

日本鳗鲡肠道N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质

林建城 胡建辉 吴钦端

PURIFICATION OF N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE FROM INTESTINE OF *ANGUILLA JAPONICA* AND ITS ENZYMATIC CHARACTERISTICS

LIN Jian-Cheng, HU Jian-Hui, WU Qin-Duan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2022.2021.0169>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

长江靖江段沿岸日本鳗鲡丰度的时间格局及生物学研究

THE TEMPORAL DISTRIBUTION AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *ANGUILLA JAPONICA* COLLECTED AT THE JINGJIANG SECTION OF THE YANGTZE RIVER

水生生物学报. 2021, 45(2): 397–404 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.003>

日本鳗鲡TLR21基因的鉴定、免疫应答与启动子分析

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF *TLR21* GENE FROM JAPANESE EEL, *ANGUILLA JAPONICA*

水生生物学报. 2017, 41(2): 296–305 <https://doi.org/10.7541/2017.36>

日本鳗鲡的C-型和G-型溶菌酶研究

CHICKEN- AND GOOSE- TYPE LYSOZYME GENES IN THE JAPANESE EEL *ANGUILLA JAPONICA*

水生生物学报. 2017, 41(4): 807–818 <https://doi.org/10.7541/2017.101>

日本鳗鲡IFN- γ 基因的鉴定、表达模式及启动子活性分析

CHARACTERIZATION, EXPRESSION PATTERN AND PROMOTER ACTIVITY ANALYSIS OF INTERFERON-GAMMA IN JAPANESE EEL, *ANGUILLA JAPONICA*

水生生物学报. 2017, 41(3): 589–602 <https://doi.org/10.7541/2017.76>

珠江水系鳗鲡资源空间分布特征研究

THE SPATIAL DISTRIBUTION OF *ANGUILLA JAPONICA* AND *ANGUILLA MARMORATA* IN THE PEARL RIVER

水生生物学报. 2019, 43(4): 847–853 <https://doi.org/10.7541/2019.100>

长江口日本鳗鲡降海产卵洄游群体的银化指标研究

SILVERING INDEXES FOR SPAWNING MIGRATORY POPULATION OF THE JAPANESE EEL *ANGUILLA JAPONICA* IN THE YANGTZE RIVER ESTUARY, CHINA

水生生物学报. 2019, 43(1): 133–141 <https://doi.org/10.7541/2019.017>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2022.2021.0169

日本鳗鲡肠道N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质

林建城 胡建辉 吴钦端

(莆田学院环境与生物工程学院, 福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室, 生态环境及其信息图谱福建省高等学校
重点实验室(莆田学院), 莆田 351100)

摘要: 为了探讨日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(EC3.2.1.52, NAGase)的分离纯化及其酶学性质, 通过硫酸铵沉淀分级分离、Sephadex G-100分子筛凝胶柱层析和DEAE-32离子交换柱层析纯化NAGase, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和SDS-PAGE鉴定酶的纯度、测定酶蛋白亚基分子质量; 以对-硝基苯-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖为底物, 研究NAGase催化反应的动力学参数, 探讨其酶学性质。结果表明: 日本鳗鲡肠道NAGase纯酶制剂比活力为2517.40 U/mg, 酶蛋白亚基分子质量为69.98 kD, 酶的最适pH、最适温度、米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 分别为6.0、60℃、0.336 mmol/L和7.634 μ mol/(L·min); 酶在pH 4.8—7.2较稳定, 在温度60℃以下具有较好的热稳定性, 在65℃以上酶迅速失活。 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 对NAGase表现出不同程度的激活作用, Na^+ 、 Li^+ 和 Ba^{2+} 对酶活力几乎没有影响, Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 对酶活力有不同程度的抑制作用, Hg^{2+} 对酶活力抑制作用最强, 1.0 μ mol/L Hg^{2+} 可使酶活力丧失83.69%。化学修饰法研究表明, 精氨酸基不是日本鳗鲡NAGase的必需基团, 而赖氨酸 ϵ -氨基、半胱氨酸巯基、组氨酸咪唑基、丝氨酸羟基和色氨酸吡咯基是酶的必需基团, 二硫键是NAGase活性所必需的。综上所述, 实验采用的日本鳗鲡肠道NAGase分离纯化方案有效可行, 酶活力易受环境中酸碱度、温度和金属离子的影响, 且与其他不同动物来源的NAGase具有相似的必需基团。

关键词: 分离纯化; 酶学性质; 必需基团; N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶; 日本鳗鲡

中图分类号: Q556.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)09-1301-09



长期以来对鱼类消化道的消化酶如蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶等已有相当多的研究, 但对鱼类如何利用和消化含几丁质的食物知之甚少, 这一问题近年来逐渐得到学者们的重视^[1]。Matsumiya等^[2]从大泷六线鱼(*Hexagrammos otakii*)和日本鲈(*Scomber japonicus*)胃中分离到几丁质酶, 证实了鱼类消化道几丁质酶具有很强的底物专一性, 与几丁质的消化生理密切相关; Ikeda等^[3]先从白姑鱼(*Penahia argentatus*)胃中分离到一种分子量为56 kD的几丁质酶(PaChiB), 证明是一种内切型几丁质酶; 后从三线矶鲈(*Parapristipoma trilineatum*)胃中也分离到PtChiA和PtChiB两种几丁质酶同工酶, 它们均可从几丁寡糖(GlcNAc)_n非还原端的第二和第三糖苷键优先进行降解^[4]; 接着又从褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)胃中提取分离到SmChiA、SmChiB和

SmChiC三种几丁质酶同工酶, 其中SmChiA和SmChiB可降解几丁寡糖(GlcNAc)_n非还原端的第二糖苷键, SmChiC则是优先降解第三糖苷键, 认为鱼类消化道含有一种降解几丁质的酶系统, 可以有效地降解从食物中摄入的几丁质^[5]。而Kawashima等^[6]从日本沙丁鱼(*Sardinops melanostictus*)胃中也分离到分子量为45和56 kD的两种几丁质酶同工酶, 并预测了其三维结构模型; 相似地, 黄金凤等^[7]近期研究发现, 吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)在前肠和中肠能高表达3种几丁质酶tChit1a、tChi3和tChit, 而在胃中表达量很少, 推测可能与罗非鱼栖息地是在水体中下层, 食性为杂食性、食物中含虾蟹壳较少有关, 并认为这些几丁质酶主要功能可能不是降解几丁质。

几丁质酶系包括有内切型和外切型几丁质酶,

收稿日期: 2021-08-02; 修订日期: 2022-04-15

基金项目: 福建省自然科学基金(2018J01467); 莆田市科技计划项目(2021ZP09)资助 [Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province of China (2018J01467); the Research Project of Putian Science and Technology Bureau (2021ZP09)]

通信作者: 林建城(1966—), 男, 硕士, 教授; 研究方向为食品生物技术。 E-mail: ptljc660402@sina.com

乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase, EC3.2.1.52)是几丁质酶系组成分之一,具有外切酶性质,可将几丁质外切形成N-乙酰葡萄糖胺单体和几丁寡聚糖^[8]。目前对节肢动物NAGase已有不少研究,Kogo等^[9]从家蚕(*Bombyx mori*)表皮层和消化道中获得NAGase,研究表明分布在表皮层的NAGase与其成虫化蛹和蜕皮生长密切相关,而分布在内脏的NAGase主要功能是消化含几丁质的食物,与蜕皮无关;研究结果普遍认为节肢动物外表皮NAGase主要是参与调节周期性蜕皮和新表皮形成的生理过程,而内脏NAGase可能主要是参与消化含几丁质的食物。近年来,鱼类消化道NAGase的功能与性质也逐渐得到关注。Kakizaki等^[10]从日本鲈和白姑鱼消化道分离到高活性的内切型几丁质酶和外切型NAGase,发现酶在两种鱼胃中表达有所不同,可能是与鱼食性不同有关;陈晓佳等^[11]从尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肝脏分离到NAGase,阐明了其酶学性质和功能基团;从此,对鱼类消化道NAGase有了初步认识。

日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)隶属于鳗鲡目鳗鲡科,为降河洄游鱼类,在海水中繁殖、淡水中生长,成鳗主要以鱼、虾、蟹和水生昆虫等水生生物为食,人工饲养下主要摄食的是人工配合饲料,是一种我国重要的淡水养殖鱼类。有报道鳗鲡消化道内存在较高的几丁质酶活力,可以利用含几丁质的食物^[12],但对日本鳗鲡外切型NAGase还未有研究。为此,本课题拟从日本鳗鲡肠道中提取分离NAGase,研究其酶学性质和功能基团,并探讨环境因素对鳗鲡消化道NAGase的影响,为进一步阐明鳗鲡消化道几丁质酶系的结构与功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

日本鳗鲡出自莆田市东源水产食品有限公司,挑选体长(43 $\pm$ 2) cm的无病害活鳗为试材,解剖取其小肠部分,剔除肝脏、表面分布的脂肪等附着物,无离子水清洗后沥干,每样品袋装入1条鳗鲡的小肠,冻藏待用。

NAGase底物为对硝基苯-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷(pNP- β -D-GlcNAc),系上海医药工业研究院生化室产品,分离纯化使用的Sephadex G-100是Pharmacia产品,DEAE-32系Whatman分装,牛血清蛋白为标准蛋白,电泳使用的低分子量标准蛋白(Phosphorylase b 98.0 kD、牛血清白蛋白BSA 66.0 kD、Egg Albumin 47.0 kD、Carbonic Anhydrase 30.0 kD、Trypsin Inhibitor 22.0 kD和 α -Lactalbumin 14.4 kD)

由天根生化科技有限公司出品。化学修饰剂对氯汞苯甲酸(pCMB)和苯甲基磺酰氟(PMSF)是Sigma产品;乙酸酐(AcAn)、三硝基苯磺酸(TNBS)、二巯基苏糖醇(DTT)、乙酰丙酮(AcAc)、溴代乙酸(BrAc)、N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)及金属化合物等药品均为国产分析纯。

1.2 方法

日本鳗鲡肠道NAGase的提取与分离 随机取3个样品袋,小肠解冻后切成1 cm小段,共取样100 g,加入300 mL预冷的0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4),10000 r/min下捣碎匀浆1min,4℃抽提4h以上,20000 $\times$ g冷冻离心30min,取上清液。依次采用35%,75%饱和度硫酸铵分级分离酶蛋白,收集沉淀物,透析后冷冻离心(25000 $\times$ g) 30min,得粗酶制剂。先经过Sephadex G-100分子筛凝胶柱(柱规格为2.6 cm $\times$ 60 cm)层析分离,洗脱液是0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4,含0.2 mol/L NaCl),流速为0.4 mL/min,自动部分收集器收集流出液,按每管4 mL收集,收集110管,集中酶活力峰周围的收集管,收集酶液,并继续用于DEAE-32离子交换柱(柱规格为1.6 cm $\times$ 40 cm)层析,同样的缓冲液洗脱,内含NaCl(0—1.0 mol/L)直线梯度洗脱,流速为0.25 mL/min,每管收集5 mL,收集酶活力峰的洗脱酶液,透析后用于酶蛋白的纯度鉴定和酶学性质研究。采用Bradford^[13]的方法测定收集液的蛋白浓度,以牛血清蛋白为标准蛋白,结果以 A_{280} 表示。

日本鳗鲡NAGase纯度鉴定 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和SDS-PAGE鉴定酶纯度,分离胶和浓缩胶浓度分别为10%和3.75%,考马斯亮蓝R250染色。

日本鳗鲡NAGase相对分子质量的测定 从SDS-PAGE电泳图谱测定NAGase蛋白亚基相对分子质量,以各标准蛋白的迁移率(变量x)对相应分子质量的对数(变量y)作图,从样品的相对迁移率求出酶蛋白亚基的相对分子质量。

日本鳗鲡NAGase等电点的测定 参考文献[14]方法,采用等电点聚焦电泳分离法测定NAGase等电点。

日本鳗鲡NAGase活力测定体系 NAGase活力测定参考文献[14]的方法进行。2 mL的测活体系包含有:5 mmol/L底物0.2 mL、75 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液(pH 6.0) 1.0 mL、dd H_2O 0.78 mL,37℃预保温10 min后,加入浓度为0.111 mg/mL的NAGase纯酶制剂20 μ L,此条件下催化反应10min,以0.5 mol/L氢氧化钠(NaOH)终止反应,在405 nm波长下测定反应液的光吸收值 A_{405} ,设立空

白对照组, 在此测活体系中测定NAGase活力, 对其酶学性质进行研究。

1个酶活力单位(U)定义为: 每min催化水解产生1 $\mu\text{mol/L}$ 对硝基苯酚(pNP)所需要的酶量。比活力单位为U/mg。

pH对日本鳗鲡NAGase活力的影响 在NAGase活力测定体系中, 测定不同pH3.2—10.0下的NAGase活力, 其中pH 3.2—5.8选择醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 5.8—8.0使用 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液, pH 9.0—10.0采用硼砂- NaOH 缓冲液, 根据不同酸碱度下测定的NAGase活力, 确定酶的最适pH; 再将NAGase纯酶制剂(0.111 mg/mL)分别与各种不同pH(pH 3.2—10.0)的缓冲液等量混合, 在4℃下孵育1h, 取出20 μL 处理过的酶制剂, 分别加入已在37℃中预保温10min的反应体系(含5 mmol/L底物0.2 mL, 75 mmol/L pH 6.0的 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液1.0 mL, dd H_2O 0.78 mL)中, 催化反应10min, 分别测定剩余酶活力, 计算各试验组的相对酶活力(%), 分析NAGase的酸碱稳定性。

温度对日本鳗鲡NAGase活力的影响 在测活体系中, 检测不同温度(20—90℃)下NAGase的活力, 酶活力最大的试验温度确定为NAGase的最适温度; 再将NAGase纯酶制剂(0.111 mg/mL)置于各种不同温度(4—90℃)下分别处理1h, 取出20 μL 处理过的酶制剂, 分别加入已在37℃中预保温10min的反应体系(含5 mmol/L底物0.2 mL, 75 mmol/L pH 6.0的 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液1.0 mL, dd H_2O 0.78 mL)中, 催化反应10min后检测其剩余酶活力, 计算各试验组的相对酶活力(%), 确定NAGase的温度稳定性范围。

日本鳗鲡NAGase酶促反应动力学参数的测定 在测活体系中, 仅仅改变底物浓度([S]范围: 0.15—1.5 mmol/mL), 测定不同底物浓度下的NAGase活力(以表示酶促反应速度 v), 以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作

图, 利用Lineweaver-Burk作图法求出酶的米氏常数(K_m)和最大反应速度($V_{\max}$)值。

金属离子对日本鳗鲡NAGase活力的影响 在测活体系中, 先分别加入终浓度均为10 mmol/L的 NaCl 、 NaNO_3 、 Na_2SO_4 和 Li_2SO_4 , 测定NAGase活力, 探讨 Na^+ 、 Li^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 对NAGase的影响; 再分别加入 MgSO_4 、 CaCl_2 、 BaCl_2 、 Cu_2SO_4 、 ZnSO_4 、 FeSO_4 和 FeCl_3 , 终浓度均为0.5 mmol/L, 以及分别加入0.1 mmol/L MnCl_2 、1 mmol/L $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 和1 $\mu\text{mol/L}$ HgCl_2 , 测定不同金属离子作用下的NAGase活力, 以相对酶活力(%)表示, 分析金属离子对日本鳗鲡NAGase活力的影响。

日本鳗鲡NAGase酶蛋白的化学修饰 NAGase的修饰方法以及修饰酶活力测定方法参照文献[15]。采用AcAc、pCMB、BrAc、PMSF和NBS分别作为酶蛋白精氨酸(Arg)胍基, 半胱氨酸(Cys)巯基、组氨酸(His)咪唑基、丝氨酸(Ser)羟基和色氨酸(Trp)吲哚基的修饰剂, DTT为酶蛋白中二硫键的修饰剂, AcAn为酶蛋白氨基、TNBS为赖氨酸(Lys) ϵ -氨基的修饰剂。将纯酶分别与8种不同修饰剂以1:3体积混合修饰30min, 在NAGase测活体系中测定各修饰酶的活力, 设定未修饰酶活力为100%, 测定修饰酶的相对酶活力(%), 研究不同修饰剂对酶的修饰效应。

2 结果

2.1 日本鳗鲡肠道NAGase的提取与分离

日本鳗鲡肠道NAGase粗酶制剂经过葡聚糖凝胶柱层析分离, 从层析图谱(图1a)可知, 获得了3个蛋白峰, 只有第2个小蛋白峰的区间具有NAGase活性, 将收集到的酶制剂经DEAE-32纤维素离子交换柱层析, 从层析图谱(图1b)可见2个蛋白峰, 仅仅第1个蛋白峰区间具有NAGase活性, 收集酶活力峰周围的酶液, 获得酶比活力为2517.40 U/mg, 得率为

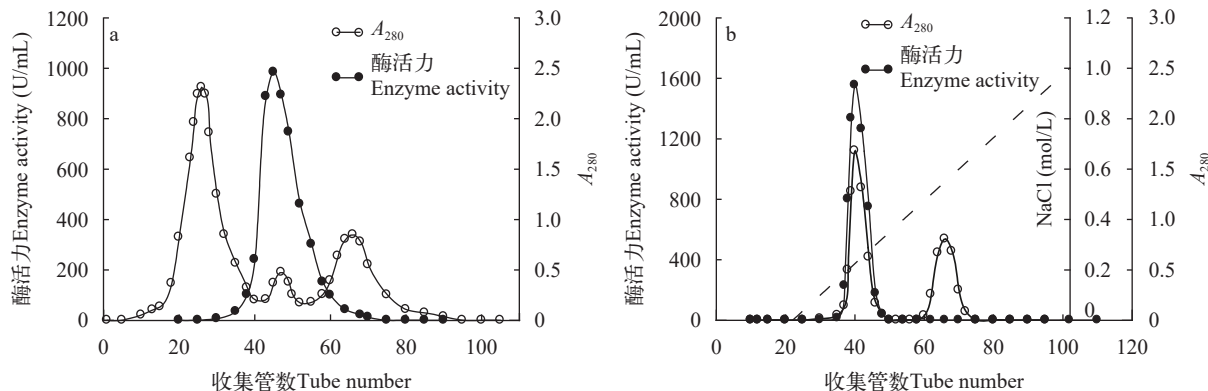


图1 日本鳗鲡肠道NAGase的Sephadex G-100(a)和DEAE-32(b)柱层析图谱

Fig. 1 Column chromatography of NAGase from intestine of *Anguilla japonica* on Sephadex G-100 column (a) and DEAE-cellulose (b)

54.99%, 纯化倍数为27.71的NAGase酶制剂; 进一步分析分离纯化方案, 结果(表 1)显示, 分离纯化期间NAGase比活力和纯化倍数得到不断升高, 酶得率缓慢下降, 最后获得的酶制剂纯度大、得率高, 说明该纯化方案简单又高效。

将纯化的NAGase酶制剂经PAGE和SDS-PAGE电泳鉴定, 从图 2可知两种电泳的结果均只有单一蛋白带, 可判断NAGase酶制剂已达到电泳纯; 进一步以图 2b中各标准蛋白的迁移率(变量 x)对相应分子质量的对数(变量 y)作图, 回归一直线方程为: $y = -1.646x + 5.207$, 求得NAGase酶蛋白亚基的相对分子质量为69.98 kD; 将纯酶经等电点聚焦电泳, 测得日本鳗鲡NAGase等电点 pI 为4.98。

2.2 pH对日本鳗鲡NAGase活力的影响

日本鳗鲡NAGase最适 pH 为6.0(图 3a), pH 偏离6.0越大, NAGase活力越小; NAGase在 pH 4.8—7.2区域内相对稳定, 在 pH 9.0环境中酶活力仅剩余34.9%, 在 pH 4.0以下偏酸的环境中酶失活加速(图 3b)。这说明日本鳗鲡NAGase活力易受环境中酸碱度变化的影响。

2.3 温度对日本鳗鲡NAGase活力的影响

由图 4可见, 日本鳗鲡肠道NAGase的最适温度为 $60^{\circ}C$, 温度在 $60^{\circ}C$ 以上酶活力快速下降, 温度达 $80^{\circ}C$ 时, 酶失活89.6%(图 4a); 在 $60^{\circ}C$ 温度以下, NAGase具有较好的热稳定性, $65^{\circ}C$ 以上酶稳定性迅速下降, 在 $70^{\circ}C$ 环境内处理1h, 酶活力仅剩余10.3%, $90^{\circ}C$ 下NAGase接近失活(图 4b)。

2.4 日本鳗鲡NAGase酶促反应动力学参数的测定

在0.15—1.5 mmol/mL $[S]$ 下, 测定不同 $[S]$ 对日本鳗鲡NAGase活力(v)的影响, 结果(图 4)显示, 随着 $[S]$ 的增大, 酶反应速度 v 也增大。以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图(图 5), 得到1条直线, 直线方程为: $y = 0.044x + 0.131$, $R^2 = 0.9985$; 以据此方程求得日本鳗鲡NAGase水解底物pNP- β -D-GlcNAc的 K_m 值为0.336 mmol/L,

V_{max} 值为7.634 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 。

2.5 金属离子对日本鳗鲡NAGase活力的影响

从表 2可知, Na^+ 、 Li^+ 、 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 对NAGase活力几乎没有影响; 0.5 mmol/L Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 可分别使日本鳗鲡肠道NAGase活力提高16.72%、8.34%、4.15%和51.56%, 0.1 mmol/L的 Mn^{2+} 可使酶活力提高34.14%, 这些金属离子对NAGase呈现不同程度的激活作用; 0.5 mmol/L Ba^{2+} 对NAGase活力几乎没有影响; 而0.5 mmol/L Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 可分别使NAGase活力丧失9.27%和45.38%, 对酶呈现抑制作用。10.0 mmol/L Pb^{2+} 和1.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Hg^{2+} 可分别使酶活力丧失65.17 %和83.69 %, Hg^{2+} 的抑制作用最强。

2.6 日本鳗鲡NAGase的必需基团

胍基和氨基的化学修饰 AcAc能专一修饰蛋白质Arg中的胍基^[11], 实验结果(图 6a)表明, AcAc在0—200 mmol/L, 对NAGase修饰后, 酶活力几乎不受影响, 由此判断Arg胍基不是日本鳗鲡NAGase活性所必需的。AcAn是蛋白质氨基的修饰剂^[16], 实验表明, NAGase经AcAn修饰后, 酶活力呈不断下降趋势(图 6a), 说明氨基是日本鳗鲡NAGase活力所必需的; 而TNBS是Lys中 ϵ -氨基的一种有效修饰剂^[15], 随TNBS浓度增大, 修饰后NAGase活力不断下降, 经20 mmol/L TNBS修饰后酶活力几乎全部丧失(图 6b), 说明Lys的 ϵ -氨基是日本鳗鲡NAGase的必需基团。

巯基与二硫键的化学修饰 pCMB是Cys巯基的专一修饰剂^[16], NAGase经pCMB修饰后, 随pCMB浓度增大, 酶活力呈不断下降趋势, 当pCMB修饰浓度达0.5 mmol/L时, 酶活力仅剩16.11%(图 6c), 结果显示, 巯基是日本鳗鲡NAGase活性的必需基团。而DTT是蛋白质分子中二硫键的有效修饰剂之一, DTT修饰后酶蛋白的二硫键断裂, 酶空间构象可能发生变化^[15]。NAGase经DTT修饰后, 酶活

表 1 日本鳗鲡肠道NAGase的分离纯化

Tab. 1 Purification of NAGase from intestine of *Anguilla japonica*

纯化步骤 Purification steps	总蛋白量 Total protein (mg)	酶活力 Enzyme activity (U/mL)	总酶活力 Total activity (U)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification (fold)	得率 Yield (%)
粗酶液 Crude extract	280.62	202.30	25489.80	90.83	1.00	100
35%饱和硫酸铵盐析上清液 35%(NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	185.37	213.28	20475.07	110.45	1.22	80.33
75%饱和硫酸铵盐析透液 75%(NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	57.29	444.48	16668.07	290.92	3.20	65.39
葡聚糖凝胶G-100层析 Sephadex G-100 fraction	15.68	191.32	15496.76	988.10	10.88	60.80
DEAE-32纤维素离子交换层析 DEAE-32 cellulose chromatography	5.57	280.33	14016.50	2517.40	27.71	54.99

力呈下降趋势, 当DTT浓度达到100 mmol/L时, NAGase活力丧失了81.29%(图 6d), 说明日本鳗鲡NAGase酶蛋白的二硫键与酶活力息息相关, 酶蛋白稳定的空间构象是酶活性所必需的。

咪唑基、羟基和吡啶基的化学修饰 BrAc在酸性条件下能专一地修饰蛋白质His的咪唑基^[17]。结果表明, 随BrAc浓度增大, 修饰后NAGase活力不断下降, 150 mmol/L BrAc修饰NAGase后, 酶几近失活(图 6d), His咪唑基是日本鳗鲡NAGase活性的必需基团。PMSF可对蛋白质分子中Ser羟基进行专一修饰^[15], 不同浓度PMSF修饰NAGase后, 酶活力呈不断下降趋势, 50 mmol/L PMSF修饰NAGase后, 酶活力仅剩4.28%(图 6e), 说明Ser的羟基与日本鳗鲡NAGase活性密切相关, 是酶活性的必需基团。此外, NBS是蛋白质中Trp吡啶基的特异修饰剂^[17], NAGase被NBS修饰后, 酶活力快速下降, 仅

100 μ mol/L浓度的NBS, 可使酶活力下降94.69%(图 6f), 说明吡啶基为该酶的必需基团。

3 讨论

3.1 动物NAGase的基本酶学性质

不种动物来源的NAGase其酶学性质存在差异。尼罗罗非鱼肝脏NAGase是由一个蛋白亚基组成, 蛋白亚基分子质量为61.8 kD, K_m 为0.229 mmol/L^[11]; 而尼罗罗非鱼^[18]精巢中的NAGase, 分子量则为118.0 kD, K_m 是0.67 mmol/L; 从昆虫类菜青虫(*Pieris rapae*)^[19]外表皮来源的NAGase是由相对分子质量分别为59.5和57.2 kD的两个蛋白亚基组成, K_m 为0.285 mmol/L; 虾类体内的NAGase, 如凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)^[14]内脏NAGase是由两个相同蛋

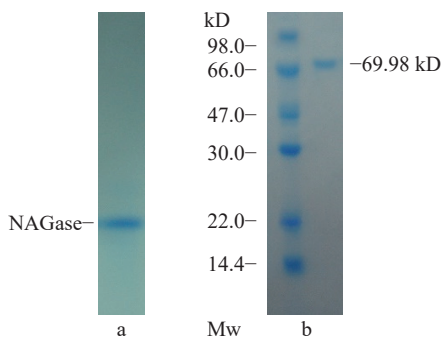


图2 日本鳗鲡NAGase的PAGE(a)及SDS-PAGE(b)电泳图谱
Fig. 2 PAGE (lane a) and SDS -PAGE (lane b) of the purified NAGase from intestine of *Anguilla japonica* (Mw molecular weight standard)

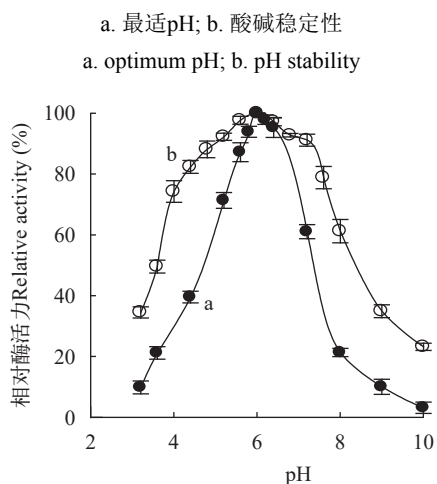


图3 pH对日本鳗鲡NAGase活力的影响
Fig. 3 Effects of pH on the activity of NAGase from intestine of *Anguilla japonica*

a. 最适pH; b. 酸碱稳定性
a. optimum pH; b. pH stability

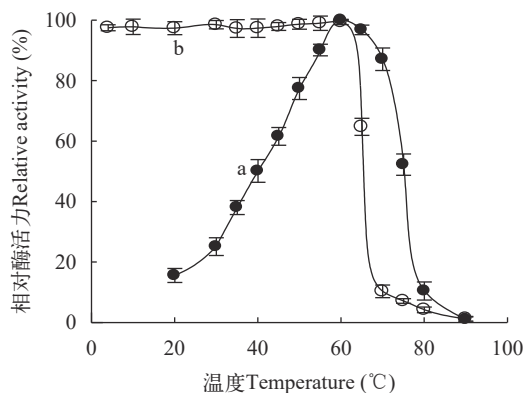


图4 温度对日本鳗鲡NAGase活力的影响
Fig. 4 Effects of temperature on the activity of NAGase from intestine of *Anguilla japonica*

a. 最适温度; b. 热稳定性
a. optimum temperature; b. temperature stability

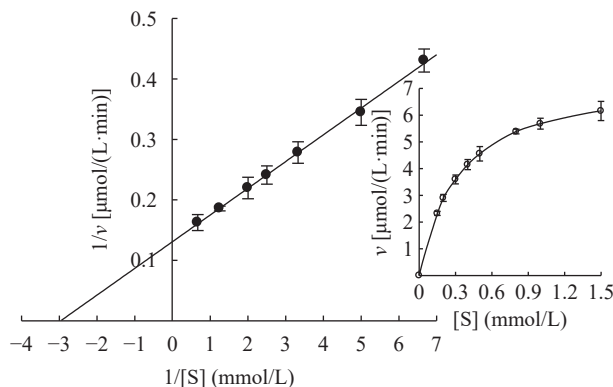


图5 日本鳗鲡NAGase催化底物水解的Lineweaver-Burk双倒数图

Fig. 5 The Lineweaver-Burk plot of NAGase from *Anguilla japonica* for the hydrolysis of substrate

图内插图为基础浓度对初速度的双曲线

The inset shows the relationship between the substrate concentration and the initial rate

白亚基组成, 亚基分子质量为45 kD, $K_m=0.254$ mmol/L; 而来自蟹类节肢动物的NAGase, Zhang等^[20]报道的锯缘青蟹(*Scylla serrata*)内脏NAGase也是由两个相对分子质量均为65.8 kD的蛋白亚基组成, K_m 为0.424 mmol/L。实验结果表明, 日本鳗鲡肠道NA-

表2 金属离子对日本鳗鲡NAGase活力的影响

Tab. 2 Effects of metal ions on the activity of NAGase from intestine of *Anguilla japonica*

化合物 Compound	浓度Concentration (mmol/L)	相对酶活力 Relative activity (%)
对照Control group	—	100.00
NaCl	10.0	100.08±0.25
NaNO ₃	10.0	100.32±0.32
Na ₂ SO ₄	10.0	99.72±0.29
Li ₂ SO ₄	10.0	99.92±0.38
MgSO ₄	0.5	116.72±1.04
CaCl ₂	0.5	108.34±2.09
Cu ₂ SO ₄	0.5	104.15±0.95
MnCl ₂	0.1	134.14±0.70
FeCl ₃	0.5	151.56±0.31
BaCl ₂	0.5	100.04±0.21
ZnSO ₄	0.5	90.73±1.77
FeSO ₄	0.5	54.62±1.11
Pb(NO ₃) ₂	10.0	34.83±0.52
HgCl ₂	0.001	16.31±0.60

Gase酶蛋白亚基分子质量相对较大, 为69.98 kD, $K_m=0.336$ mmol/L。比较不同动物NAGase水解底物pNP- β -D-GlcNAc的 K_m 值大小, 说明尼罗罗非鱼肝脏NAGase对底物亲和力相对较大。

在研究pH(3.2—10.0)对日本鳗鲡肠道NAGase活力的影响中, 为了尽量减少环境因素对酶活力的影响, 分段选用了成分简单的醋酸-醋酸钠、NaH₂PO₄-Na₂HPO₄及硼砂-NaOH等3种常用缓冲液。广范围缓冲液(pH 2.6—12.0)组成分包括柠檬酸、KH₂PO₄、硼酸、巴比妥和NaOH等, 成分较为复杂, 可能会对酶活力产生影响, 引起实验误差。而3种成分简单的缓冲液虽然离子强度有所不同, 但都是Na⁺型的, Na⁺对NAGase活力几乎没有影响, 实验误差相对小些。

pH对来自不同动物NAGase的影响存在差异, 本实验表明: 日本鳗鲡肠道NAGase的最适pH为6.0, 与菜青虫^[19]表皮NAGase最适pH (6.2)及尼罗罗非鱼^[11]肝脏NAGase最适pH (5.8)相近, 高于凡纳滨对虾^[14]内脏NAGase的最适pH (5.2)及中国鲎(*Tachypleus tridentatus*)^[21]内脏NAGase最适pH (5.4), 这些来源不同的NAGase最适pH均偏向酸性。

在温度对动物NAGase影响的研究中, 尼罗罗非鱼^[11]肝脏NAGase和中国鲎^[21]内脏NAGase的最适温度均为55℃, 蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)^[22]

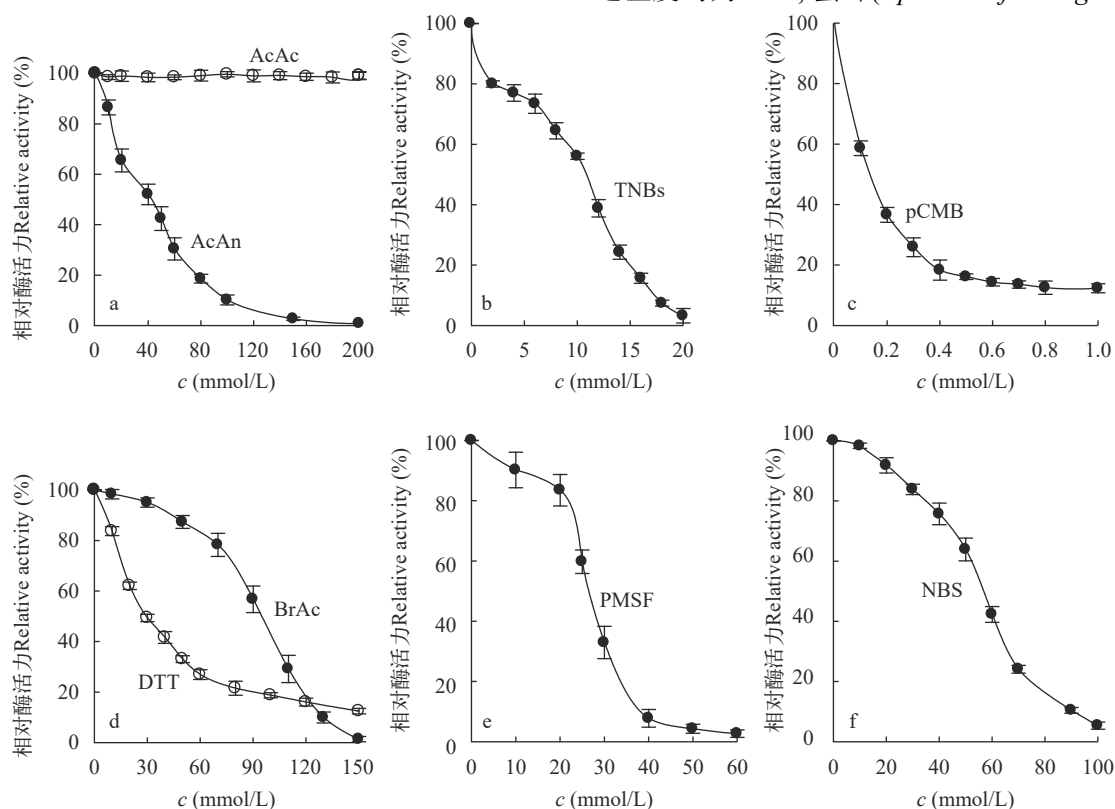


图6 八种化学修饰剂对日本鳗鲡NAGase活力的影响

Fig. 6 The effects of eight chemical modification reagents on the activity of NAGase from intestine of *Anguilla japonica*

NAGase的最适温度为60℃, 而凡纳滨对虾^[14]和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[23]内脏NAGase最适温度均是45℃, 本实验日本鳗鲡肠道NAGase的最适温度为60℃。这些不同动物来源的NAGase其最适温度存在差异, 应该是生物进化中各自长期适应不同生活环境的结果。此外, 它们的最适温度均较高($\geq 45^\circ\text{C}$), 超出普通生存环境的温度, 而这些节肢动物或鱼类又都是变温动物, 因此, 在适宜生存的环境温度下这些动物的NAGase活力都处于较低水平。日本鳗鲡养殖的适宜水温为13—30℃^[24], 此温度下肠道NAGase活力较低, 直接影响鳗鲡肠道对甲壳质类多糖的消化。

3.2 NAGase的酸碱稳定性与热稳定性

凡纳滨对虾^[14]内脏NAGase在pH 4.2—10.0稳定, 猪^[25]精液碱性NAGase在pH 3.0—8.9稳定, 锯缘青蟹^[20]内脏和尼罗罗非鱼^[11]肝脏的NAGase则分别在pH 4.6—8.6、pH 4.0—9.0稳定, 这些NAGase在偏酸偏碱性环境中均较稳定; 在本实验中, 日本鳗鲡肠道NAGase的酸碱稳定范围为pH 4.8—7.2, 在pH 8.0下孵育1h后, NAGase活力只剩61.35%, 不耐碱性。这说明不同来源的NAGase其最适pH和酸碱稳定范围均存在差异, 可能是由于不同动物来源NAGase的分子结构、活性中心构象及其所处微环境不同所致^[23]。日本鳗鲡肠道NAGase的最适pH偏酸性, 而鳗鲡肠道蛋白酶、淀粉酶的最适pH是偏碱性的^[26], 说明鳗鲡肠道内消化酶的最适pH值大小主要是由酶自身特性决定的, 与所处肠道的内环境关系不大。此外, 成鳗又适宜生长在偏碱性(pH 7.2—9.0)水体中^[24], 偏碱性的养殖水体能否影响到鳗鲡肠道内环境, 进而影响肠道内NAGase的活性, 还有待进一步研究。

不同动物来源的NAGase热稳定性不同。尼罗罗非鱼^[11]肝脏NAGase热稳定性范围为0—55℃, 中国鲎^[21]内脏NAGase在20—50℃温度内稳定, 而中华绒螯蟹^[23]内脏NAGase在10—40℃内酶较为稳定, 在本实验中, 日本鳗鲡肠道NAGase在4—60℃范围内具有较好的稳定性, 热稳定性范围较大, 这可能与鳗鲡长期适应了从深海到河流洄游这一较大水温变化的生活习性相关。酶在较低温度下通常较为稳定, 但是, 随着环境温度升高, 酶的空间构象发生了变化, 酶开始变性失活, 凡纳滨对虾^[14]内脏、锯缘青蟹^[20]内脏、菜青虫^[19]表皮和尼罗罗非鱼^[18]精巢的NAGase在45℃以上均迅速失活, 尼罗罗非鱼^[11]肝脏NAGase在55℃以上稳定性也迅速降低, 而日本鳗鲡肠道NAGase在65℃以上也迅速失活, 说明不同动物来源的NAGase可能由于空间构象的

刚性不同, 对温度的敏感性存在差异, 酶变性失活所需的温度也不同。

3.3 金属离子对不同动物来源NAGase的影响

Mg²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺和Fe³⁺等5种金属离子对日本鳗鲡肠道NAGase活力有不同程度的激活作用。Mg²⁺和Ca²⁺往往是酶的激活剂, 对凡纳滨对虾^[14]内脏NAGase和锯缘青蟹^[20]内脏NAGase均有激活作用, 但对尼罗罗非鱼^[18]精巢和蜜蜂^[22]的NAGase几乎没有影响; Mn²⁺对凡纳滨对虾^[14]内脏NAGase也呈现激活作用, 但对尼罗罗非鱼^[18]精巢NAGase和中国鲎^[21]内脏NAGase又有抑制作用。此外, Cu²⁺对锯缘青蟹^[20]内脏NAGase、菜青虫^[19]表皮NAGase和罗非鱼^[18, 27]精巢NAGase都有不同程度抑制作用, Fe³⁺对中国鲎^[21]、凡纳滨对虾^[14]的内脏NAGase也均呈现较强抑制作用, 而本实验结果却有所不同。

实验结果表明, Ba²⁺对日本鳗鲡肠道NAGase几乎没有影响, 与Ba²⁺对中华绒螯蟹^[23]内脏NAGase没有影响相似, 但Ba²⁺对锯缘青蟹^[20]内脏NAGase又有抑制效应。Zn²⁺、Pb²⁺和Hg²⁺这三种重金属离子经常是酶的强烈抑制剂, 对凡纳滨对虾^[14]内脏和中华绒螯蟹^[23]内表皮的NAGase均具有不同的抑制效应, 而Zn²⁺、Pb²⁺和Hg²⁺对日本鳗鲡肠道NAGase也同样呈现不同程度的抑制效应, 其中Hg²⁺对酶抑制作用较强, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ Hg²⁺可使日本鳗鲡NAGase活力丧失83.69%。总之, 金属离子效应物对动物NAGase具有调控作用。因此, 鳗鲡养殖水体中的金属离子, 以及养殖饲料中所添加的矿物质或微量元素, 通过鳗鲡摄食进入肠道后, 均可对肠道NAGase活力产生调控, 进而对甲壳质类多糖的消化生理产生影响。

3.4 NAGase活性的必需基团

化学修饰法试验结果表明, Lys的 ϵ -氨基、Cys巯基、His咪唑基、Ser羟基和Trp吡咯基都是日本鳗鲡NAGase活性所必需的, 这与中国鲎^[15]内脏NAGase活性的必需基团相同, 而尼罗罗非鱼^[11]肝脏NAGase活性必需基团包含有氨基、His咪唑基和Trp吡咯基; 菜青虫^[28]表皮NAGase中也包含有Cys巯基、His咪唑基和Trp吡咯基等酶活性的必需基团, 但Lys的 ϵ -氨基不是菜青虫表皮NAGase活性所必需; 巯基与吡咯基也是槐猪精液NAGase的必需基团^[29]。相似的是, Arg胍基均不是这些动物NAGase的必需基团, 而二硫键又都是这些动物NAGase活性所必需的, 在维系酶蛋白稳定的空间构象中发挥重要作用。

综上所述, 日本鳗鲡肠道NAGase经过35%和75%饱和硫酸铵沉淀分级分离、Sephadex G-100分子筛凝胶和DEAE-32离子交换的柱层析分离, 可得

到比活力为2517.40 U/mg纯酶制剂,该分离纯化方案有效可行;NAGase蛋白亚基分子质量为69.98 kD,其 K_m 值和 V_{max} 值分别为0.336 mmol/L和7.634 μ mol/(L·min),酶活力易受环境中酸碱度、温度和金属离子的影响;Lys中 ϵ -氨基、Cys巯基、His咪唑基、Ser羟基和Trp吲哚基是酶的必需基团,二硫键是NAGase活性所必需的,而Arg胍基不是酶的必需基团,日本鳗鲡肠道NAGase与其他不同动物来源的NAGase具有相似的必需基团。

参考文献:

- [1] Ikeda M, Kakizaki H, Matsumiya M. Biochemistry of fish stomach chitinase [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, **104**(Pt B): 1672-1681.
- [2] Matsumiya M, Arakane Y, Haga A, *et al.* Substrate specificity of chitinases from two species of fish, greenling, *Hexagrammos otakii*, and common mackerel, *Scomber japonicus*, and the insect, tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, **70**(4): 971-979.
- [3] Ikeda M, Miyauchi K, Matsumiya M. Purification and characterization of a 56 kDa chitinase isozyme (PaChiB) from the stomach of the silver croaker, *Pennahia argentatus* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2012, **76**(5): 971-979.
- [4] Ikeda M, Kondo Y, Matsumiya M. Purification, characterization, and molecular cloning of chitinases from the stomach of the threeline grunt *Parapristipoma trilineatum* [J]. *Process Biochemistry*, 2013, **48**(9): 1324-1334.
- [5] Ikeda M, Shirase D, Sato T, *et al.* Primary structure and enzymatic properties of chitinase isozymes purified from the stomach of the marbled rockfish *Sebastes marmoratus* [J]. *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 2014(2): 106-116.
- [6] Kawashima S, Ikehata H, Tada C, *et al.* Stomach chitinase from Japanese sardine *Sardinops melanostictus*: purification, characterization, and molecular cloning of chitinase isozymes with a long linker [J]. *Marine Drugs*, 2016, **14**(1): 22-34.
- [7] Huang J F, Li B, Bai Y, *et al.* cDNA cloning, distribution and purification of chitinases from gastrointestinal tract of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2021, **48**(6): 107-115. [黄金凤, 李波, 白莹, 等. 吉富罗非鱼胃肠道几丁质酶的克隆、组织分布和纯化 [J]. 广东农业科学, 2021, **48**(6): 107-115.]
- [8] Broadway R M, Williams D L, Kaln W C, *et al.* Partial characterization of chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1995(20): 271-276.
- [9] Koga D, Shimazaki C, Yamamoto K, *et al.* NAGase from integument of the silkworm, *Bombyx mori*: comparative biochemistry with the pupal alimentary canal enzyme [J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1987, **51**(6): 1679-1681.
- [10] Kakizaki H, Ikeda M, Fukushima H, *et al.* Distribution of chitinolytic enzymes in the organs and cDNA cloning of chitinase isozymes from the stomach of two species of fish, chub mackerel (*Scomber japonicus*) and silver croaker (*Pennahia argentata*) [J]. *Open Journal of Marine Science*, 2015, **5**(4): 398-411.
- [11] Chen X J, Sun L H, Yuan Y, *et al.* Purification and enzymatic properties analyses of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from the liver of *Oreochromis niloticus* [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2019, **58**(5): 685-691. [陈晓佳, 孙林浩, 袁阳, 等. 尼罗罗非鱼肝脏N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质分析 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2019, **58**(5): 685-691.]
- [12] Kono M, Matsui T, Shimizu C, *et al.* Purification and some properties of chitinase from the stomach of Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1990, **54**(4): 973-978.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(2): 248-254.
- [14] Xie X L, Chen Q X, Lin J C, *et al.* Purification and some properties of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) [J]. *Marine Biology*, 2004(146): 143-148.
- [15] Lin J C, Zhou W H, Lin J J. Study on the essential groups of the β -N-acetyl-D-glucosaminidase from the viscera of horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) [J]. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2020, **50**(1): 57-64. [林建城, 周文虎, 林娟娟. 中国鲎N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶活性必需基团的研究 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, **50**(1): 57-64.]
- [16] Zhou H M, Wang H R. Protein Chemical Modification [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 1998: 23-32. [周海梦, 王洪睿. 蛋白质化学修饰 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1998: 23-32.]
- [17] Chen Q X. Enzymology and Research Technology (2nd Edition) [M]. Xiamen: Xiamen University Press, 2015, 169-171. [陈清西. 酶学及其研究技术(第二版) [M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2015, 169-171.]
- [18] Zhang W N, Bai D P, Huang Y F, *et al.* Enzymatic characterizations and activity regulations of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from the spermary of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, **117**(2): 153-157.
- [19] Shi Y, Jiang Z, Han P, *et al.* Purification and some properties of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from the cabbage butterfly (*Pieris rapae*) [J]. *Biochimie*, 2007, **89**(3): 347-354.
- [20] Zhang J P, Chen Q X, Wang Q, *et al.* Purification and some properties of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from viscera of green crab (*Scylla serrata*) [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2006(71): 55-59.
- [21] Lin J C, Xu H Q, Luo X M. Study on purification and enzymatic characteristics of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from the viscera of horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) [J]. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2017, **47**(9): 62-69 [林建城, 许恒棋, 罗新明. 中国鲎内脏N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2017, **47**(9): 62-69.]
- [22] Zhang W N, Hu C W, Zhang M X, *et al.* Purification and characterization of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from the Italian honey bee, *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2018, **61**(10): 1153-1159. [张伟妮, 胡崇伟, 张梦馨, 等. 意大利大

- 利蜜蜂N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及性质分析[J]. 昆虫学报, 2018, **61**(10): 1153-1159.]
- [23] Huang X H, Chen H H, Huang Y F. Preliminary studies on isolation, purification and some properties of the β-N-acetyl-D-glucosaminidase from *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(4): 563-569. [黄小红, 陈宏惠, 黄一帆. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及性质的初步研究[J]. 水生生物学报, 2007, **31**(4): 563-569.]
- [24] Lin J C, Wang G L, Min Z Y. Purification of protease from the intestine of *Anguilla japonica* and its enzymatic characteristics [J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition), 2015, **43**(1): 45-52 [林建城, 王国玲, 闵志勇. 日本鳗鲡肠道蛋白酶的分离纯化及其酶学性质研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, **43**(1): 45-52.]
- [25] Huang X H, Luo Z B, Li M W, *et al.* Study on purification and properties of the alkaline N-acetyl-β-D-glucosaminidase from porcine semen [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, **41**(9): 2843-2849. [黄小红, 罗忠宝, 李明伟, 等. 猪精液碱性N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的纯化与酶学性质研究[J]. 中国农业科学, 2008, **41**(9): 2843-2849.]
- [26] Long L Q, Xiong B X, Bai D X, *et al.* Preliminary studies on digestive enzymes of eel (*Anguilla japonica*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1996, **15**(3): 275-278. [龙良启, 熊邦喜, 白东清, 等. 池养鳗鲡胃肠组织消化酶的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 1996, **15**(3): 275-278.]
- [27] Zhang W N, Xie L N, Huang X H. Effects of CuSO₄ and ZnSO₄ on N-acetyl-β-D-glucosaminidase from *Oreochromis niloticus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(6): 1093-1099. [张伟妮, 谢璐娜, 黄小红. CuSO₄和ZnSO₄对尼罗罗非鱼N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的影响[J]. 水生生物学报, 2015, **39**(6): 1093-1099.]
- [28] Shi Y, Liu W F, Chen Q X. Studies on the essential groups of the β-N-acetyl-D-glucosaminidase from the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*) [J]. *Journal of Xiamen University* (Natural Science), 2006, **45**(6): 851-854 [石艳, 刘伟风, 陈清西. 菜青虫N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活性必需基团的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, **45**(6): 851-854.]
- [29] Lin X Y, Zhang W, Shen L S, *et al.* Studies on the functional groups of the β-N-acetyl-D-glucosaminidase from semen of Huai pig [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2015(9): 85-88. [林心宇, 章文, 沈林松, 等. 槐猪精液中N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶功能基团的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(9): 85-88.]

PURIFICATION OF N-ACETYL-β-D-GLUCOSAMINIDASE FROM INTESTINE OF *ANGUILLA JAPONICA* AND ITS ENZYMATIC CHARACTERISTICS

LIN Jian-Cheng, HU Jian-Hui and WU Qin-Duan

(Fujian Provincial Key Laboratory of Ecology-toxicological Effects & Control for Emerging Contaminants, Key Laboratory Ecological Environment and Information Atlas (Putian University), College of Environmental and Biological Engineering, Putian University, Putian 351100, China)

Abstract: In order to investigate the purification and its enzymatic characteristics of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (EC3.2.1.52, NAGase) from intestinal tract of Japanese eel, *Anguilla japonica*, NAGase was purified by extraction with ammonium sulfate fractionation, then chromatographed on Sephadex G-100 followed by DEAE-cellulose (DE-32) columns. The purified enzyme was determined to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and SDS-PAGE. The kinetic parameters of NAGase for the hydrolysis of pNP-β-D-GlcNAc (enzyme substrate) and enzymatic characteristics were also determined. The specific activity of the purified enzyme was 2517.40 U/mg. The molecular weight of enzyme was 69.98 kD. The optimum pH and optimum temperature of the enzyme were 6.0 and 60°C, respectively. The K_m value was 0.336 mmol/L and the V_{max} value was 7.634 μmol/(L·min), respectively. The enzyme was stable with pH of 4.8 to 7.2 and temperature of 4—60°C. The enzyme lost its activity rapidly when temperature > 65°C. The effects of metal ions on the enzyme were also studied. Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ and Fe³⁺ showed different degrees of activation effects on the NAGase. Na⁺, Li⁺ and Ba²⁺ had no influence on enzyme activity. Zn²⁺, Fe²⁺, Pb²⁺ and Hg²⁺ showed various degrees of inhibitory effects on the NAGase. Hg²⁺ inhibited the enzyme the most, and the enzyme activity decreased by 83.69% when its concentration reached 1.0 μmol/L. The essential groups of the NAGase were investigated using chemical modification method. The results demonstrated that essential groups of NAGase included lysine's ε-amidogen group, cysteine's sulfhydryl group, histidine's imidazolyl group, serine's hydroxyl group and tryptophan's indole group, while guanidyl of arginine was not an essential group of enzyme. Disulfide bond was essential for the catalytic activity of the enzyme. In conclusion, the purification scheme of NAGase from intestine of *Anguilla japonica* was effective and feasible. The activity of enzyme was affected easily by acidity-alkalinity, temperature and metal ions. The enzyme had similar essential groups to the NAGase from other animal sources.

Key words: Purification; Enzymatic characteristics; Essential group; N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase); *Anguilla japonica*