

# 中国明对虾体壁 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质

林建城, 林大河, 林秀春

(莆田学院 环境与生物工程学院, 福建 莆田 351100)

**摘要:** 为了探讨对虾 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶(EC3.2.1.52, NAGase)的分离纯化及其酶学性质, 作者以中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)体壁为材料, 通过硫酸铵沉淀分级分离、SephadexG-100 柱层析和 DEAE-32 离子交换柱层析纯化, 获得聚丙烯酰胺凝胶电泳纯的 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶酶制剂, 纯化酶比活力为 3938.56U/mg。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳, 测得该酶亚基分子量为 48.88 kD。酶的最适 pH 为 6.0, 最适温度为 45℃; 该酶在 pH 6.0~9.0 区域较稳定, 温度稳定性范围是 20~35℃, 45℃ 下处理 1 h 酶活力丧失 65.04%。酶水解对硝基苯-N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷的  $K_m$  为 0.229 mmol/L,  $V_{max}$  为 5.00  $\mu$ mol/(L·min)。进一步研究金属离子对酶活力的影响, 结果表明:  $Li^+$ 、 $Na^+$  和  $Ba^{2+}$  对酶没有明显影响,  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  和  $Al^{3+}$  对酶均有不同程度的激活作用,  $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Pb^{2+}$  对酶呈抑制作用, 1.0 mmol/L  $Hg^{2+}$ 对酶呈激活作用, 而 10 mmol/L  $Hg^{2+}$ 使酶活力降低 42.37%。

**关键词:** 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*); 体壁; N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶; 分离纯化; 酶学性质

中图分类号: Q556.1 文献标识码: A  
doi: 10.11759/hyxx20130706001

文章编号: 1000-3096(2014)08-0052-07

几丁质酶系是由内切几丁质酶、外切几丁质酶和 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖苷酶(EC3.2.1.52, NAGase)等 3 种不同组分组成的, 它们协同作用将多聚壳聚糖分解产生 N-乙酰- $\beta$ -D-氨基葡萄糖。NAGase 主要通过对几丁质外切生成  $\beta$ -N-乙酰葡萄糖胺单体和寡聚糖, 最后将几丁二糖降解为单体<sup>[1]</sup>。近年来, 人们已注意到几丁质酶和 NAGase 的生理过程与甲壳动物在生长发育过程中的周期性蜕皮是密切相关的<sup>[2]</sup>。在对虾的生活史中要经过多次蜕皮, 现已证实虾眼柄中 X 器官-囊腺复合体制造和分泌的一种多肽类蜕皮抑制激素参与调节对虾的蜕皮过程, 同时对虾表皮分泌的几丁质酶在虾幼体孵化中起重要作用<sup>[3]</sup>。

从原生动物、软体动物和节肢动物中均已分离到 NAGase<sup>[4-6]</sup>。目前, 主要集中在对昆虫和甲壳动物两类节肢动物 NAGase 的研究, 自 Koga 等<sup>[7]</sup>比较研究了蚕(*Bombyx mori*)内脏与体壁 NAGase 的功能与理化性质后, Shi 等<sup>[8]</sup>又从菜青虫(*Pieris rapae*)分离到 NAGase, 阐明了环境因素对菜青虫 NAGase 活力的影响。此后, 从凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)<sup>[9]</sup>、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)<sup>[10]</sup>和锯缘青蟹(*Scylla serrata*)<sup>[11]</sup>等虾蟹类中分别提取分离到 NAGase, 并

阐明其酶学性质。Peters 等<sup>[6]</sup>研究表明了分布在南极磷虾(*Euphausia superba*)。

表皮层的 NAGase 与虾蜕皮生长有关; 颜雅雯等<sup>[11]</sup>比较了不同季节锯缘青蟹内表皮 NAGase 活力的变化趋势, 从水环境温度和酶活力变化相关性研究了 NAGase 在蟹蜕皮中的作用, 这些研究逐步揭示了 NAGase 在甲壳动物周期性蜕皮生理过程中的重要作用。而中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)经济价值较高, 对虾体壁(外壳膜)NAGase 在虾蜕皮生理过程中也可能直接参与并起主要作用, 目前国内有关中国明对虾几丁质酶的研究尚未见报道。作者分离纯化了中国明对虾体壁 NAGase, 并探讨了 NAGase 的酶学性质, 这对于阐明中国对虾体壁 NAGase 活力的调控机理, 进一步揭示对虾周期性蜕皮的生理机制具有重要意义。

收稿日期: 2013-07-06; 修回日期: 2014-01-12

基金项目: 福建省高校服务海西重点建设资助项目(2008HX02); 福建省教育厅科技项目(JB04175); 莆田学院科研基金资助项目(2004031)

作者简介: 林建城(1966-), 男, 福建莆田人, 教授, 硕士, 主要从事海洋生物酶学的教学和工作, 电话: 0594-2680136, E-mail: ptljc660-402@sina.com

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

以中国明对虾体壁为提酶原料,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,Sephadex G-100 是 Pharmacia 产品,DEAE-32 系 Whatman 分装,牛血清蛋白为标准蛋白,低分子量标准蛋白(碱性磷酸酶 b 98.0 kD,牛血清白蛋白 66.0 kD,卵清白蛋白 47.0kD,碳酸酐酶 30.0kD,胰蛋白酶抑制剂 22.0 kD和α-乳白蛋白 14.4 kD)为天根生化科技有限公司出品。其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酶的分离纯化

参照文献[9]方法,略加修改如下:解剖挑取对虾活体体壁部分,加入 1:3(W/V)预冷 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=7.4),高速捣碎匀浆 1 min,置 4 °C 下抽提过夜后,于 4 °C 下离心(18 000×g)30 min,取上清液。依次采用 35%、70%饱和度硫酸铵分级分离酶蛋白,收集沉淀物,并用 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液透析,冷冻离心(20000×g)得粗酶制剂。进一步经过 Sephadex G-100 分子筛凝胶柱层析(柱规格为 2.6 × 60 cm)和 DEAE-32 离子交换柱层析(柱规格 1.6 × 40 cm)纯化。分子筛柱层析的洗脱液采用 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4),内含 0.2 mol/L NaCl,洗脱过程每 10 min 收集一管,洗脱液流速为 0.4 mL/min;离子交换柱层析采用 NaCl 浓度从 0~1.0 mol/L 直线梯度洗脱,洗脱液也是 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)。

#### 1.2.2 蛋白浓度测定

采用 Bradford<sup>[12]</sup>的方法进行,以牛血清蛋白为标准蛋白做标准曲线;紫外吸收  $A_{280\text{nm}}$  表示分离纯化过程蛋白质含量。

#### 1.2.3 酶纯度鉴定

经聚丙烯酰胺凝胶电泳检定,确定酶的纯度。

#### 1.2.4 分子量的测定

单一纯酶蛋白经 SDS-PAGE 电泳,分离胶浓度是 12.5%,浓缩胶浓度为 3.75%,考马斯亮蓝 R250 染色,其迁移率比照标准蛋白的分子量,求得酶蛋白的亚基分子量。

#### 1.2.5 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力测定

酶活力的测定方法参照文献[5],并略加修改如下:以 pNP-β-D-GlcNAc 为底物,在 2 mL 的测活体

系中含终浓度为 0.075 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0)缓冲液,0.2 mmol/L 的底物,加入 20 μL 酶液,37 °C 下准确反应 10 min,以 2 mL 0.5 mol/L NaOH 终止反应。在 Spectrum752 型紫外可见分光光度计测定光密度值( $A_{405\text{nm}}$ )。以硝基酚(pNP)为产物对照,测得摩尔消光系数<sup>[5]</sup>为  $1.73 \times 10^4$  mol/(L·cm)。酶活力单位(U)定义:在上述条件下,每分钟催化水解产生 1 μmol/L 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(U)。

#### 1.2.6 pH 对 NAGase 活力影响的测定

在酶测活体系中,检测不同 pH (3.6~10.0)下的 NAGase 活力,确定酶最适 pH,其中 pH 3.6~5.8 选择 HAc-NaAc 缓冲液,pH 5.8~8.0 使用  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液,pH 9.0~10.0 采用硼砂缓冲液,浓度均为 0.075 mol/L。然后,将酶液分别与不同 pH 的缓冲液混合,在 4 °C 下处理 1 h,在最适条件下测定各自的剩余酶活力(%),分析酶的酸碱稳定性范围。

#### 1.2.7 温度对 NAGase 活力影响的测定

在酶测活体系中,检测不同温度(20~90 °C)下的 NAGase 活力,确定其最适温度。再将酶液预先置于不同温度下处理 1 h 后,取一定量处理过的酶,在最适温度下检测其剩余酶活力(%),分析酶的温度稳定性范围。

#### 1.2.8 NAGase 米氏常数( $K_m$ )的测定

在酶测活体系中,改变底物 pNP-β-D-GlcNAc 浓度(0.1~0.5 mmol/L),测定其酶活力,研究底物浓度对 NAGase 活力的影响,采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求得  $K_m$  和最大反应速度( $V_m$ )。

#### 1.2.9 金属离子对 NAGase 活力的影响

在酶测活体系中分别加入一定浓度的不同金属离子,测定相对酶活力(%),分析金属离子对酶的影响。

本试验采用数理统计方法对 3 组重复数据求其均值,误差处理采用标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 NAGase 的分离纯化

中国明对虾体壁 NAGase 纯化过程经过抽提、35%和 70%饱和度硫酸铵的分级分离、透析离心后得到粗酶制剂。进一步经过 Sephadex G-100 分子筛柱层析分离纯化(图 1),收集酶活力峰,再经 DEAE-32 纤维素离子交换柱层析分离,图谱见图 2,最终得到比活力为 3938.56 U/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 3),

说明该酶制剂已达电泳纯。

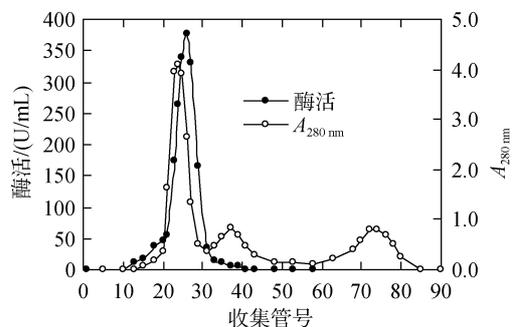


图 1 中国明对虾体壁 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的 Sephadex G-100 柱层析图谱

Fig.1 Purification of NAGase from the integument of *Fenneropenaeus chinensis* by Sephadex G-100 column

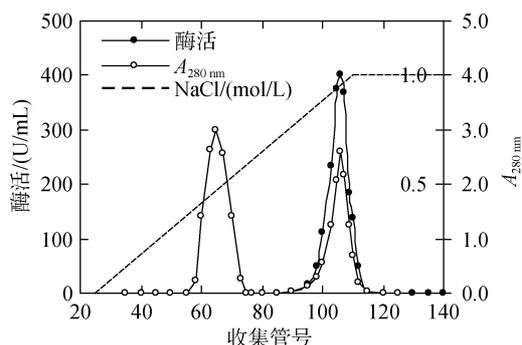


图 2 中国明对虾体壁 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的 DEAE-32 柱层析图谱

Fig.2 Purification of NAGase from the integument of *Fenneropenaeus chinensis* by DEAE-cellulose

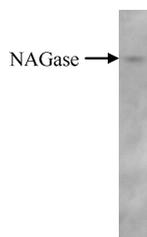


图 3 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的 PAGE 图谱

Fig.3 Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified NAGase

箭头指示 NAGase

The arrow indicates the band of NAGase

## 2.2 NAGase 亚基分子量

单一纯酶蛋白再经 SDS-PAGE 电泳(图 4), 根据酶蛋白与标准蛋白经电泳后的迁移率  $R_f$ , 用  $R_f$  对  $\lg M_w$  进行作图, 得一直线, 直线方程为:  $y = -1.646x + 5.207$ 。求得 NAGase 的  $\lg M_w = 4.859$ , 从而求得纯化后 NAGase 亚基分子量为 48.88 kD(图 4)。

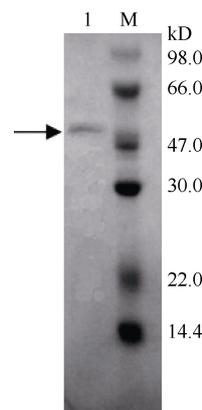


图 4 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig.4 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of the purified NAGase

M. 蛋白预染 Marker; 泳道 1. NAGase

Lane M. Protein molecular weight marker; Lane 1. NAGase

## 2.3 NAGase 的最适 pH 与酸碱稳定性

测定酶在不同 pH 下的酶活力大小, 结果见图 5, 结果显示 NAGase 的最适 pH 为 6.0。然后, 将等量的酶液与不同 pH 的缓冲液等量混合, 4 °C 下放置 60 min, 然后取出一定量处理的酶液, 在最适测活体系中检测酶的剩余酶活力, 结果表明(图 5): 酶在 pH 6.0~9.0 较稳定, 剩余酶活力保持在 90% 以上, 在 pH <6.0 的环境下, 酶活力迅速下降, 说明中国明对虾 NAGase 在碱范围内适应性较广。

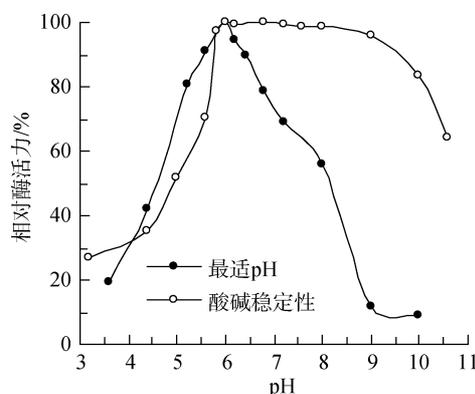


图 5 pH 对中国明对虾体壁 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶活力的影响

Fig.5 Effects of pH on the activity of NAGase from the integument of *Fenneropenaeus chinensis*.

## 2.4 NAGase 的最适温度与热稳定性

酶的最适温度测定结果见图 6, 该酶的最适温度是 45 °C, 在 20~45 °C, 随着温度的升高, 酶活力逐渐增大; 当温度大于 45 °C 时, 随着处理温度的升

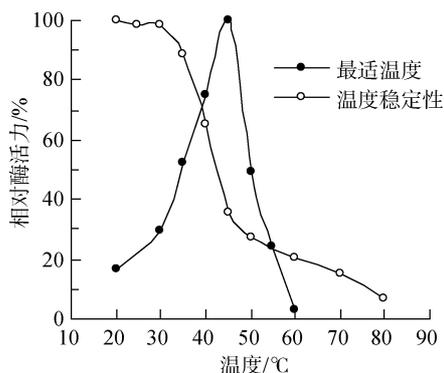


图 6 温度对中国明对虾体壁 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶活力的影响

Fig.6 Effects of temperature on the activity of NAGase from the integument of *Fenneropenaeus chinensis*

高, 酶活力迅速下降。

将天然酶在不同温度下热处理 60 min 后, 迅速冷却到室温, 然后取出一定量处理的酶液, 在最适的测活体系中检测酶的剩余酶活力, 结果表明(图 6): 酶在 20~35 °C 范围内较稳定, 在 45 °C 下处理 1 h, 酶活力丧失 65.04%; 在 80 °C 中处理 1 h, 酶接近完全失去活性, 说明中国明对虾 NAGase 对温度较为敏感。

### 2.5 NAGase 催化底物水解反应的动力学参数

在测活体系中, 改变底物浓度, 测定酶促反应的初速度, 结果表明: 酶促反应初速度与底物浓度呈典型双曲线关系, 说明酶催化底物水解反应遵循 Michaelis-Menten 方程式。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图(图 7), 直线方程为:  $y=0.046x+0.200$ , 求 NAGase 水解 pNP-β-D-GlcNAc 的  $K_m=0.229$  mmol/L,

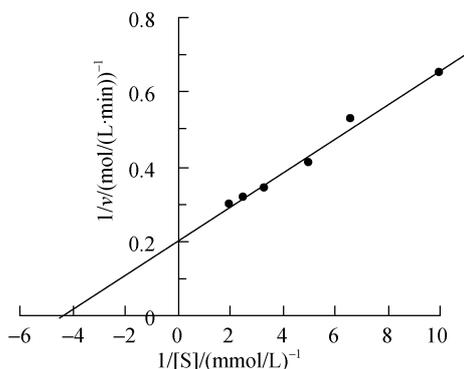


图 7 中国明对虾体壁 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶催化 pNP-β-D-GlcNAc 水解的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig.7 The Lineweaver-Burk plot of NAGase for the hydrolysis of pNP-β-D-GlcNAc

$V_{max}=5.00$  μmol/(L·min)。

### 2.6 金属离子对 NAGase 酶活力的影响

先选用 NaCl、NaNO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为效应物, 检测了一价金属离子对 NAGase 活力的影响, 结果表明(表 1): Na<sup>+</sup> 和 Li<sup>+</sup> 对该酶活力没有影响, 同时, Cl<sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 等无机酸根离子对酶活力也没有影响。以另外 11 种金属离子化合物为效应物, 检测其对酶活力的效应。结果表明(表 1): Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>在一定浓度下对酶有不同程度的激活作用, Fe<sup>3+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>对酶的激活作用较强, 0.1 mmol/L 的 Fe<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup>可分别使酶活力提高 12.98%、51.69%; Ba<sup>2+</sup>对酶活力没有明显影响, Pb<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>对酶活力有不同程度的抑制作用, 较高浓度 Cu<sup>2+</sup>对酶有抑制作用, 0.5 mmol/L Cu<sup>2+</sup>可使酶活力下降 47.73%; 而 Hg<sup>2+</sup>离子在 1.0 mmol/L 浓度下对酶呈激活现象, 10.0 mmol/L 又可使酶活力下降 42.37%。

## 3 讨论与结论

### 3.1 NAGase 的生理功能

目前, 对海洋动物 NAGase 的研究主要集中在分离纯化及酶学性质上<sup>[5, 9, 13]</sup>, NAGase 主要分布于这些动物的内脏组织及甲壳动物的体壁, 同种动物不同部位来源的酶等电点、分子量、亚基数等酶学性质也有差异, 对不同部位的 NAGase 的分泌及生物功能具有不同的认识。Meyer 等<sup>[14]</sup>对南极磷虾 (*Euphausia superba*) 表皮几丁质酶研究发现, 虾蜕壳前体液中蜕皮激素浓度升高, 酶表达量随之明显增加; Peters 等<sup>[6]</sup>也认为分布在南极磷虾表皮层的 NAGase 受蜕皮激素调节, 与其蜕皮生长相关, 而分布在内脏的 NAGase 主要功能是消化含几丁质的食物, 它与蜕皮生长无关; Koga 等<sup>[7]</sup>对蚕体壁 NAGase 的研究也具有类似的结果。说明节肢动物周期性蜕皮可能是在蜕皮激素调节下表皮层的几丁质酶大量合成从而促进对甲壳质降解的一个生理过程。黄乾生等<sup>[15]</sup>研究发现不同生长期凡纳滨对虾外壳膜与内脏的 NAGase 含量均存在较大差异, 与对虾蜕壳过程的特点相符, 认为幼虾酶活力高是蜕壳较频繁缘故; 同样, 锯缘青蟹<sup>[11]</sup>在生长及蜕皮发育的适宜季节其内表皮 NAGase 活力较高, 可能与这几个月 (10~12 月)水温适宜青蟹蜕壳紧密相关的。但 Zou 等<sup>[2]</sup>对招潮蟹 (*Uca pugilator*) 几丁二糖酶的研究表明,

表 1 金属离子对 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响

Tab.1 Effects of metal ions on the activity of NAGase from *Fenneropenaeus chinensis*

| 化合物                             | 浓度 (mmol/L) | 相对活力 (%)    | 化合物                               | 浓度 (mmol/L) | 相对活力 (%)    |
|---------------------------------|-------------|-------------|-----------------------------------|-------------|-------------|
| 对照组                             | —           | 100.00      | 对照组                               | —           | 100.00      |
| NaCl                            | 10.0        | 99.68±0.34  | AlCl <sub>3</sub>                 | 0.1         | 103.05±0.70 |
| NaNO <sub>3</sub>               | 10.0        | 100.04±0.06 |                                   | 0.5         | 109.31±1.60 |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 10.0        | 99.86±0.26  | MnCl <sub>2</sub>                 | 0.05        | 130.48±1.33 |
| Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 10.0        | 99.19±0.43  |                                   | 0.1         | 151.69±1.99 |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0.1         | 103.65±0.48 | CoCl <sub>2</sub>                 | 1.0         | 102.43±0.40 |
|                                 | 0.5         | 112.71±1.33 |                                   | 10.0        | 117.75±0.97 |
| CaCl <sub>2</sub>               | 0.1         | 101.04±0.62 | ZnSO <sub>4</sub>                 | 1.0         | 87.24±1.28  |
|                                 | 0.5         | 107.88±1.17 |                                   | 10.0        | 72.49±1.32  |
| BaCl <sub>2</sub>               | 0.1         | 100.88±0.34 | Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 1.0         | 99.38±0.45  |
|                                 | 0.5         | 99.21±0.40  |                                   | 10.0        | 83.12±1.68  |
| Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.1         | 104.22±0.89 | HgCl <sub>2</sub>                 | 1.0         | 138.92±1.56 |
|                                 | 0.5         | 52.27±1.75  |                                   | 10.0        | 57.63±1.53  |
| FeCl <sub>3</sub>               | 0.1         | 112.97±0.99 |                                   |             |             |
|                                 | 0.5         | 156.80±1.71 |                                   |             |             |

该酶主要功能是协助几丁质酶降解含几丁质的食物及参与调节周期性蜕壳过程,分布在体壁及内脏组织的几丁二糖酶虽在形式上有差别,而与蜕壳生长也都密切相关。

### 3.2 NAGase 的基本性质

比较中国明对虾体壁 NAGase 与凡纳滨对虾<sup>[9]</sup>内脏 NAGase 的酶学特性,结果表明:中国明对虾体壁来源的 NAGase 亚基分子量为 48.88 kD、米氏常数  $K_m$  值为 0.229 mmol/L,与凡纳滨对虾内脏 NAGase 的亚基分子量 45.00 kD、 $K_m$  为 0.254 mmol/L 相近;而菜青虫<sup>[8]</sup>NAGase 是由两个分子量为 59.50 kD 和 57.20 kD 的不同亚基组成, $K_m$  为 0.385 mmol/L;家蚕<sup>[7]</sup>消化道 NAGase 也是由两个亚基组成,分子量分别为 67.50 kD 和 57.50 kD, $K_m$  是 0.787 mmol/L;黄小红等<sup>[10]</sup>研究的中华绒螯蟹内脏 NAGase 是由分子量分别为 121.21、98.63 和 73.48 kD 的 3 个亚基组成, $K_m$  是 0.357 mmol/L。说明明对虾 NAGase 亚基分子量相对较小, $K_m$  值也较小,即酶对底物(pNP-β-D-GlcNAc)亲和力较大。

pH 对 NAGase 影响的试验结果表明:中国明对虾体壁 NAGase 最适 pH 为 6.0,高于凡纳滨对虾<sup>[16]</sup>外壳膜 NAGase 的最适 pH (5.5)和中华绒螯蟹<sup>[10]</sup>内脏 NAGase 的最适 pH (5.5),与锯缘青蟹<sup>[11]</sup>内表皮 NAGase 最适 pH (5.6~5.8)和菜青虫<sup>[8]</sup>NAGase 最适 pH (6.2)相近;此外,不同季节的锯缘青蟹<sup>[11]</sup>内表皮

NAGase 和不同养殖期凡纳滨对虾<sup>[16]</sup>外壳膜 NAGase 的最适 pH 基本不变,说明节肢动物 NAGase 的最适 pH 偏向酸性,整个生长阶段酶的最适 pH 基本不变。

中国明对虾体壁 NAGase 与凡纳滨对虾<sup>[9]</sup>、中华绒螯蟹<sup>[10]</sup>内脏 NAGase 以及锯缘青蟹<sup>[11]</sup>内表皮 NAGase 最适温度均为 45℃,但锯缘青蟹<sup>[13]</sup>内脏 NAGase 最适温度为 50℃;不同生长期凡纳滨对虾<sup>[16]</sup>外壳膜 NAGase 最适温度有所不同,在 30~35℃,说明为了适应不同季节水温的变化节肢动物 NAGase 最适温度可能也会随之改变。

### 3.3 NAGase 的稳定性

不同来源的 NAGase 对酸碱稳定性上也存在差异。凡纳滨对虾<sup>[9]</sup>内脏 NAGase 的酸碱稳定性范围较宽,在 pH 4.2~10.0 区域内稳定,中华绒螯蟹<sup>[10]</sup>内脏 NAGase 在 pH 4.9~9.3 区域较稳定,而菜青虫<sup>[8]</sup>NAGase 酸碱稳定范围为 pH 4.0~9.0,家蚕<sup>[7]</sup>消化道 NAGase 则在 pH 5.5~8.5 内稳定。本试验结果表明:中国明对虾体壁 NAGase 在 pH 6.0~9.0 区域较稳定,稳定性范围相对较窄。中国明对虾适宜在 pH 7.8~9.3 的水体中生长<sup>[17]</sup>,因此,在此 pH 下虾体壁 NAGase 具有较大酶活力,有利于虾蜕壳与生长。

此外,不同来源的 NAGase 对热的稳定性也存在差异。锯缘青蟹内表皮 NAGase<sup>[11]</sup>和菜青虫<sup>[8]</sup>NAGase 在 45℃ 以下基本稳定,而且不同季节锯缘青蟹内表皮 NAGase 热稳定性基本不变。凡纳滨对

虾<sup>[9]</sup>和中华绒螯蟹<sup>[10]</sup>内脏 NAGase 在 40℃ 以下基本稳定, 而中国明对虾 NAGase 在 35℃ 以下基本稳定, 40℃ 以上酶对热不稳定, 这符合中国明对虾较怕热的生物学特性, 其生长的适宜水温为 18~30℃<sup>[17]</sup>。

### 3.4 金属离子对 NAGase 的影响

不同金属离子对 NAGase 有不同的效应。Mg<sup>2+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>经常是一些酶的激活剂, 但对中华绒螯蟹<sup>[10]</sup>内脏 NAGase 影响不大, 对凡纳滨对虾<sup>[9]</sup>内脏 NAGase 有激活作用, 而本试验中 Mg<sup>2+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>对酶具有较小的激活作用。Fe<sup>3+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>对中国明对虾体壁 NAGase 的激活作用较强, Mn<sup>2+</sup>对凡纳滨对虾<sup>[9]</sup>内脏 NAGase 具有激活作用, 而 Fe<sup>3+</sup>则起抑制作用; 然而, Mn<sup>2+</sup>又抑制中华绒螯蟹<sup>[10]</sup>内脏 NAGase。Hg<sup>2+</sup>在 1.0 mmol/L 浓度下对中国明对虾体壁 NAGase 呈激活现象, 使酶活力提高 38.92%, 同样浓度下, Hg<sup>2+</sup>会导致凡纳滨对虾<sup>[9]</sup>内脏 NAGase 的活力下降 94%, 而 10.0mmol/L Hg<sup>2+</sup>又可使中国明对虾 NAGase 活力丧失 42.37%; 此外, Hg<sup>2+</sup>也能强烈抑制中华绒螯蟹<sup>[10]</sup>内脏 NAGase。所以不同金属离子对 NAGase 的作用不同, 同一金属离子对来源不同的 NAGase 也有不同的效应。

综上, 水环境中的酸碱度、温度以及金属离子浓度的变化, 都会对甲壳动物体内 NAGase 的活力产生影响, 从而影响其周期性的蜕壳生理过程; 不同来源的 NAGase 因长期适应各自生存的环境而表现出的酶特性有所不同。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] Zou E, Fingerman M. Chitinase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator* during the molting cycle[J]. Marine Biol, 1999, 13(3): 97-101.
- [3] Funke B, Spindler K D. Characterization of chitinase from the brine shrimp *Artemia*[J]. Comp Biochem Physiol, 1989, B94: 691-695.
- [4] Adriana P, Cifali B P, Dias F. Purification and partial characterization of N-Acetyl-β-D-glucosaminidase from *Tritrichomonas foetus*[J]. Parasitol Res, 1999, 85: 256-262.
- [5] Lin J C, Chen Q X, Shi Y, et al. The chemical modification of the essential groups of β-N-Acetyl-D-glucosaminidase from *Turbo cornutus* Solander[J]. IUBMB Life, 2003, 55(9): 547-552.
- [6] Peters G, Saborowski R, Buchholz F, et al. Two distinct form of the chitin-degrading enzyme β-N-acetyl-D-glucosaminidase in the Antarctic Krill: specialists in digestion and moult[J]. Marine Biol, 1999, 134: 697-703.
- [7] 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]. Agric Biol Chem, 1987, 51(6): 1679-1681.
- [8] 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.
- [9] 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 Biol, 2004, 146: 143-148.
- [10] 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.
- [11] 颜雅雯, 王勤, 石艳, 等. 不同季节锯缘青蟹内表皮 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力与性质的比较[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2009, 48(2): 265-268.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(2): 248-254, 2145-2147.
- [13] 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]. Biochem. (Moscow), 2006, 71: 55-59.
- [14] Meyer B, Saborowski R, Atkinson A. Seasonal differences in citrate synthase and digestive enzyme activity in larval and postlarval Antarctic krill, *Euphausia superba*[J]. Marine Biology, 2002, 141(5): 855-862.

- [15] 黄乾生, 谢晓兰, 石艳, 等. 不同生长期凡纳滨对虾肝胰腺 NAGase 的基本性质变化[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(6): 847-850.
- [16] 朴顺金, 谢晓兰, 黄乾生, 等. 不同养殖期的凡纳滨对虾外壳膜 NAGase 基本性质比较[J]. 台湾海峡, 2006, 25(3): 348-352.
- [17] 夏爱军, 姚蕾. 对虾人工养殖技术讲座[J]. 水产养殖, 1999, 1: 30-32.

## Isolation, purification and characterization of $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase from the integument of *Fenneropenaeus chinensis*

LIN Jian-cheng, LIN Da-he, LIN Xiu-chun

(School of Environment & Biological Engineering, Putian University, Putian 351100, China)

Received: Jul., 6, 2013

**Key words:** *Fenneropenaeus chinensis*; integument;  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase; isolation and purification; enzyme properties

**Abstract:** The purpose of this study was to isolate, purify and characterize the  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase (EC3.2.1.52, NAGase) from the integument of *Fenneropenaeus chinensis*. The NAGase from the integument of *F. chinensis* was precipitated by ammonium sulfate and then purified by Sephadex G-100 and DEAE-cellulose. The purified enzyme preparation was homogeneous as judged by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and SDS-PAGE. The specific activity of the purified enzyme was 3938.56 U/mg. The molecular weight of NAGase was 48.88 kD. The optimal pH value was 6.0 and the optimal temperature was 45°C. The enzyme was stable in the pH ranges of 6.0~9.0 with temperature between 20 and 35°C. The enzyme exhibited typical Michaelis-Menten kinetics for the hydrolysis of pNP- $\beta$ -D-GlcNAc. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values were 0.229 mmol/L and 5.00  $\mu$ mol/(L·min), respectively. Metal ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  and  $\text{Ba}^{2+}$  had no effect on the enzyme activity.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  activated the enzyme. In contrast,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  inhibited the enzyme.  $\text{Hg}^{2+}$  inhibited the enzyme activity by 42.37% at 10 mmol/L, while it activated the enzyme at 1 mmol/L.

(本文编辑: 谭雪静)