

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

黄小红 陈宏惠 黄一帆

(福建农林大学动物科学学院动物保健研究所, 福州 350002)

摘要: 本研究以中华绒螯蟹内脏为材料, 经过硫酸铵沉淀分级分离、两次 DEAE-32 离子交换柱层析和 Sephadex G-100 分子筛柱层析纯化, 获得比活力为 4490.79 U/mg、纯化倍数为 28.07 倍的聚丙烯酰胺凝胶电泳纯的 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶制剂。酶分子中各亚基的分子量分别为 121.21、98.63 和 73.48 kD, 等电点为 4.5。以对-硝基苯-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖为底物, 进行酶催化底物水解的反应动力学研究, 结果表明: 酶催化底物反应的最适 pH 为 5.5, 最适温度为 45℃。该酶在 pH 4.9—9.3 区域或 40℃ 以下处理 30min, 酶活力保持稳定。酶促反应动力学符合米氏双曲线方程, 测得米氏常数 K_m 为 0.357 mmol/L, 最大反应速度 V_m 为 10.41 μ mol/L·min。酶催化 pNP- β -D-GlcNAc 反应的活化能为 76.50 kJ/mol。金属离子对酶的效应试验表明: Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 对酶活力没有影响。 Na^+ 对酶有激活作用, Li^+ 、 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Al^{3+} 对酶活力表现出不同程度的抑制作用。

关键词: 中华绒螯蟹; N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶; 分离纯化; 动力学; 稳定性

中图分类号: Q556 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)04-0563-07

几丁质广泛分布于自然界中, 其储量仅次于纤维素居第二位, 是自然界中至关重要的有机碳源和氮源^[1]。几丁质在自然条件下的化学降解十分困难^[2], 它的催化降解和利用主要依赖于生物存在的几丁质酶系^[3]。几丁质酶系是由 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(β -N-Acetyl-D-glucosaminidase, 简称 NA-Gase, EC3.2.1.30)、几丁质内切酶和几丁质外切酶等三种不同组分组成的^[4]。它们协同作用将几丁质分解形成 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖。随着人类对几丁质的重视与开发利用, 国内外对几丁质酶系的研究也迅速发展起来。研究发现不同生物源的几丁质酶系具有不同的生物学功能。甲壳动物体内 NA-Gase 功能就是参与降解食物及周期性蜕壳等生理过程^[5,6]。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 又称毛蟹、河蟹, 属甲壳纲, 十足目, 方蟹科, 绒螯蟹属, 是我国特产。主要分布在中国东部海域沿岸及通海的河流、湖泊中。作为我国近几年来兴起的特种水产养殖品种, 河蟹的养殖面积在不断地增加, 已经成为我国增加农民收入的重要产业。由于集约化养殖过程水域超

负荷的运转、药物的滥用、水质重金属的污染, 尤其易于受到病原的侵扰而时有流行病的暴发, 造成养殖业巨大的经济损失。为此, 若能对中华绒螯蟹体内的生理生化状态进行研究, 弄清有关的酶与生长发育、疾病以及环境因素的关系, 就有可能避免这些危害的发生。国内外尚未见到有关中华绒螯蟹 NA-Gase 的研究报道。

本文以中华绒螯蟹内脏为材料, 分离纯化 NA-Gase 并对其性质进行了初步研究。这将为进一步研究 NA-Gase 提供基础数据; 为不同生物来源的几丁质酶系的性质和功能的比较研究提供借鉴; 为新几丁质酶资源的开发利用提供理论指导; 为人工养殖中华绒螯蟹提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 新鲜中华绒螯蟹购自福州西营里市场, 以内脏部分为提酶原料; 对硝基苯-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷(pNP- β -D-GlcNAc) 为上海医药工业研究院生化室产品; 标准对硝基酚(pNP) 为 England 产品; Sephadex G-100、DEAE-32 系 Amersham 和 What-

收稿日期: 2006-06-21; 修订日期: 2007-03-17

基金项目: 国家自然科学基金(30571257); 福建省教育厅科研基金(2005K32) 资助

通讯作者: 黄小红(1966—), 女, 汉族, 福建建瓯人; 教授, 博士; 主要从事动物生物化学方面的研究。E-mail: xhhuang@vip.sina.com

man 产品; SDS-聚丙烯酰胺凝胶平板电泳的标准蛋白采用 Amersham 高分子量 Marker; 牛血清蛋白为标准蛋白; 所有溶液均以重蒸水配制。

1.2 方法

NAGase 活力测定 酶活力的测定参照文献[7]的方法。酶活力单位(U)定义: 在 37℃ 条件下, 每升溶液中每分钟催化水解产生 1μmol pNP 所需的酶量。比活力定义为每毫克酶蛋白所具有的酶活力单位数。

蛋白浓度测定 采用 Folin-酚试剂法^[8]测定蛋白浓度, 以牛血清蛋白为对照。

酶的分离纯化 解剖取中华绒螯蟹活体内脏部分作为分离 NAGase 的材料。以 2.5:1 (V/W) 的比例加入 4℃ 下预冷的 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5 含 0.2 mol/L NaCl) 抽提 1h; 4℃ 下, 11000r/min 离心 30min 取上清液, 加入预冷的乙醇至 5% 抽提 24h; 4℃ 下, 11000r/min 离心 30min 取上清液, 透析除去乙醇。采用硫酸铵分级分离, 收集 35%—70% 饱和度的沉淀蛋白, 透析后得到粗酶制剂。进一步通过 DEAE-32 离子交换柱层析纯化, 以 NaCl 浓度梯度(0—1.5mol/L) 的 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱。柱规格为 3.0cm × 20cm, 流速为 10mL/h, 分部收集, 每管 2.5mL。活力峰通过 Sephadex G-100 分子筛凝胶过滤柱层析纯化, 采用 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5, 内含 0.2mol/L NaCl) 洗脱, 柱规格为 2.6cm × 60cm, 流速为 10mL/h, 自动分部收集, 每管 2.5mL。再通过 DEAE-32 离子交换柱层析纯化, 以 NaCl 浓度梯度(0—1.5mol/L) 的 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱。柱规格为 3.0cm × 20cm, 流速为 10mL/h, 分部收集, 每管 2.5mL。合并酶活性峰, 作酶活力分析用。

纯度鉴定 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳^[9]。

酶分子亚基分子量的测定 酶分子的亚基数及其分子量用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直板状电泳(SDS-PAGE)测定^[9]。

酶分子的等电点测定 用聚丙烯酰胺等电聚焦圆盘电泳(电泳管规格为 5mm × 100mm)测定 NAGase 的等电点^[9]。两性电解质的 pH 梯度为 3—9.5。

温度对酶活力的影响和酶的热稳定性 在 0.2mol/L 磷酸缓冲液(pH5.6)的测活体系中, 加入 20μL 酶液, 测定不同温度(10—65℃)下的酶的活力, 研究温度对酶活力的影响。

天然酶在不同温度(10—55℃)热处理 30min 后, 迅速冷却到室温, 然后取出 20μL 处理的酶液在

最适的测活体系(pH 5.6, 37℃)中检测酶的剩余活力。

pH 对酶活力的影响和酶的酸碱稳定性 在 37℃ 的测活体系中, 取 20μL 酶液, 测定不同 pH 下的酶促反应的初速度, 研究 pH 对酶催化底物 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的初速度的影响。

将等量的酶液与不同 pH 的缓冲液等量混合, 在室温下放置 24h 后, 取出 40μL 处理的酶液在 pH 为 5.6 的测活体系中测酶的剩余活力, 以酶活力对处理的 pH 作图, 分析酶的酸碱稳定性。

酶催化 pNP-β-D-GlcNAc 水解的动力学参数测定 在 37℃ 下, pH 5.6 的测活体系中, 改变底物(pNP-β-D-GlcNAc)浓度[S], 测定酶促反应的初速度(V_0), 以 V_0 对[S]作图, 在一定的浓度范围内呈典型的米氏双曲线关系, 以 $1/V_0$ 对 $1/[S]$ 作图, 从直线的截距求得 NAGase 催化底物水解的米氏常数 K_m 和最大速度 V_m 。

酶催化底物 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的活化能测定 在测活体系中, 改变底物浓度, 测定酶促反应的初速度, 按 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 求出酶促反应的最大速度(V_m)。在不同温度(30、35、37、40 和 45℃)下, 测定酶促反应的 V_m , 根据 Arrhenius 公式

$$\lg V_m = \text{Const} - \frac{E_a}{2.303R} \cdot \frac{1}{T}$$

R 为气体常数, 其值为 8.314(J/mol·K), 以最大反应速度之对数($\lg V_m$)对 $1/T$ (T 为绝对温度)作图, 得一直线关系, 从直线的斜率求出酶催化 pNP-β-D-GlcNAc 反应的活化能(E_a)。

金属离子对酶活力的影响 在 37℃ 含有 0.2mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.6)的测活体系中, 加入不同浓度的金属离子, 测定酶的相对活力, 分析它们对酶活力的影响。

2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化

中华绒螯蟹 NAGase 的纯化图谱见图 1—图 3。DEAE-32 离子交换柱层析纯化的活力峰在管号 329—341 之间。Sephadex G-200 分子筛柱层析纯化的活力峰在管号 39—45 之间。第二次 DEAE-32 离子交换柱层析纯化的活力峰在管号 81—89 之间。经各步分离纯化(表 1), 最终可得到纯化 28.07 倍, 比活力为 4490.79U/mg 的酶制剂。所得到的酶制剂经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一蛋白质成分(图 4C)。说明该酶制剂已达电泳纯。

表 1 中华绒螯蟹 NAGase 分离纯化
Tab. 1 Purification of the NAGase from *Eriocheir sinensis*

纯化步骤 Purification	总蛋白量 (mg) Total protein	总活力(U) Total activity	比活力(U/mg) Specific activity	纯化倍数 Recovery	得率(%) Purification
匀浆抽提液 Crude preparation	4004. 00	640500. 00	159. 97	1	100
乙醇抽提液 Extraction with 5% ethanol	3440. 642	630882. 48	183. 22	1. 15	98. 42
35% —70% 硫酸铵沉淀 35% —70% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	2189. 60	2189. 60	253. 03	1. 58	86. 50
DEAE-32	263. 19	137327. 74	521. 79	3. 26	21. 44
Sephadex G-100	40. 23	117894. 97	2930. 50	18. 31	18. 41
DEAE-32	14. 20	63769. 16	4490. 79	28. 07	9. 96

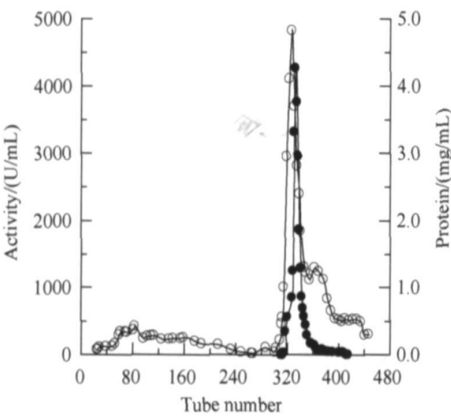


图 1 中华绒螯蟹 NAGase 的 DEAE-32 图谱
Fig.1 Purification chromatography of the NAGase on DEAE-32

●—酶活力 ○—蛋白浓度

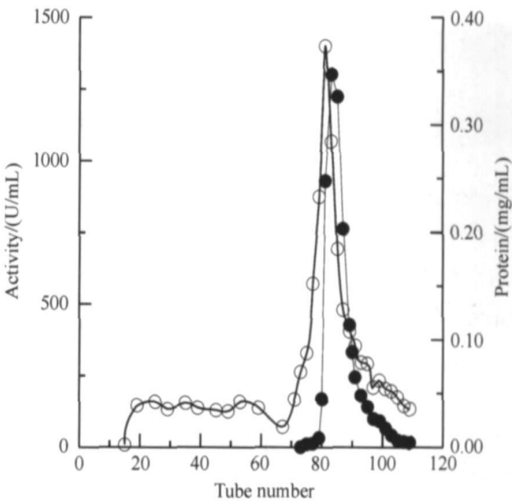


图 3 中华绒螯蟹 NAGase 的 DEAE-32 图谱
Fig.3 Purification chromatography of the NAGase on DEAE-32

●—酶活力 ○—蛋白浓度

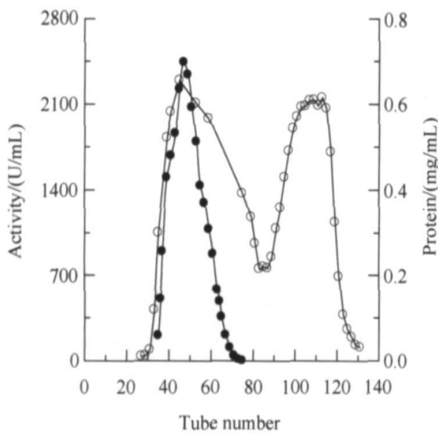


图 2 中华绒螯蟹 NAGase 的 G-100 图谱
Fig.2 Purification chromatography of the NAGase on Sephadex G-100

●—酶活力 ○—蛋白浓度

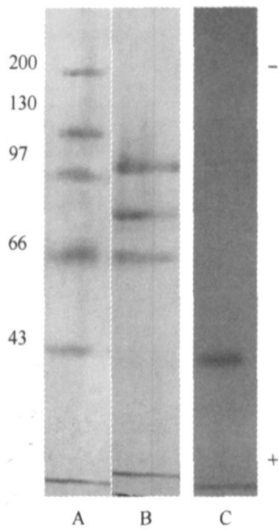


图 4 NAGase 的电泳图谱
Fig.4 SDS-PAGE and PAGE of the purified β-N-Acetyl-D-glucosaminidase
A:标准蛋白;B:样品;C:PAGE 的样品条带

2.2 酶分子的亚基分子量

纯酶经 SDS-PAGE 垂直板状电泳呈现三条的蛋白带(见图 4B), 根据标准蛋白(分子量分别为 200、130、97、66 和 43kD)的电泳迁移率(见图 4A)以及 NAGase 样品的迁移率, 可求得中华绒螯蟹内脏 NAGase 各亚基分子量分别为 121.21、98.63 和 73.48 kD。

2.3 酶的等电点

中华绒螯蟹 NAGase 经聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳, 测定标准胶条从阳极至阴极的 pH 梯度, 测定结果见图 5。根据测定胶上的酶蛋白位置, 测定酶蛋白相距阳极的距离, 换算成标准胶条上的相应位置, 从标准胶 pH 梯度曲线可以求得中华绒螯蟹 NAGase 酶分子的等电点 pI 为 4.5。

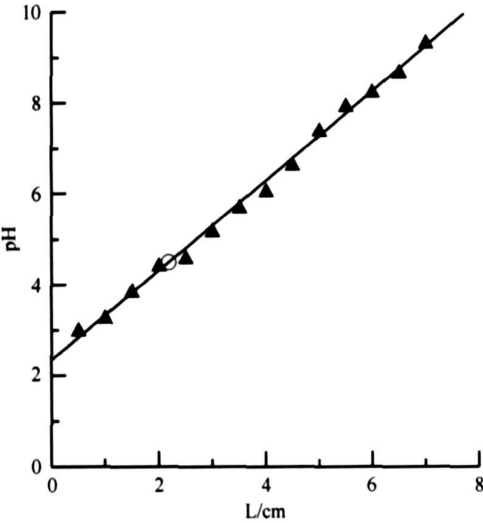


图 5 中华绒螯蟹 NAGase 等电点的测定

Fig. 5 Measurement of isoelectric point of the enzyme by isoelectric focusing electrophoresis

(▲) 标准胶条上每隔 0.5cm 的 pH 测定值, (○) 中华绒螯蟹 NAGase

2.4 温度对酶活力的影响和酶的热稳定性

在 0.2mol/L 磷酸缓冲液 (pH5.6) 的测活体系中, 加入 20μL 酶液, 测定不同温度 (10—65℃) 下的酶催化底物 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的初速度, 研究温度对酶活力的影响。结果(图 6a)表明, 酶的最适温度为 45℃。

天然酶在不同温度下 (10—55℃) 热处理 30min 后, 迅速冷却到室温, 然后取出 20μL 处理的酶液在最适的测活体系 (pH 5.6, 37℃) 中检测酶的剩余活力, 结果见图 6b, 表明中华绒螯蟹 NAGase 的温度稳定性很好。酶在 40℃ 以下处理 30min, 酶稳定性基本保持不变, 温度大于 45℃ 稳定性降低, 55℃ 酶完全失活。

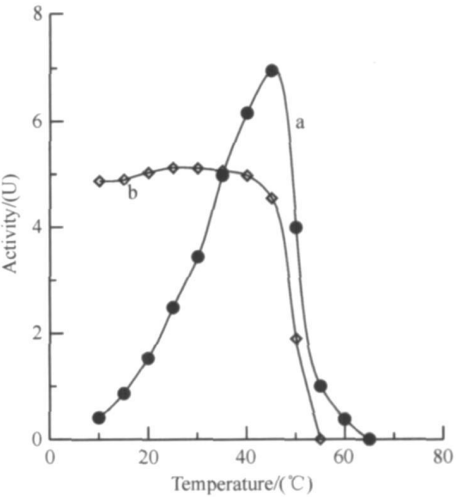


图 6 a. 温度对酶活力的影响; b. 酶的温度稳定性

Fig. 6 The effect of temperature on the enzyme activity (a) and the temperature stability (b)

2.5 pH 对酶活力的影响和酶的酸碱稳定性

在 37℃ 的测活体系中, 取 20μL 酶液, 测定不同 pH 下的酶促反应的初速度, 测定 pH 对酶催化底物 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的初速度的影响, 结果(图 7a)表明酶的最适 pH 为 5.5。

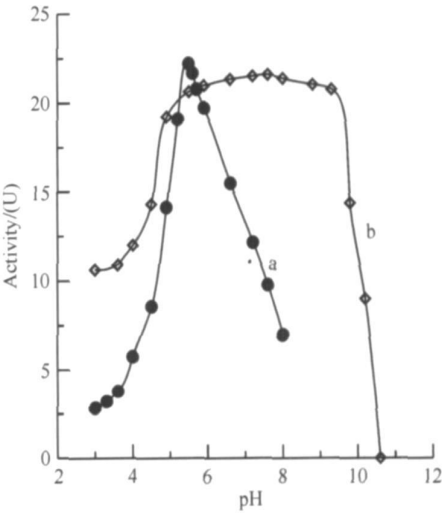


图 7 a. 为 pH 对酶的影响; b. 为酶的 pH 稳定性

Fig. 7 The effect of pH on the enzyme activity (a) and the pH stability (b)

将酶液与不同 pH 的缓冲液等量混合, 在室温下放置 24h 后, 取出 20μL 处理的酶液在 pH5.6 的测活体系中检测酶的剩余活力, 以酶活力对处理的 pH 作图, 分析酶的酸碱稳定性。结果(图 7b)表明该酶的酸碱稳定性范围较宽, 在 pH4.9—9.3 区域较稳定, 当 pH 小于 4.9 或 pH 大于 9.3 酶不稳定。

2.6 酶催化底物 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的动力学参数测定

在 pH 5.63 的 0.2mol/L 磷酸缓冲液的测活体系中,改变底物浓度,在 37℃下,测定中华绒螯蟹 NAGase 催化 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的初速度,以酶促反应初速度对底物浓度作图,当底物浓度小于 0.7mmol/L 时,呈典型双曲线关系。说明酶催化底物水解反应遵循 Michaelis-Menten 方程式。图 8 为中华绒螯蟹 NAGase 催化 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的 Lineweaver-Burk 双倒数作图,求得酶水解 pNP-β-D-GlcNAc 的 K_m 和 V_m 为 0.357mmol/L 和 10.41μmol/L·min。从图 8 的内插图可以看出:当底物浓度达到 0.5mmol/L 时反应速度达到最大,当底物浓度大于 0.7mmol/L 时反应速度开始下降。可见底物达到一定浓度后,底物对酶的催化水解反应表现出抑制作用。

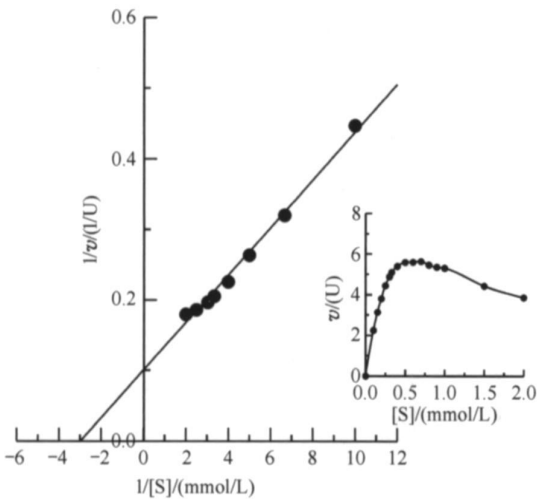


图8 中华绒螯蟹 NAGase 催化 pNP-β-D-GlcNAc 水解的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 8 The Lineweaver-Burk plot of NAGase for the hydrolysis of pNP-β-D-GlcNAc

内插图 为反应的初速度对底物浓度的双曲线关系
The inset shows the relationship between the initial rate and the substrate concentration

2.7 酶催化底物 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的活化能测定

在不同温度下测定酶催化 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的 V_m 值。根据 Arrhenius 公式,以最大反应速度之对数 $\lg V_m$ 对 $1/T$ 作图,得到一直线(图 9),直线的方程为 $Y = -3995.54 \cdot X + 13.919$,根据此方程计算出酶催化 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的活化能为 76.50kJ/mol。

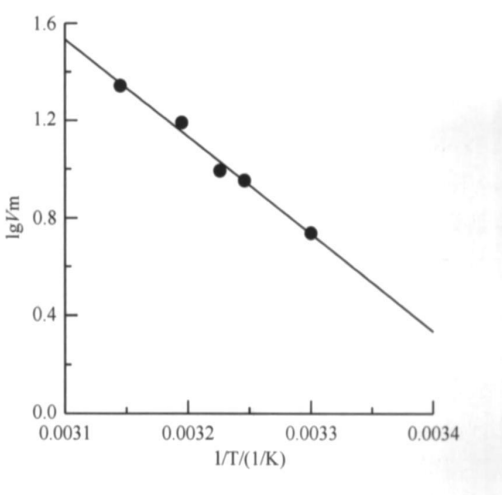


图9 酶催化底物 pNP-β-D-GlcNAc 水解反应的活化能测定
Fig. 9 Determination of the activation energy of the enzyme for the hydrolysis of pNP-β-D-GlcNAc

2.8 金属离子对酶活力的影响

金属离子对 NAGase 活力的影响见表 2。一价金属离子 Na^+ 对酶有激活作用, K^+ 和 Li^+ 对酶有轻度的抑制作用。二价离子 Zn^{2+} 对酶有抑制作用,而 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 对酶活力影响不大。三价离子 Al^{3+} 对酶活力有抑制作用。重金属 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 对酶有不同程度的抑制作用。

表 2 金属离子对 NAGase 活力的影响
Tab. 2 Effects of metal ions on the NAGase activity

化合物 Compound	浓度 Concentrations (mmol/L)	相对活力 Relative activity (%)
Control		100.0
NaCl	500.0	145.3
Li ₂ SO ₄	2.0	94.7
KCl	500.0	91.17
MgCl ₂	2.0	101.2
CaCl ₂	2.0	101.5
BaCl ₂	20.0	97.6
ZnSO ₄	20	50.8
AlCl ₃	0.6	40.2
HgCl ₂	0.04	1.84
Pb(NO ₃) ₂	20.0	34.7
CuSO ₄	1.0	49.2

3 讨 论

中华绒螯蟹的生长过程总是伴随着蜕壳而进行的,蜕壳是它生长发育的重要特征。中华绒螯蟹一生要经过数十次的蜕壳,只有顺利完成蜕壳之后体长和体重才得以迅速地增加。20 世纪 80 年代初,Arnould C 等注意到甲壳动物的周期性蜕壳过程与

几丁质酶系具有生理相关性, 蜕皮前, 几丁质酶系表达量明显有所增加, 以促进蜕皮, 而后, 酶表达量减少以抑制蜕皮。同时证明这种酶并非是由消化道中的细菌产生, 而是蟹、虾等甲壳动物自身合成的, 主要分布在消化液、腺体、体被、胃、肠等内脏器官^[10]。根据它的这一特性本试验选择中华绒螯蟹的内脏作为分离纯化 NAGase 的材料, 采用 pNP- β -D-GlcNAc 为底物, 跟踪分析提纯过程, 发现酶制剂能够水解 pNP- β -D-GlcNAc, 证明提纯的酶是 NAGase。用本文的分离纯化方法获得比活力为 4490.79U/mg, 回收率为 9.96%, 纯化了 28.07 倍的酶制剂, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为单一蛋白质成分, 这一结果显示分离纯化酶的方法是有效可行的。酶的分离纯化过程是对其展开全面研究的分子基础, 这将为进一步探讨酶的结构与功能、酶与中华绒螯蟹生长发育、疾病及环境因素之间相关性奠定重要的研究基础。

中华绒螯蟹 NAGase 的最适 pH 为 5.5, 其酸碱稳定性的范围较宽, 在 pH 4.9—9.3 区域较稳定。总结已报道的研究结果发现, 来源于果蝇^[11]、家蚕^[12]、棉铃虫^[7]等昆虫以及招潮蟹^[13]、日本对虾^[14]、磷虾^[15]、水蚤^[16]、美国龙虾^[17]等甲壳动物的 NAGase 具有相似的化学特性。其最适 pH 范围都在 5.0—6.0 之间, 说明了来源于昆虫和动物的酶具有酶学性质的相似性。而微生物源的几丁质内切酶和 NAGase 的这方面的性质差异较大。据统计, 微生物产几丁质酶系的最适 pH 多在 3.0—11.0 之间^[18]。苏金芽孢杆菌的最适 pH 为 5.6, 酸碱稳定性在 pH 4.5—6.5 之间稳定^[19], 黄蓝状菌几丁质酶的最适 pH 为 5^[20]。Ohtakara 从 *Vibrio* sp. (弧菌属) 的培养液中得到一种碱性几丁质酶在 pH 9—11 范围内稳定^[21]。不同生物来源的 NAGase 差异较大, 原因可能是不同生物所产生的酶, 分子结构不同, 特别是酶活性中心构象和微环境的特殊, 导致最适 pH 不一致, 酶分子保持稳定的 pH 范围也有差异。酶的最适 pH 不是一个常数, 它的大小随底物的种类和浓度、缓冲液的特性、浓度、离子强度、温度、反应时间而变化。因此, 在测定酶的活力时, 应该在最适 pH 的条件下进行, 并且用适当的缓冲液维持反应的最适 pH 条件。

中华绒螯蟹 NAGase 的最适温度仅为 45℃, 当温度小于 40℃时, 该酶稳定性基本不变, 温度高于 45℃稳定性降低, 55℃酶完全失活。这符合中华绒螯蟹怕热不怕冷的生物学特点。

K_m 是酶的一个重要的动力学特征常数。中华绒螯蟹 NAGase 酶促反应动力学符合米氏双曲线方程, 酶

水解 pNP- β -D-GlcNAc 的 K_m 为 0.357mmol/L。比棉铃虫蛹的 NAGase 的米氏常数 (0.16mmol/L) 大^[7], 比家蚕消化管 NAGase 的 K_m (0.787mmol/L)^[22] 和南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 的 K_m (0.254mmol/L) 小^[24], 说明中华绒螯蟹 NAGase 对底物 pNP- β -D-GlcNAc 的亲合力比家蚕和南美白对虾的酶大。

各种金属离子对中华绒螯蟹 NAGase 的效应实验表明, NaCl 对酶有激活作用。河蟹在淡水中栖息生长和肥育, 当性腺发育到一定程度时, 就洄游至河口浅海交配繁殖。幼体发育到大眼幼体阶段, 再回归淡水。本试验的结果可能与它的这种生物学习性有关。但是 NaCl 不会影响南美白对虾 NAGase 活力^[23]。这可能与南美白对虾生活在 28%—34% 盐度的海水中, 机体在长期进化过程中, 逐渐适应了海水高 Na^+ 的环境, 形成了严密的调控机制有关。虽然 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Ba^{2+} 是许多酶的激活剂^[24], 但它们对中华绒螯蟹和棉铃虫^[25] 的 NAGase 影响不显著。 K^+ 、 Li^+ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Al^{3+} 对酶有不同程度的抑制。这与 Koga 等研究的结果有所不同^[12]。可见不同的金属离子对酶活性的影响各不相同, 即使是同一种的金属离子对不同生物来源的酶所表现出来的作用也不相同。金属离子对酶发挥作用的机理, 有待于进一步的探索。

参考文献:

- [1] Leake J R, Read D J. Chitin as a nitrogen source for mycorrhizal fungi [J]. *Mycological. Res.*, 1990, **94**: 993—995
- [2] Austin P R. Chitin, chitosan and related enzymes [M]. New York: Academic Press, 1984
- [3] Keyhani N O, Roseman S. The chitin catabolic cascade in the Marine bacterium *Vibrio furnissii* [J]. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271** (52): 33425—33432
- [4] Broadway R M, Williams D L, Kahn W C, et al. Partial characterization of chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidiflavus* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, **20**: 271—276
- [5] Funke B, Spindler K D. Characterization of chitinase from the Brine Shrimp *Artemia* [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1989, **94B** (4): 691—695
- [6] Kono M, Matsui T, Shimizu C, Koga D. Purifications and some properties of chitinase from the liver of a Prawn, *Penaeus japonicus* [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1990, **54** (8): 2145—2147
- [7] Huang X H, Chen Q X, You M S, Wang J, Guan X. Isolation, purification and partial characterization of the β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from the pupae of *Helicoverpa armigera* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2005, **48** (4): 498—502 [黄小红, 陈清西, 尤民生, 王君, 关雄. 棉铃虫 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. 昆虫学报, 2005, **48** (4): 498—502]
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the

- Folin phenol reagent [J]. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**: 265—269
- [9] Li J W, Xiao N G, Yu L Y, *et al.* Principle and method of biochemistry [M]. Beijing: University of Beijing Press, 1997 [李建武, 萧能庚, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1997]
- [10] Arnould C, Jeuniaux C. Les enzymes hydrolytiques du système digestif des les Crustacés Pagurides [J]. *Cash Biol.*, 1982, **23**: 89—103
- [11] Spindler K D. Initial characterization of chitinase and chitinase from the integument of *Drosophila hydei* [J]. *Insect Biochem.*, 1976, (6): 663—667
- [12] Koga D, Nakashima M, Matsukura T, *et al.* Purifications and some properties of β-N-Acetyl-D-glucosaminidase from alimentary canal of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1986, **50**(9): 2357—2368
- [13] Sabrowski R, Buchholz F. A laboratory study on digestive processes in the Antarctic krill, *Euphausia superba*, with Special regard to chitinolytic enzymes [J]. *Polar Biol.*, 1999, **21**: 295—304
- [14] Tsou C L. Kinetics of substrate reaction during irreversible modification of enzyme activity [J]. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1988, **61**: 381—436
- [15] Koga D, Hoshika H, Matsushita M, *et al.* Purification and characterization of β-N-acetyl hexosaminidase from the liver of a prawn, *Penaeus japonicus* [J]. *Biosci. BioChem.*, 1996, **60**(2): 194—199
- [16] Spindler K D, Buchholz F. Partial characterization of chitin degrading enzymes from two euphausiids, *Euphausia superba* and *Meganyctiphanes norvegica* [J]. *Polar. Biol.*, 1988, (9): 115—122
- [17] Espie P J, Ro J C. Characterization of chitinase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux [J]. *Physiol. Zool.*, 1995, **68**: 727—748
- [18] Sun S L, Yu Z N, Jia X C. Advance in study and application on chitinase produced by microbes [J]. *Journal of Microbiology*, 2002, **22** (5): 47—50 [孙胜利, 喻子牛, 贾新成. 微生物产几丁质酶的研究和应用进展. 微生物学杂志, 2002, **22**(5): 47—50]
- [19] Huang X H, Chen Q X, Wang J, *et al.* Isolation, purification and some properties of the chitinase from *Bacillus thuringiensis* [J]. *Chin J Appl Environ Biol.*, 2004, **10** (6): 771—773 [黄小红, 陈清西, 王君, 等. 苏云金芽孢杆菌几丁质酶的分离纯化及酶学性质. 应用与环境生物学报, 2004, **10**(6): 771—773]
- [20] Chen S, Li D C, Liu K Q, *et al.* Purification, properties and antifungal activity of chitinase produced by *Talaromyces flavus* [J]. *Forest Pest and Disease*, 2003, **22**(3): 6—9 [陈述, 李多川, 刘开启, 等. 黄蓝状菌一种几丁质酶的纯化、性质及抗菌活性. 中国森林病虫, 2003, **22**(3): 6—9]
- [21] Ohtakara A, Mitsutani M, Uchida Y. Purification and some properties of chitinase from *Vibrio* sp. [J]. *J. Ferment. Technol.*, 1979, **57**(3): 169—177
- [22] Koga D, Shinazaki C, Yamamoto K, *et al.* β-N-Acetyl-D-glucosaminidases from integument of the silkworm, *Bombyx mori*: comparative biochemistry with the pupal alimentary canal enzyme [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1987, **51**(6): 1679—1681
- [23] Xie X L, Chen Q X, Lin J C, Wang Y. Purification and some properties of β-N-Acetyl-D-glucosaminidase from Prawn (*Penaeus vannamei*) [J]. *Marine Biology*, 2004, **146**(1): 143—148
- [24] Chen Q X, Zheng W Z, Lin J Y, *et al.* Effect of metal ions on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, **32**(8): 879—885
- [25] Wang J, Huang X H, Chen Q X. Effects of metal ions on the activity of β-N-Acetyl-D-glucosaminidase from the pupae of *Helioverpa armigera* [J]. *Journal of Xiamen University*, 2005, **44**(6): 843—846 [王君, 黄小红, 陈清西, 金属离子对棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响. 厦门大学学报, 2005, **44**(6): 843—846]

PRELIMINARY STUDIES ON ISOLATION, PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF THE β-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINIDASE FROM *ERIOCHEIR SINENSIS*

HUANG Xiao-Hong, CHEN Hong-Hui and HUANG Yi-Fan

(Institute of Animal Health, College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: A β-N-Acetyl-D-glucosaminidase (EC3.2.1.30) was purified from the viscera of *Eriocheir sinensis* by ammonium sulfate fractionation, chromatography on DEAE-32, Sephadex G-100 and DEAE-32. The purified enzyme preparation was homogeneous as judged by polyacrylamide gel electrophoresis. The specific activity of the enzyme was 4490.79U/mg. The molecular weight of the subunits was determined to be 121.21, 98.63 and 73.48kD, respectively. The pI value was calculated to be 4.5 by isoelectric focusing. The optimum temperature and pH of the enzyme for the hydrolysis of p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (pNP-NAG) were determined to be at 45 °C and at pH 5.5, respectively. The enzyme was stable in the pH ranges of 4.9 to 9.3 under 37 °C and at temperatures below 40 °C. The enzyme follows typical Michaelis-Menten kinetics for the hydrolysis of pNP-β-D-GlcNAc. The K_m and V_m values were determined to be 0.357mmol/L and 10.41μmol/L·min at pH 5.6 and 37 °C, respectively. The activation energy of the enzyme for the hydrolysis of pNP-β-D-GlcNAc was to be 76.50kJ/mol. The effects of metal ions on the enzyme were studied. Mg^{2+} , Ca^{2+} and Ba^{2+} had not influenced the enzyme activity. Na^+ activated the enzyme, while, Li^+ , K^+ , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , and Al^{3+} showed various degrees of inhibitory effects on the enzyme.

Key words: *Eriocheir sinensis*; β-N-Acetyl-D-glucosaminidase; Isolation and purification; Kinetics; Stability