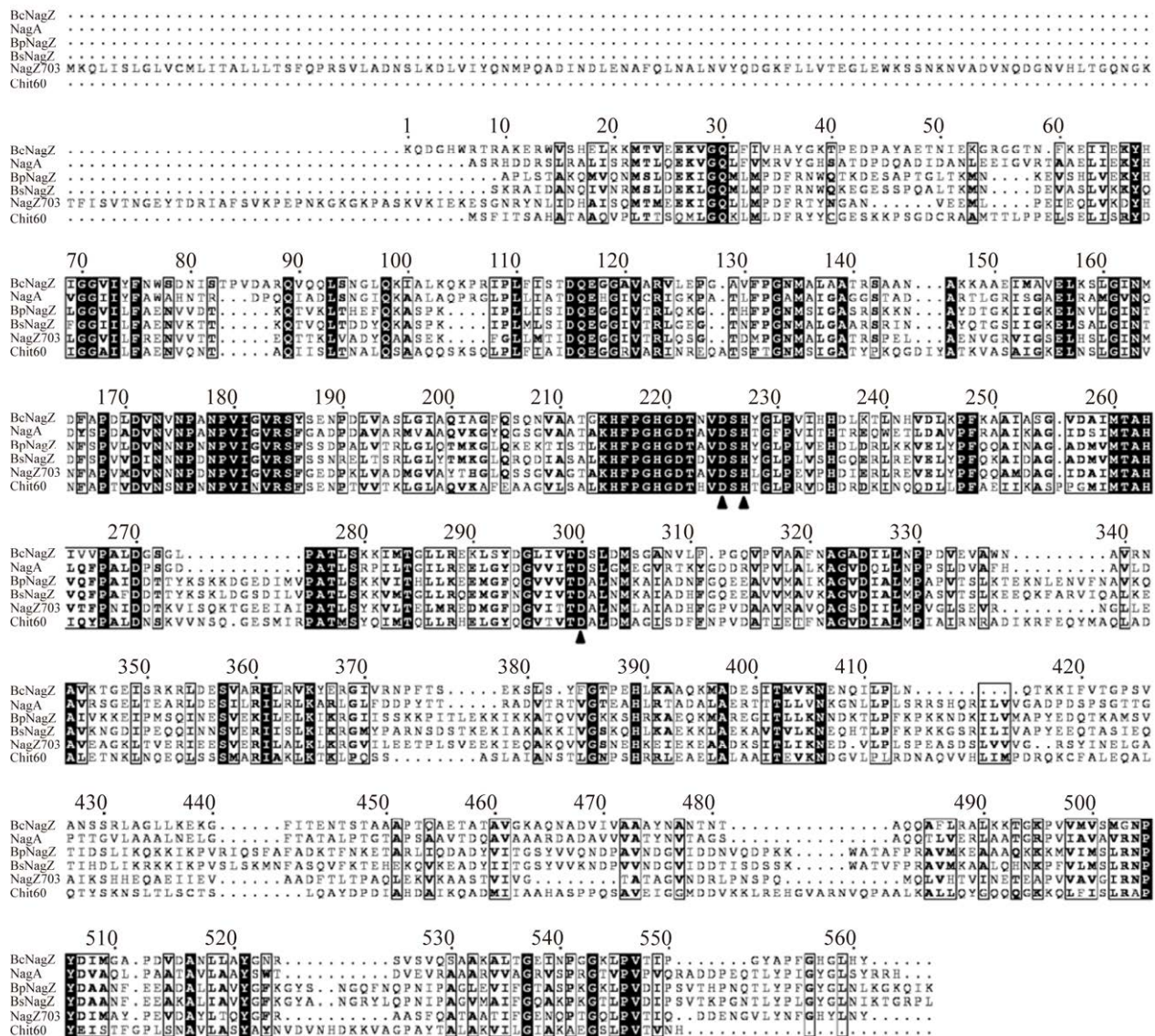


图 1 BcNagZ 与 GH3 家族的 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶的氨基酸序列比对分析

Fig. 1 Multiple sequences alignments of BcNagZ with GH 3 NAGases. Strictly conserved residues are indicated in white letters on a black background, and conservatively substituted residues are boxed. The highly conserved sequence segment KH(F/I)PG(H/L)GX(4)D(S/T)H are shown in black boxes. The catalytic active sites (D225, H227, D300) are indicated by black solid triangle.

2.2 BcNagZ 在大肠杆菌中的分泌表达及纯化

将构建好的重组质粒 pET-26b-BcNagZ 转入 *E. coli* BL21(DE3) 中, 挑取正确的转化子 BL21(DE3)-pET-26b-BcNagZ 进行摇瓶诱导发酵, 加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG, 于 28 °C 诱导 30 h 后, 取发酵上清液, 进行酶活性测定和蛋白质纯化。SDS-PAGE 分析显示发酵上清中有一条明显的 61.3 kDa 大小的蛋白带, 与 BcNagZ 计算分子量的大小一致, 重组 BcNagZ 的表达量达到了 0.76 mg/mL, 占发酵上清总蛋白的 65.8%, 但是, 约有 50% 的 BcNagZ 仍滞留在细胞内 (图 2)。将重组 BcNagZ 进行纯化, 其比活力达 5.918 U/mg (表 1)。

2.3 BcNagZ 的酶学性质分析

2.3.1 温度对 BcNagZ 活性及稳定性的影响

在 pH 5.5 (50 mmol/L 磷酸钠缓冲液) 条件下测定最适温度, 结果显示 BcNagZ 的最适温度为 75 °C, 在 60–80 °C 之间有 60% 以上的相对活性。但是 BcNagZ 在 75 °C 的热稳定性不好, 75 °C 处理 10 min 后, 只有 10% 的残余酶活力; 在 70 °C、65 °C 下孵育 30 min, 分别还有 60% 和 85% 的残余酶活力 (图 3); 60 °C 孵育 30 min, 还有 90% 以上的残余酶活力, 延长至 1 h, 酶的活性依旧保持 90% 以上 (数据未显示)。

表 1 BcNagZ 蛋白纯化表

Table 1 Purification of BcNagZ

Purification	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (-fold)
Crude enzyme	164	323	1.953	1
Ni-column	37.40	212.77	5.689	2.913
Desalting column	11.94	70.66	5.918	3.030

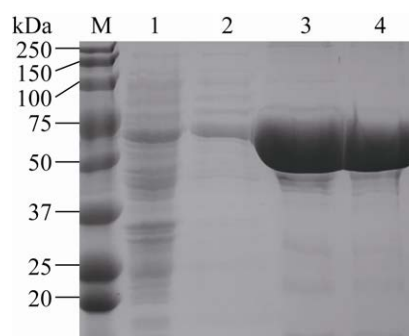


图 2 表达和纯化的 BcNagZ 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the BcNagZ after fermentation and purification. M: prestained protein ladder (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25 and 20 kDa); 1: the lysis supernatant of induced *E. coli* BL21(DE3)/pET-26b-BcNagZ cells; 2: fermentation supernatant of induced *E. coli* BL21(DE3)/pET-26b-BcNagZ cells; 3: BcNagZ after purification via Ni-NTA affinity column; 4: BcNagZ after purification through desalting column.

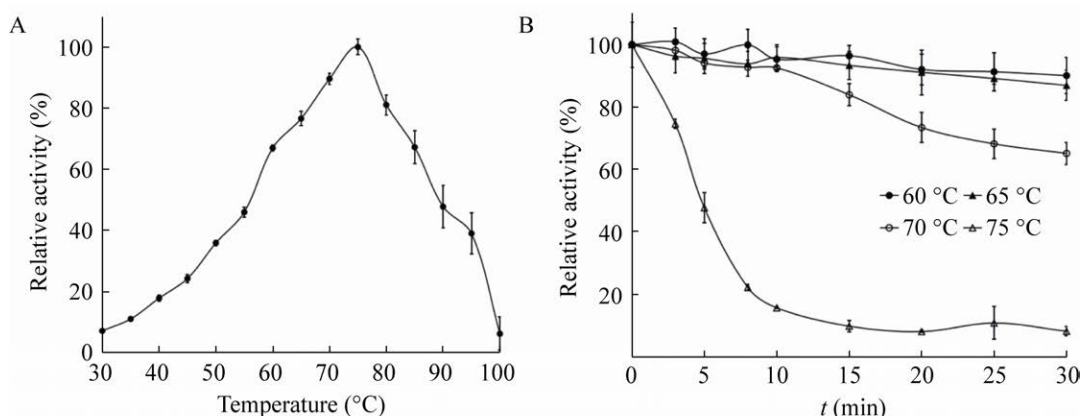


图 3 反应温度对 BcNagZ 酶活性 (A) 和稳定性 (B) 的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the activity (A) and stability (B) of BcNagZ.

2.3.2 pH 对 BcNagZ 活性及稳定性的影响

在最适温度 75 °C 条件下测定 BcNagZ 的最适反应 pH, 表明 BcNagZ 的最适 pH 为 5.5, 在 pH 5.0–7.0 之间有 60% 以上的相对活性。BcNagZ 在 pH 4.5–6.5 范围内保持稳定, 维持 70% 以上的残余活力, 而在 pH 7.5–8.0 条件下, BcNagZ 只有 40% 的残余酶活力。这说明 BcNagZ 在弱酸性的环境下更稳定 (图 4)。

2.3.3 金属离子对重组酶活性的影响

在酶反应体系中, 加入不同的金属离子, 在 pH 5.5、75 °C 条件下反应 10 min, 同时以不加金属离子的反应组作为对照, 测定不同金属离子对 BcNagZ 活性的影响。研究表明, 5 mmol/L 的 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 几乎完全抑制了 BcNagZ 的活性, Co^{2+} 对

BcNagZ 酶活力也有很强的抑制作用, 而其他离子的影响较小。5 mmol/L 的 EDTA 对酶活力几乎没有影响, 说明 BcNagZ 不是金属依赖性酶。有机试剂甲醛也使 BcNagZ 几乎完全丧失酶活力, 醇对酶活力也有一定的抑制作用 (表 2)。

控制 pNP- β -GlcNAc 底物浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8 mmol/L, 得到不同底物浓度下酶促反应的初速度, 采用双倒数法, 计算得到 K_m 和 V_{max} 的值分别为 0.23 mmol/L 和 0.043 1 mmol/(L·min)。

2.4 BcNagZ 水解胶体几丁质产生 GlcNAc

虽然 BcNagZ 的最佳反应温度为 75 °C, 但是在 75 °C 孵育 10 min 后, 该酶的酶活力下降了 83.5%; 在 60 °C 时, 该酶有 90% 以上的相对活性, 并且处理 30 min 还保持稳定 (图 3), 因此我们选

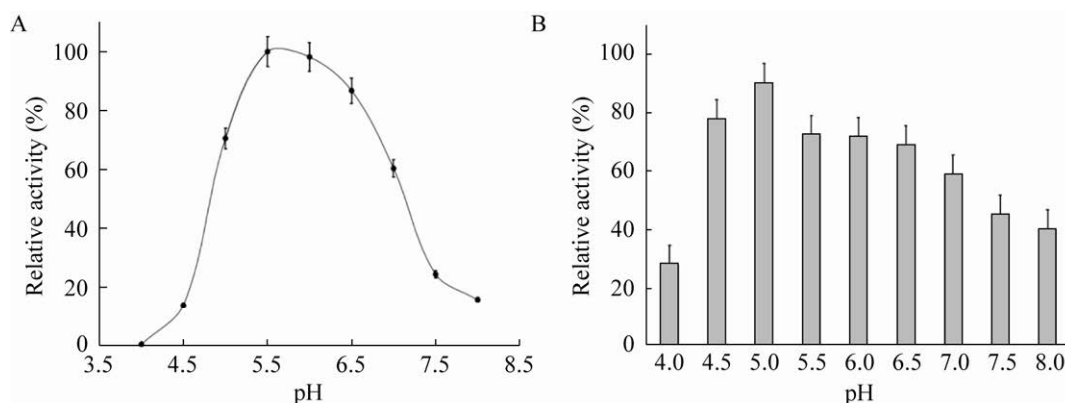


图 4 pH 对 BcNagZ 酶活性 (A) 和稳定性 (B) 的影响
Fig. 4 Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of BcNagZ.

表 2 金属离子和化学试剂对 BcNagZ 活性的影响

Table 2 Effect of metal ions and chemical reagents on BcNagZ activity

Metal ions or chemical reagents	Concentration (mmol/L)	Relative enzyme activity (%)	Metal ions or chemical reagents	Concentration	Relative enzyme activity (%)
Control	0	100.00±1.54	Co^{2+} (CoCl_2)	5 mmol/L	34.80±10.54
Li^+ (LiCl)	5	94.20±1.52	EDTA	5 mmol/L	95.89±4.63
K^+ (KCl)	5	91.26±2.90	Methanol	5%	79.98±0.19
Na^+ (NaCl)	5	92.29±1.58	Alcohol	5%	59.68±3.81
Mg^{2+} (MgCl_2)	5	102.15±0.92	Isopropanol	5%	60.88±1.27
Mn^{2+} (MnCl_2)	5	93.52±2.31	Glycerol	5%	102.33±2.13
Ca^{2+} (CaCl_2)	5	94.62±0.18	Formaldehyde	5%	7.14±0.04
Cu^{2+} (CuCl_2)	5	2.88±0.91	DSMO	5%	106.66±1.08
Hg^{2+} (HgCl_2)	5	1.06±0.56			

择在 60 °C 进行水解反应。以 *N*-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 和 *N,N'*-乙酰氨基壳二糖 (GlcNAc) 作为标准品 (图 5A), 通过 HPLC 分析 BcNagZ 单独水解胶体几丁质的酶解产物, 发现有少量的 GlcNAc 单糖产生 (图 5B), 这说明 BcNagZ 确实具有外切乙酰氨基葡萄糖苷酶的活性, 可以从胶体几丁质末端逐个水解产生 GlcNAc 单体。为了提高 BcNagZ 的水解效率, 我们将胶体几丁质先用外切几丁质酶 AMcase^[10] 处理 2 h, 通过 HPLC 检测发现胶体几丁质大部分都转化为二糖 (图 5C), 随后加入 BcNagZ 继续水解, 在 30 min 内, 二糖被迅速转化为单糖 (图 5D-F)。根据单糖浓度和峰面积的标准曲线, 计算得到单糖的得率为 86.93%。

3 讨论

本研究从凝结芽孢杆菌 *B. coagulans* DSM1 中克隆得到一个新的 NAGase 基因 *BcNagZ*, 并在

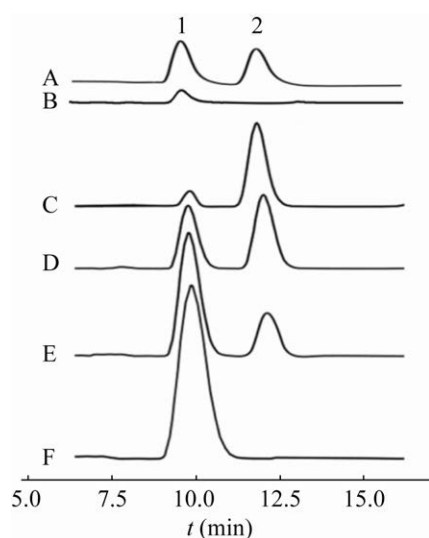


图 5 BcNagZ 的水解产物分析

Fig. 5 Enzymatic production of GlcNAc by BcNagZ. A: standard of GlcNAc (peak 1) and *N,N'*-diacetylchitobiose (peak 2). B: the hydrolysis product of colloidal chitin by recombinant BcNagZ for 2 h at 60 °C. C: the hydrolysis product of colloidal chitin by AMcase for 2 h. D-F: the hydrolysis product of colloidal chitin by AMcase for 2 h at 55 °C and then recombinant BcNagZ for 10, 20, 30 min at 60 °C.

大肠杆菌表达系统中实现了分泌表达, 在此之前, 异源表达 NAGases 的宿主虽然主要也是大肠杆菌^[8,13], 但都是在细胞内表达的^[14-15], 纯化蛋白时需要裂解细胞, 这增加了纯化的步骤, 不利于酶的工业应用。在本研究中, 我们将 *BcNagZ* 基因构建到 pET-26b 载体上, 利用载体的 *pelB* 信号肽将蛋白带到周质空间, 并且通过延长诱导时间, 使约一半的 *BcNagZ* 分泌至胞外。通过 SDS-PAGE 发现上清中有些许杂蛋白, 而 *BcNagZ* 占上清蛋白总量的 65.8% 左右, 这可能是因为诱导时间增加, 同时 *BcNagZ* 对细胞壁也有水解能力导致的。虽然 Jiang 等^[11] 利用毕赤酵母也实现了 *BsNagZ* 的分泌表达, 但是酵母培养周期长。与酵母表达系统相比, 大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚、繁殖快、成本低、表达量高、表达产物容易纯化、稳定性好、抗污染能力强以及适用范围广等优点^[16]。因此本研究工作在大肠杆菌中实现了 *BcNagZ* 蛋白的分泌表达, 不仅缩短了表达周期, 同时也大大简化了蛋白纯化的工艺。

重组 *BcNagZ* 的最适 pH 为 5.5, 最适温度为 75 °C, 属于高温酶。到目前为止, 只有少数 NAGases 报道在 60 °C 及以上有较高的酶活力, 如来源于 *B. subtilis* 的 *BsNagZ*^[11]、*B. pumilus* 的 *BpNagZ*^[8]、新阿波罗栖热袍菌 *Thermotoga neapolitana* 的 *CbsA*^[9]、嗜热共生小杆菌 *Symbiobacterium thermophilum* 的 *NahA*^[17] 和海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 的 *NagA*^[18]。其中, *BpNagZ* 的热稳定性最好, 其在 70 °C 孵育 30 min 后, 还有 40% 的残余酶活力。而 *BcNagZ* 在 70 °C 孵育 30 min 后, 还有 60% 的残余酶活力。因此, *BcNagZ* 是目前报道的在 70 °C 热稳定性最好的 NAGase。有报道称脯氨酸和缬氨酸可以通过减少蛋白去折叠时的骨架熵和增强蛋白间的疏水相互作用来增加蛋白质的热稳定性^[19]。在 Du 等^[8] 的研究中通过定点突变, 也证明了脯氨酸对 *BpNagZ* 热稳定性的影响; Suzuki 等也提出了一个脯氨酸

影响热稳定性的规律,即球状蛋白质的热稳定性可以通过增加 β -turns第二个转角、 α -helix第一个转角或位于蛋白质线圈区的脯氨酸残基含量来提高^[20]。我们比较 BcNagZ 和 BpNagZ 中这两种氨基酸含量时发现, BcNagZ 的脯氨酸和缬氨酸的含量分别为 5.88% 和 8.38%, 而 BpNagZ 的脯氨酸和缬氨酸含量分别为 5.38% 和 7.99%, 这可能是 BcNagZ 比 BpNagZ 热稳定性好的原因之一。

动力学数据显示 BcNagZ 的 K_m 和 k_{cat} 的值分别为 230 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.091 s^{-1} , 比 BpNagZ^[8] (90.74 $\mu\text{mol/L}$) 的 K_m 值高, 但是比其他的 NAGases 如 NagZ703 (276 $\mu\text{mol/L}$)^[21] 和 rNag3HWLB1 (1 120 $\mu\text{mol/L}$)^[22] 的 K_m 值都低, 说明 BcNagZ 对 4-NPGlcNAc 的亲合力比大多数 NAGases 蛋白都高。目前已经报道的 GH3 家族的 NAGases 的比酶活最高的是来自海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* 的 NagA^[18], 有 64.4 U/mg, 但是 K_m 达到 425 $\mu\text{mol/L}$, V_{max} 为 0.025 mmol/(L·min)。而本研究的 BcNagZ 的比酶活虽然只有 5.918 U/mg, 但是 K_m 比 NagA 低, V_{max} 比 NagA 高, 这说明 BcNagZ 的催化能力很有可能比 NagA 高, 而比酶活比 NagA 低很可能是由于不同实验室在酶活测定中的误差。但是和本实验室发表的另外 3 个芽孢杆菌属来源的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶相比, BcNagZ 的酶活力是最低的, 推测可能是由于 BcNagZ 的热稳定性高, 导致酶的灵活性不足, 从而影响了酶的催化活性。

几丁质是一种结构很稳定的大分子多糖聚合物, β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的作用特点决定了它对几丁质的水解效率十分低下, 因此需要几丁质酶的帮助^[23]。Fu 等报道了将几丁质酶 C 与 N-乙酰己糖胺酶一起水解几丁质, 反应 24 h 后, 得到了 27.8 mg/mL 的 GlcNAc, 其转化率为 92.6%^[24]。Zhou 等将几丁质酶 CtnSg 和 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 rNag3HWLB1 一起使用, 与单独添加酶相比, 胶体几丁质的水解效率增加了 3.74 倍^[22]。同样,

Wang 等将几丁质酶 BsChi 与 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 Of Hex1 联合水解 10 g 预先处理过的蟹壳 12 h 后, 得到 1.63 g 纯度为 95% 的 GlcNAc, 并假定蟹壳中几丁质的含量为 26.6%, 计算出得率大约为 60%^[25]。在本研究中, 我们尝试将几丁质酶与 BcNagZ 协同作用来水解几丁质, 首先利用本实验室在 *P. pastoris* 中表达的几丁质二糖酶 AMCase (未发表) 水解胶体几丁质, 2 h 可以将胶体几丁质几乎完全水解为 (GlcNAc)₂; 然后加入 BcNagZ 继续反应, 30 min 即可将 (GlcNAc)₂ 完全水解成 GlcNAc; 通过计算, GlcNAc 得率可达 86.93%。这个数值虽然低于 Fu 等^[24] 的 92.6% 的转化率, 但整个反应过程只需要 2.5 h, 大大缩短了酶水解的时间, 为工业上酶法水解胶体几丁质制备 GlcNAc 奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Hamid R, Khan MA, Ahmad M, et al. Chitinases: an update. *J Pharm Bioallied Sci*, 2013, 5(1): 21-29.
- [2] Konopka JB. N-acetylglucosamine functions in cell signaling. *Scientifica*, 2012, 2012: 489208.
- [3] Adrangi S, Ail Faramarzi M. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8): 1786-1795.
- [4] Zhou JP, Song ZF, Zhang R, et al. A *Shinella* β -N-acetylglucosaminidase of glycoside hydrolase family 20 displays novel biochemical and molecular characteristics. *Extremophiles*, 2017, 21(4): 699-709.
- [5] Chen JK, Shen CR, Liu CL. N-acetylglucosamine: production and applications. *Mar Drugs*, 2010, 8(9): 2493-2516.
- [6] Li YL, Wu T, Yu ST, et al. Screening of a microbe to degrade chitin. *Taiwanese J Agric Chem Food Sci*, 2005, 43(6): 410-418.
- [7] Litzinger S, Duckworth A, Nitzsche K, et al. Muropeptide rescue in *Bacillus subtilis* involves sequential hydrolysis by β -N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *J Bacteriol*, 2010, 192(12): 3132-3143.
- [8] Du C, Jiang S, Zhou YL, et al. A *Bacillus pumilus*

- originated β -N-acetylglucosaminidase for chitin combinatory hydrolysis and exploration of its thermostable mechanism. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 1282-1289.
- [9] Kim JS, Yoon BY, Ahn J, et al. Crystal structure of β -N-acetylglucosaminidase CbsA from *Thermotoga neapolitana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(3): 869-874.
- [10] Litzinger S, Fischer S, Polzer P, et al. Structural and kinetic analysis of *Bacillus subtilis* N-acetylglucosaminidase reveals a unique Asp-His dyad mechanism. *J Biol Chem*, 2010, 285(46): 35675-35684.
- [11] Jiang S, Jiang HY, Zhou YL, et al. High-level expression of β -N-Acetylglucosaminidase BsNagZ in *Pichia pastoris* to obtain GlcNAc. *Bioproc Biosyst Eng*, 2019, 42(4): 611-619.
- [12] Chen JK, Shen CR, Yeh CH, et al. N-acetylglucosamine obtained from chitin by chitin degrading factors in *Chitinbacter tainanensis*. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(2): 1187-1195.
- [13] Finch AJ, Kim JR. Thermophilic proteins as versatile scaffolds for protein engineering. *Microorganisms*, 2018, 6(4): E97.
- [14] Kumar V, Dangi AK, Shukla P. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. *Mol Biotechnol*, 2018, 60(3): 226-235.
- [15] Yang SQ, Song S, Yan QJ, et al. Biochemical characterization of the first fungal glycoside hydrolyase family 3 β -N-acetylglucosaminidase from *Rhizomucor miehe*. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(22): 5181-5190.
- [16] Lee PS, Lee KH. *Escherichia coli*: A model system that benefits from and contributes to the evolution of proteomics. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 84(7): 801-814.
- [17] Ogawa M, Kitagawa M, Tanaka H, et al. A β -N-acetylhexosaminidase from *Symbiobacterium thermophilum*; gene cloning, overexpression, purification and characterization. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 38(3/4): 457-464.
- [18] Choi KH, Seo JY, Park KM, et al. Characterization of glycosyl hydrolase family 3 β -N-acetylglucosaminidases from *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana*. *J Biosci Bioeng*, 2009, 108(6): 455-459.
- [19] Zscherp C, Aygün H, Engels JW, et al. Effect of proline to alanine mutation on the thermal stability of the all- β -sheet protein tendamistat. *Biochim Biophys Acta Prot Proteom*, 2003, 1651(1/2): 139-145.
- [20] Suzuki Y. The proline rule: A strategy for protein thermal stabilization. *Proc Jpn Acad*, 1999, 75(6): 133-137.
- [21] 姜顺, 郝少华, 向腊, 等. 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. *微生物学报*, 2020, 60(1): 69-80.
- Jiang S, Hao SH, Xiang L, et al. A new N-acetylglucosaminidase from facultative alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* 703. *Acta Microbiol Sin*, 2020, 60(1): 69-80 (in Chinese).
- [22] Zhou JP, Song ZF, Zhang R, et al. Characterization of a NaCl-tolerant β -N-acetylglucosaminidase from *Sphingobacterium* sp. HWLB1. *Extremophiles*, 2016, 20(4): 547-557.
- [23] Nguyen-Thi N, Doucet N. Combining chitinase C and N-acetylhexosaminidase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) provides an efficient way to synthesize N-acetylglucosamine from crystalline chitin. *J Biotechnol*, 2016, 220: 25-32.
- [24] Fu X, Yan QJ, Yang SQ, et al. An acidic, thermostable exochitinase with β -N-acetylglucosaminidase activity from *Paenibacillus barengoltzii* converting chitin to N-acetylglucosamine. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 174-185.
- [25] Wang D, Li AJ, Han HY, et al. A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes. *Int J Biol Macromol*, 2018, 116: 863-868.

(本文责编 郝丽芳)