

文章编号 :1009 - 038X(2003)03 - 0041 - 05

Clostridium paraputrificum M-21 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的表达、纯化与性质

李华钟¹, 王树英², 森本 兼司³, 大宫 邦雄³

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214036 ;2. 江南大学 分析测试中心,江苏 无锡 214036 ;3. 三重大学生物资源学部,日本三重县 津市 514-8507)

摘 要 :以 *Clostridium paraputrificum* M21 染色体 DNA 为模板,经 PCR 扩增获得编码 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的基因 *nag3A*,与质粒 pQE30T 所构建的表达质粒 pNAG3A 在 *Escherichia coli* M15 中表达良好.从重组 *E. coli* M15 中纯化得到的 Nag3A 以 4-MU-GlcNAc 为底物时,最适作用温度和最适作用 pH 分别为 50 ℃ 和 7.0 在 30 ℃ 以下和 pH 6 ~ 9 之间该酶活性稳定.对 4-MU-GlcNAc 的 K_m 和 V_{max} 分别为 7.9 μmol 和 21.8 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$.Nag3A 可以水解几丁寡糖和几丁质,作用方式是从非还原端逐一水解 β -1,4-D-N-乙酰氨基葡萄糖苷键,产生 N-乙酰氨基葡萄糖,对几丁二糖具有较高的水解活性.

关键词 : β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 类腐败梭菌 大肠杆菌 纯化 稳定性

中图分类号 :Q 78

文献标识码 :A

Expression, Purification and Characterization of β -N-Acetylglucosaminidase of Hydrogen-Producing *Clostridium paraputrificum* M21

LI Hua-zhong¹, WANG Shu-ying², MORIMOTO Kenji³, OHMIYA Kunio³

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China ;2. Testing & Analysis Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China ;3. Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu 514-8507, Japan)

Abstract :The recombinant plasmid pNAG3A was constructed from the plasmid pQE30T and *nag3A* gene coding for β -N-Acetylglucosaminidase, and the *nag3A* was amplified by PCR using the chromosomal DNA of *Clostridium paraputrificum* M21 as template. The recombinant plasmid expressed well in *E. Coli* M15. The Nag3A was purified from *Escherichia coli* M15 harboring pNAG3A. When 4-MU-GlcNAc was used as the substrate, the optimum temperature and optimum pH of the purified enzyme were 50 ℃ and 7. 0, respectively. The enzyme was stable below 30 ℃ and within pH 6 ~ 9. The K_m and V_{max} for 4-MU-GlcNAc were 7.9 $\mu\text{mol}/\text{L}$ and 21.8 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, respectively. Nag3A hydrolyzed chitooligosaccharides and ball-milled chitin from the non-reduced end to produce N-acetylglucosamine as the product. Nag3A had high activity on chitobiose.

Key words : β -N-Acetylglucosaminidase ; *Clostridium paraputrificum* ; *Escherichia coli* ; purification ; stability

从日本三重大学校园土壤中分离得到的类腐 败梭菌 *Clostridium paraputrificum* M21 是一株革兰氏

收稿日期 :2002 - 12 - 31 ; 修回日期 :2003 - 03 - 28.

基金项目 :日本文部科学省大学共同利用基金项目(12794004)资助课题.

作者简介 :李华钟(1958 -),男,山东龙口人,教授,发酵工程博士研究生.

万方数据

阳性、能水解几丁质、具有低 GC 含量、可形成芽孢的专性厌氧菌^[1]. 该菌可以利用不同类型的多糖(如淀粉、纤维素、几丁质等)产生生物能化合物——氢气^[1,2].

几丁质是自然界中仅次于纤维素的第二丰富的多聚物(N-乙酰氨基葡萄糖的 β -1, 4 糖苷键多聚物). 微生物对几丁质的有效降解是通过几丁质酶(chitinase, EC 3.2.1.14)和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(β -N-acetylglucosaminidase, Nag, EC 3.2.1.52)等的协同作用得以实现^[3-10]. 在含有几丁质的培养基中培养 *C. paraputrificum* M-21 时, 该菌株可以分泌几种几丁质酶, 而且酶的合成可以被葡萄糖所阻遏^[12]. 研究 *C. paraputrificum* M-21 的几丁质分解酶系统的目的是阐明各种酶的结构、功能、在几丁质降解中的作用以及产酶基因表达的调节等关系. 该菌产几丁质酶 *ChiA* 和 *ChiB* 的基因 *chiA* 和 *chiB* 已经成功地在 *Escherichia coli* 中克隆和表达^[11-13]. 作者对 *C. paraputrificum* M-21 菌株 β -N-氨基葡萄糖苷酶产酶基因 *nag3A*^[14] 在 *E. coli* 中的表达、酶的纯化和酶学性质进行了研究.

1 材料与方法

1.1 细菌菌株、质粒及培养条件

类腐败梭菌 *Clostridium. paraputrificum* M21 由日本三重大学生物资源学部应用微生物学实验室提供^[11], 作者所在实验室保藏. 该菌株用于提供染色体 DNA. 将该菌置 100 mL 改良 GS 培养基(1% N-乙酰氨基葡萄糖作碳源)^[11] 中于 37 °C 培养过夜. 厌氧培养瓶的上部空间经 N₂ 置换. 质粒 pQE-30T 用于表达载体的构建, 该质粒是从 pQE-30 (Qiagen) 派生而得, 在原质粒的 (His)₆-标签的编码区与多克隆位点之间插入为牛凝血酶 (Thrombin) 的识别序列 (LVPRGS) 编码的 18 对碱基^[15]. *E. coli* XL1-Blue 用作重组质粒的克隆宿主. *E. coli* M15 (pREP4) (Qiagen) 用作质粒 pQE-30T 的表达宿主. 所有的 *E. coli* 菌株都用 LB 培养基(根据需要添加抗生素)于 37 °C 振荡培养.

1.2 表达质粒 pNAG3A 的构建

为了从 *nag3A* 基因表达 Nag3A 酶, 从 pQE30T 质粒构建了重组质粒 pNAG3A. 用于 PCR 扩增 *nag3A* 的引物分别为 NAG-For: 5'-GGGGATCCAC-TATTTTAACA GGGAAAAATG-3' 和 NAG-Rev: 5'-GGGTGACCTATTTATACATTGCTTCAACTAC -3' (带下划线序列分别为 *Bam*HI 和 *Sal*I 位点). PCR 产物经 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切割后所得片段与经该二酶

切割的 pQE30T 质粒片段经连接酶连接构建重组表达质粒 pNAG3A. 将重组表达质粒转化至 *E. coli* XL1-Blue 扩增, 所克隆的 DNA 片段经测序排除 PCR 扩增中的突变.

1.3 Nag3A 的表达与纯化

将经过测序排除突变的重组表达质粒 pNAG3A 转化至 *E. coli* M15 构建重组子 *E. coli* M15 (pNAG3A), 由此重组子所合成的 Nag 首先用 HiTrap chelating HP column (5 mL; Amersham Pharmacia Biotech) 按厂商所提供的操作规程进行纯化. 有活性的部分经 pH 8.0、50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液透析脱盐后用牛凝血酶处理(10 U/mg NagA)切除 (His)₆-标签, 再用 HiTrap HP 柱子分离, 收集未被柱子结合的蛋白质, 用与上述同样的方法进行透析脱盐. 然后再用 MonoQ HR5/5 柱 (0.5 cm × 5 cm; Amersham Pharmacia Biotech) 进行分离纯化.

1.4 酶活测定

4-methylumbelliferyl N-acetyl β -D-glucosaminide [4-MU-GlcNAc; Sigma]、4-methylumbelliferyl β -D-N'-diacetylchitobioside [4-MU- (GlcNAc)₂; Sigma], 和 4-methylumbelliferyl β -D-N'-N''- triacetylchitotrioside [4-MU- (GlcNAc)₃; Sigma] 以 10 mmol/L 的浓度溶解于 N, N'-二甲基甲酰胺中, 贮存于 -20 °C. 酶活测定依 O'Brien 改良法进行^[16], 酶解反应在含有 0.1 mmol/L 4-MU- (GlcNAc) 的 pH 7.0、10 mmol/L 磷酸缓冲液中进行, 反应混合物在 37 °C 反应 10 min 后加 2% 的 Na₂CO₃ 溶液终止反应, 用 Shimadzu RF-1500 (Shimadzu, Tokyo, Japan) 荧光分光光度计于激发波长 355 nm、散发波长 465 nm 下测定所释放的 4-methylumbelliferone (4-MU) 的量. 一个酶活单位定义为每分钟释放 1 μ mol 4-MU 所需要的酶的量.

1.5 几丁寡糖和几丁质的酶解与产物分析

将几丁寡糖(几丁二糖 ~ 几丁六糖, Sigma 公司产品)以 4 mmol/L 的浓度溶解于 pH 7.0、10 mmol/L 磷酸缓冲液中, 取 0.1 mL 该溶液加 5 μ g Nag3A, 于 37 °C 酶解 6 h, 然后用薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)检测水解产物. TLC 使用的是玻璃硅胶板(Kieselgel 60, Merck 公司产品), 展开剂的组成为 V(正丁醇): V(甲醇): V(氨水): V(水) = 5:4:2:1, 采用上行二次展开方式. 待硅胶板自然风干后喷显色剂(0.4 g 二苯胺, 0.4 mL 苯胺, 3 mL 85% 磷酸, 20 mL 丙酮, 用前临时配制), 于 80 °C 显色 20 min, 单糖和各寡糖呈现可见斑点. 几丁质(Sigma 公司)经球磨后用 pH 7.0、10 mmol/L 磷酸缓冲液制备成 1% 的悬浮液, 加入 Nag3A 酶后于 37 °C 酶解过夜, 离心后

取上清液经 TLC 进行分析^[13] .

1.6 蛋白质分析

蛋白质浓度测定采用 Bradford 法^[17] ,以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin ,BSA,Sigma 公司) 作标样 .

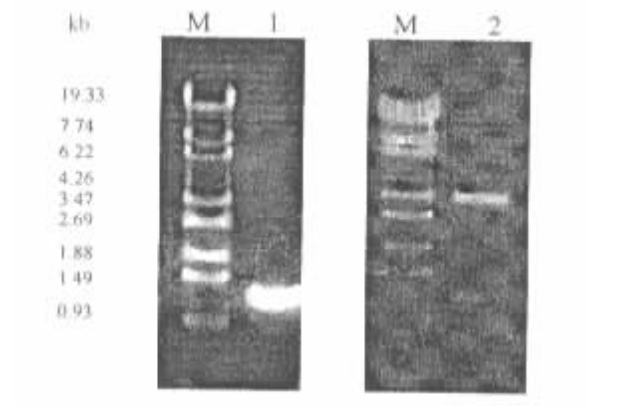
1.7 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 分析依 Laemmli 法^[18] 进行 .

2 结果与讨论

2.1 表达重组质粒 pNAG3A 的构建

以 *C. paraputrificum*M21 的染色体 DNA 为模板,经 PCR 扩增获得的 *nag3A* 基因 DNA 经琼脂糖电泳分析,在长度上与预期值 (1 189 bp)^[14] 相同 (见图 1) .经过 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切割后与 pQE30T 连接所构建的表达重组质粒 pNAG3A 经同样的双酶切割分析,两个片段的长度与预期值也完全相同 (图 1) .质粒 pNAG3A 经 DNA 序列测定分析,所插入的 NAG3A 的编码基因 *nag3A* 的序列与原序列一致^[14] ,说明 PCR 扩增过程没有导致突变的产生 .



M,分子量标记 ;2, *nag3A* PCR 扩增产物 ;3, pNAG3A 经 *Bam*HI 和 *Sal*I 水解物

图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of DNA

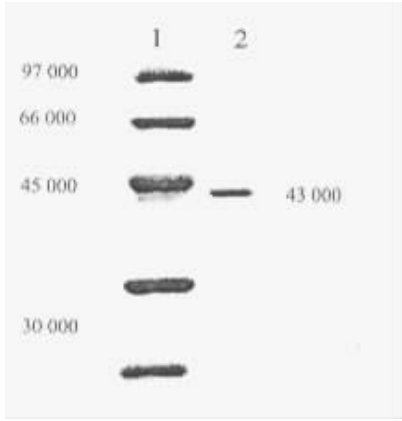
2.2 Nag3A 的表达与纯化

用重组质粒 pNAG3A 转化 *E. coli* M15 获得重组菌株 *E. coli* M15 (pNAG3A) .由该菌株所合成的酶蛋白经 HiTrap chelating HP 柱纯化后,其组氨酸六肽标签被切除 .被切除组氨酸六肽的纯化 Nag 酶蛋白命名为 Nag3A .表 1 酶的纯化结果说明经两种分离柱纯化得到的 Nag3A 被纯化 13.9 倍,回收率为 35.8% .纯化酶在 SDS-PAGE 上呈一条谱带,相对分子质量约 43 000 (见图 2) .

表 1 Nag3A 的纯化结果

Tab.1 Summary of Purification of Nag3A from *E. coli* M15 harbouring pNAG3A

步骤	总蛋白质质量/mg	总酶活/U	比酶活/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗酶	50.8	166.6	3.3	100.0	1.0
HiTrap 纯化	3.9	100.3	25.7	60.2	7.8
MonoQ 纯化	1.3	59.6	45.8	35.8	13.9



1, 相对分子质量标记 ;2, 纯化 Nag3A

图 2 纯化 Nag3A 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE of purified Nag3A

2.3 Nag3A 酶学性质

2.3.1 最适反应 pH 用不同 pH 的 40 mmol/L Britton-Robinson 通用缓冲液 (40 mmol/L 磷酸-40 mmol/L 硼酸-40 mmol/L 乙酸,用 NaOH 调 pH) 取代酶活测定方法中的缓冲液进行酶活测定,由图 3 的结果可知,该酶最适反应 pH 为 7.0 .

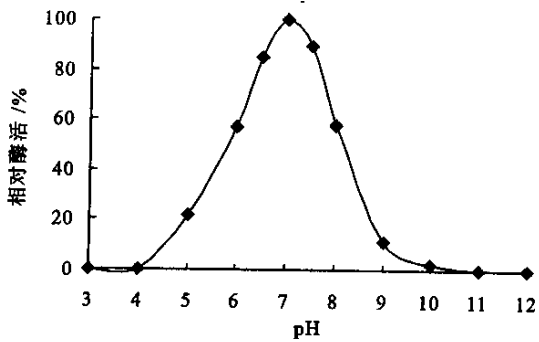


图 3 最适作用 pH 曲线

Fig.3 Effect of pH on activity

2.3.2 pH 稳定性 在不同 pH 的 10 mmol/L 的 Britton-Robinson 通用缓冲液中经 25 ℃、24 h 处理后,加入 100 mmol/L、pH 7.0 缓冲液恢复 pH,然后测定酶活,结果见图 4.该酶在 pH 6~9 的范围内稳定 .

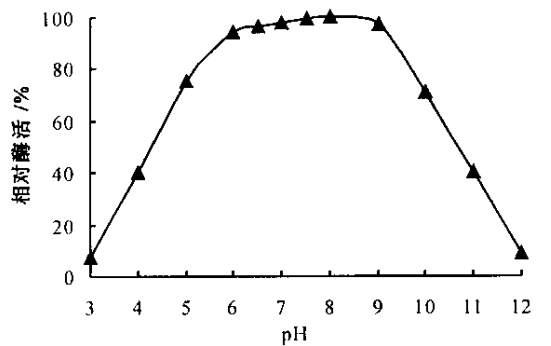


图 4 pH 稳定性曲线

Fig.4 pH stability curve

2.3.3 最适反应温度 分别用不同的反应温度取代酶活测定方法中的 37 ℃,测定酶活,结果显示该酶的最适作用温度为 50 ℃,见图 5.

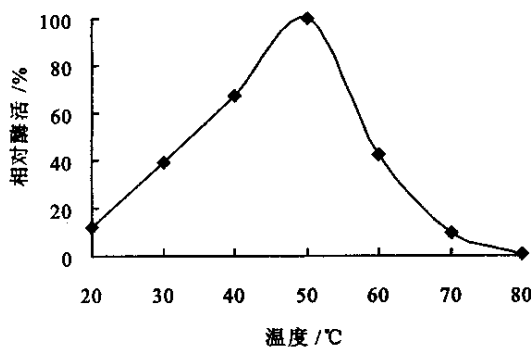


图 5 最适作用温度曲线

Fig.5 Effect of temperature on activity

2.3.4 温度稳定性 将酶液置于不同温度下保温处理 30 min,然后测定残余酶活,结果见图 6. 该酶在 70 ℃以上完全失去活性.在 30~70 ℃之间,随着处理温度的升高,酶活逐渐降低.30 ℃以下的处理对酶活性没有影响.

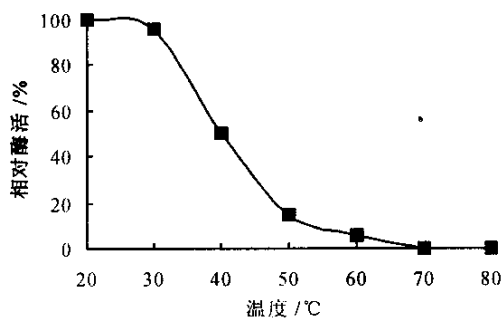


图 6 温度稳定性曲线

Fig.6 Thermal stability curve

2.3.5 金属离子对酶活的影响 向酶活测定反应体系中加入终浓度为 1 mmol/L 的不同金属离子,测定其对酶活的影响.表 2 的结果说明,汞离子、铜离子和锌离子可以完全抑制酶活性,镍离子、锰离子和铁离子可以部分抑制酶活,而铝离子、钡离子、钾

离子、钙离子和镁离子对酶活的影响很小,可以忽略不计.

表 2 金属离子对酶活的影响

Tab.2 Effect of metal ions on activity

金属离子	相对酶活 / %
对照	100
MgCl ₂	104
CaCl ₂	103
KCl	102
BaCl ₂	99
AlCl ₃	98
FeCl ₃	83
MnCl ₂	78
NiCl ₂	23
HgCl ₂	0
CuCl ₂	0
ZnCl ₂	0

2.3.6 Nag3A 的动力学常数 在 37 ℃测定了纯化酶对不同浓度(0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100 μmol/L) 4-MU-(GlcNAc)、4-MU-(GlcNAc)₂ 和 4-MU-(GlcNAc)₃ 的反应初速度,经 Lineweaver-Burk 绘图得出该酶对 3 种合成底物的 K_m 和 V_{max} 值见表 3.在 3 种底物中,4-MU-(GlcNAc)的 K_m 值最小, V_{max} 值最大.

表 3 纯化酶对合成底物的动力学常数

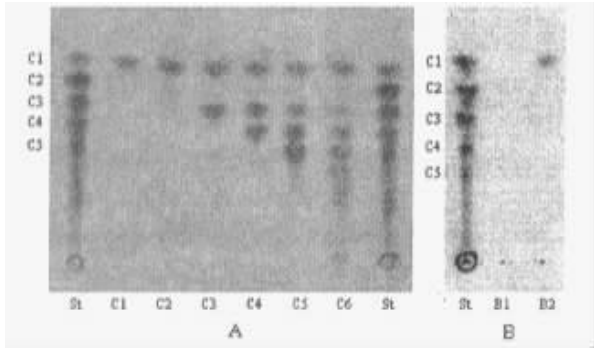
Tab.3 Kinetic constants of the purified Nag3A against synthetic substrates

底 物	比酶活/ (U/mg)	K_m / (μmol/L)	V_{max} / (μmol/(min·mg))
4-MU-(GlcNAc)	45.0	7.9	21.8
4-MU-(GlcNAc) ₂	0.88	12.0	1.47
4-MU-(GlcNAc) ₃	0.06	15.0	0.02

2.4 Nag3A 对底物的识别

2.4.1 Nag3A 对几丁寡糖和几丁质的水解 Nag3A 对几丁寡糖和球磨几丁质的水解产物的 TLC 分析结果见图 7.图 7 显示,Nag3A 可以完全降解几丁二糖(GlcNAc)₂ 成 GlcNAc;虽然该酶对(GlcNAc)₃、(GlcNAc)₄、(GlcNAc)₅ 和 (GlcNAc)₆ 也具有水解活性,但不能完全降解,例如当以(GlcNAc)₄ 为底物时,TLC 上检测到(GlcNAc)、(GlcNAc)₃ 以及未水解的(GlcNAc)₄.但值得注意的是,在所研究的几丁寡糖水解物中均未检测到几丁二糖的存在.该酶也能

水解球磨几丁质生成(GlcNAc)(图 7B). 上述结果说明 Nag3A 是一种既能作用于几丁寡糖,也能作用于高聚合度的几丁质的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶,与较高聚合度的几丁寡糖和几丁质相比,该酶对几丁二糖具有更强的水解能力.



St.几丁寡糖标准 ;C1. GlcNAc ;C2. (GlcNAc)₂ ;C3. (GlcNAc)₃ ; C4. (GlcNAc)₄ ;C5. (GlcNAc)₅ ;C6. (GlcNAc)₆. C1 到 C6 列,几种几丁寡糖经 Nag3A 的水解物. B1 列,球磨几丁质上清液 ;B2 列,经 Nag3A 作用的球磨几丁质的上清液.

图 7 几丁寡糖(A)和球磨几丁质(B)水解产物的 TLC 图谱

Fig.7 Thin layer chromatography of hydrolysis products from chitooligosaccharides (A) and ball-milled chitin(B).

2.4.2 Nag3A 对其它合成底物的水解 当以该酶作用于合成底物 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- α -D-Glucosaminide (Sigma 公司产品)、4-Methylumbelliferyl - α - D - Glucoside (Sigma 公司产

品)、4-Methylumbelliferyl- α -D-Glucoside (Sigma 公司产品)、4-Methylumbelliferyl- α -D-Galactoside (Sigma 公司产品)、4-Methylumbelliferyl- α -D-Galactoside (Sigma 公司产品)、4-Methylumbelliferyl- α -D-Xyloside (Sigma 公司产品)、4-Methylumbelliferyl- α -D-Xyloside (Sigma 公司产品)和 4-Methylumbelliferyl- α -D-Cellobiopyranoside (Sigma 公司产品)时,未检测到水解活性,说明该酶对 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷键具有专一性.

3 结 论

1) 用经过 PCR 扩增的编码 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的基因 nag3A 和质粒 pQE30T 所构建的表达质粒 pNAG3A 在 *E. coli* M15 中可以很好地表达该酶.

2) 从载有 pNAG3A 质粒的 *E. coli* M15 中纯化得到的 Nag3A 以 4-MU-GlcNAc 为底物时,最适作用温度和最适作用 pH 分别为 50 $^{\circ}\text{C}$ 和 7.0 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 以下和 pH 6 ~ 9 之间该酶活性稳定. 对 4-MU-GlcNAc、4-MU-(GlcNAc)₂、4-MU-(GlcNAc)₃ 的 K_m 值分别为 7.9,12.0,15.0 $\mu\text{mol/L}$, V_{max} 分别为 21.8,1.47,0.02 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$.

3) Nag3A 可以水解几丁寡糖和几丁质,作用方式是从非还原端逐一水解 β -1,4-D-N-乙酰氨基葡萄糖苷键,产生 N-乙酰氨基葡萄糖,对几丁二糖具有较高的活性.

参考文献 :

[1] Evvyernie D, Yamazaki S, Morimoto K, *et al.* Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen-producing bacterium[J]. *J Biosci Bioeng*,2000,89 :596 – 601.

[2] Evvyernie D, Morimoto K, Karita S, *et al.* Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21[J]. *J Biosci Bioeng*,2001, 91 :339 – 343.

[3] Bassler B L, Yu C, Lee Y C, *et al.* Chitin utilization by marine bacteria :degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii* [J]. *J Biol Chem*, 1991,266 :24276 – 24286.

[4] Shaikh S A, Deshpande M V. Chitinolytic enzymes :their con-tribution to basic and applied research[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 1993,9 :468 – 475.

[5] Soto-Gil R W, Zyskind J W. N, N⁹-Diacetylchitobiase of *Vibrio harveyi* [J]. *J Biol Chem*,1989,264 :14778 – 14783.

[6] Tsujibo H, Fujimoto K, Tanno H, *et al.* Gene sequence, purification and characterization of N-acetyl- β -glucosaminidase from a marine bacterium, *Alteromonas sp.* Strain O-7[J]. *Gene*,1994, 146 :111 – 115.

[7] Tsujibo H, Hatano N, Mikami T, *et al.* A novel beta-N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 :gene cloning, expression, and assignment to family 3 of the glycosyl hydrolases[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998,64 :2920 – 2924.

[8] Tsujibo H, Hatano N, Mikami T, *et al.* Cloning, characterization and expression of β -N-acetylglucosaminidase gene from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998,1425(2) :437 – 440.

(下转第 52 页)

mevinolinic acid in fermentation broth[J]. *J Chromatogr A*, 1995,704 :363 – 367.

[8] 王春娜. HPLC 法检测功能红曲中的洛伐他汀[J]. *北京农学院学报*, 2000,15(2) :48 – 51.

[9] 张小茜,周富荣,石济民. 高效液相色谱法测血脂康胶囊及红曲中洛伐他汀的含量[J]. *中国中药杂志*, 1997,22(4) :222 – 224.

[10] 张建国,刘文华. 紫外分光光度法测定洛伐他汀胶囊含量[J]. *中国生化药物杂志*, 1997,20(3) :152.

[11] 宋洪涛,郭涛,宓鹤鸣,等. 薄层扫描法测定血脂平胶囊中洛伐他汀的含量[J]. *中草药*, 1997,28(12) :723 – 725.

[12] Strode J T B, Taylor L T, HOWARD A L, *et al.* Feasibility of lovastatin analysis by packed column supercritical fluid chromatography with ultraviolet detection[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1999,20 :137 – 143.

[13] Matilde Manzoni, Manuela Rrlini, Silvia Bergomi, *et al.* Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains [J]. *Biotechnology Techniques*, 1998,12 :529 – 532.

[14] Akira Endo. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-Hydroxy methylglutaryl coenzyme A reductase[J]. *J Antibiotics*, 1980,33 :334 – 337.

(责任编辑 杨 勇)

(上接第 45 页)

[9] Cheng Q Li, H Merdek K. Molecular characterization of the β -N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and its role in cell wall recycling[J]. *J Bacteriol*, 2000,182 :4836 – 4840.

[10] Chitlaru E, Roseman S. Molecular cloning and characterization of a novel β -N-acetyl-D-glucosaminidase from *Vibrio furnissii* [J]. *J Biol Chem*, 1996,271 :33433 – 33439.

[11] Morimoto K, Karita S, Kimura T, *et al.* Sequencing, expression, and transcription analysis of the *Clostridium paraputrificum* *chiA* gene encoding chitinase ChiA[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999,51 :340 – 347.

[12] Morimoto K, Karita S, Kimura T, *et al.* Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* *chitinase ChiB* and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and a chitin-binding domain[J]. *J Bacteriol*, 1997,179 :7306 – 7314.

[13] Morimoto K, Karita S, Kimura T, *et al.* Characterization of *Clostridium paraputrificum* Chitinase A from a Recombinant *Escherichia coli* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2001,92 :466 – 468.

[14] Li H, Morimoto K, Katagiri N, *et al.* A Novel β -N-Acetylglucosaminidase of *Clostridium paraputrificum* M-21 with High Activity on Chitobiose[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002,60(4) :420 – 427.

[15] Mursheda K A, Hayashi H, Karita S, *et al.* Importance of the carbohydrate-binding module of *Clostridium stercoarium* Xyn10B to xylan hydrolysis[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001,65 :41 – 47.

[16] O ’brien M, Colwell R R. A rapid test chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1987,53 :1718 – 1720.

[17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976,72 :248 – 254.

[18] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970,227 :680 – 685.

(责任编辑 李春丽)