

НОВЫЙ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКИЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ N-АЦЕТИЛ-D-ГЛЮКОЗАМИНИДАЗЫ

Рожкова А.М.¹ , Чулкин А.М.¹ , Синельников И.Г.¹, Синицына О.А.² , Зоров И.Н.^{1,2}, Синицын А.П.^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Российская Федерация, 119071, г. Москва, Ленинский проспект 33, стр.2, e-mail: info@fbras.ru

²Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.11, e-mail: dekanat@chem.msu.ru

АБСТРАКТ

Клонирован новый ген *nagI*, кодирующий N-ацетил-D-глюкозаминидазу *Streptomyces kursanovii*. После оптимизации экспрессии N-ацетил-D-глюкозаминидазы в клетках *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) получен фермент в растворимой форме. С помощью афинной хроматографии выделена гомогенная форма фермента и изучена ее бактериолизитическая способность по отношению к клеткам грамположительной бактерии *Micrococcus lysodeikticus*. Показано, что новый фермент обладает бактериолизитической способностью, превышающей лизисную активность куриного лизоцима.

Ключевые слова: ген, ферментный препарат, глюкозаминидаза, кормовые антибиотики, лизоцим, пробиотик

ВВЕДЕНИЕ

Одно из направлений современной сельскохозяйственной биотехнологии состоит в разработке кормовых антибиотиков на основе ферментов. В промышленном птицеводстве и животноводстве кормовые антибиотики традиционно применяются с целью улучшения скорости роста птицы и животных, для профилактики и лечения заболеваний. Однако применение классических антибиотиков сопровождается побочными негативными эффектами: происходит их накопление в органах и тканях, а также растет число возбудителей болезней, приобретающих устойчивость к антибактериальным терапевтическим средствам. Поэтому применение антибиотиков негативно сказывается на потребительских качествах мясной продукции, что делает актуальной проблему поиска их замены. И в этой связи особый интерес и актуальность вызывают ферменты, обладающие антибактериальной активностью.

Лизоцимы, N-ацетилмурамидгликангидролазы или мурамидазы (EC 3.2.1.17), расщепляют пептидогликановый компонент клеточной стенки бактерий между N-ацетилмурамовой кислотой (NAM) и N-ацетилглюкозаминим (NAG) по β -1,4-гликозидной связи и относятся к 22-му семейству гликозидгидролаз (GH 22) (CAZy; <http://www.cazy.org/>) (Рисунок 1) [1-3].

В современном сельском хозяйстве в качестве ферментной антибактериальной добавки используют куриный лизоцим. С практической точки зрения недостатком лизоцимов является неспецифичность по отношению к типам клеточной стенки бактерий, что приводит к тотальному лизису микробиоты с/х животных и птицы. Решением данной проблемы является добавка пробиотических средств на основе бактерий *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* после или совместно с добавкой лизоцима в корма [4].

Однако в настоящее время мурамидазы найдены в различных организмах и относятся к различным семействам гликозилгидролаз - GH22, GH23, GH24, GH25, GH73, GH104 и GH108. Относящиеся к этим семействам ферменты действуют на один и тот же субстрат, но меха-

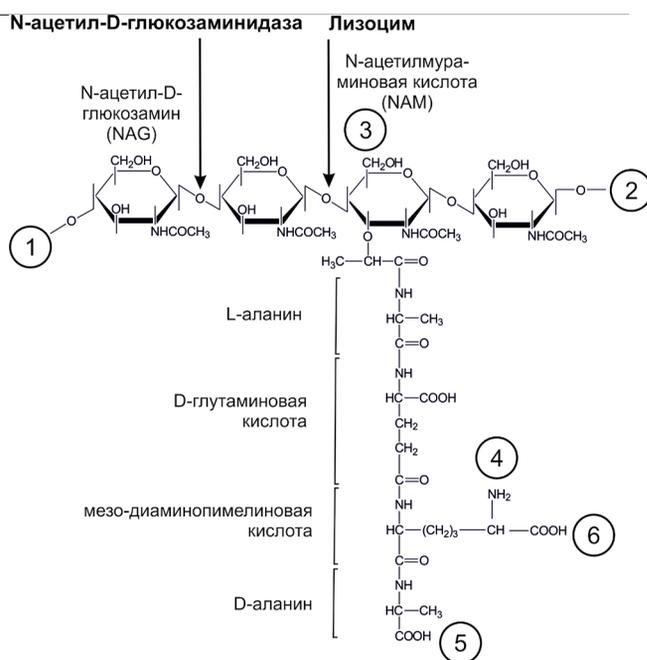


Рисунок 1. Структура повторяющейся единицы пептидогликана клеточной стенки. Цифры в кружках обозначают: 1, 2 — места полимеризации гликанового остова молекулы; 3 — место присоединения с помощью фосфодиэфирной связи молекулы тейхоевой кислоты в клеточной стенке грамположительных бактерий; 4, 5 — места, по которым происходит связывание между гликановыми цепями с помощью пептидных связей; 6 — место ковалентного связывания (пептидная связь) с липопротеином наружной мембраны у грамотрицательных бактерий. Стрелками обозначены места расщепления β -1,4-связи лизоцимом и N-ацетил-D-глюкозаминидазой

низмы реакций могут отличаться [1].

В работах [5, 6, 7] были показаны антибактериальные свойства N-ацетил-D-глюкозаминидазы (NAGase), определяемые механизмом действия данного фермента по отношению к β -1,4-связи N-ацетилглюкозамина – компонента остова пептидогликана (Рисунок 1). Тем не менее, в литературе содержатся противоречивые данные относительно гидролиза клеточной стенки бактерий под действием N-ацетил-D-глюкозаминидазы и специфичности

Уровень экспрессии и растворимость белка определяли путем Na-ДДС-ПААГ электрофореза.

Выделение гомогенной N-ацетил-D-глюкозаминидазы и масс-спектрометрический анализ фермента

Обессоливание и отделение низкомолекулярных метаболитов проводили методом гель-проникающей хроматографии. Колонка 1,6 x 12 см, носитель BioGel P6 (Bio-Rad, США), подвижная фаза - 20 mM Na-фосфатный буфер, pH 6,7, с добавлением 500 mM NaCl, скорость потока 4 мл/мин.

Выделение целевого белка проводили с использованием металло-хелатной хроматографии. Колонка 1,0 x 8,0 см, носитель Ni Sepharose Excel (Cytiva, Швеция). Стартовый буфер - 20 mM Na-фосфатный буфер, pH 6,7, с добавлением 500 mM NaCl. Промывочный - 20 mM Na-фосфатный буфер, pH 6,7, с добавлением 500 mM NaCl и 15 mM имидазола, элюирующий - 20 mM Na-фосфатный буфер, pH 6,7, с добавлением 500 mM NaCl и 400 mM имидазола. Скорость потока 2 мл/мин.

Для масс-спектрометрического анализа использовали метод пептидного картирования после расщепления белка, содержащегося в соответствующей полосе геля, трипсином (Promega, США) [9]. MALDI-масс-спектрометрию трипсинового гидролизата проводили на времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme (BrukerDaltonik GmbH, Германия) в ЦКП "Промышленные биотехнологии" ФИЦ Биотехнологии РАН. Полученные данные интерпретировали путем сравнения масс полученных пептидов и теоретически рассчитанных с помощью сервиса Peptide-Mass (http://web.expasy.org/peptide_mass/).

Определение бактериолитической активности турбидиметрическим методом

Бактериолитическую активность (скорость лизиса клеток) измеряли турбидиметрическим методом при pH 5.0 и 7.0 по изменению оптического поглощения A_{650} во времени ($-dA/dt$) [10]. Изменение во времени оптического поглощения ($V = -dA/dt$), пропорционально изменению числа клеток во времени ($-dKOE/dt$). 1 мл 20 mM буфера (pH 5.0 – Na-ацетатный буфер, pH 7.0 – фосфатный буфер) смешивали в пластиковой кювете с 50-60 мкл запасного раствора субстрата. Объем вносимого запасного раствора субстрата подбирали таким образом, чтобы оптическая плотность рабочего раствора составляла 480-540 о.е. при длине волны 650 нм. Прописывали фон субстрата (20-30 сек), после чего вносили 100 мкл фракции фермента или запасного раствора ферментного препарата (концентрация 10 мг/мл) и продолжали писать кинетическую кривую (до 60 сек). Реакцию вели при 25°C.

Запасной раствор субстрата готовили, суспендируя навеску лиофильно высушенных клеток (5 мг *Micrococcus lysodeikticus*) в 1 мл 20 mM фосфатного буфера, pH 7, далее раствор центрифугировали 4 мин при 5000 об/мин, удаляли супернатант с примесями, а осадок перерастворяли в 1 мл 20 mM фосфатного буфера, pH 7. Измерения проводили на двухлучевом спектрофотометре «UV-1800» («Shimadzu», Япония). Лиофильно высушенные клетки *Micrococcus lysodeikticus* были предоставлены проф. П.А. Левашовым, (МГУ имени М.В. Ломоносова).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация экспрессии N-ацетил-D-глюкозаминидазы в штаммах *E. coli*

Плазмида pNIC-NAG была трансформирована в два экспрессионных штамма *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) и *E. coli* BL21-Gold(DE3). По результатам трансформации было получено от 10 до 20 клонов рекомбинантных штаммов. Было отобрано по одному клону от каждого экспрессионного штамма.

Для клонов штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3) была получена экспрессия N-ацетил-D-глюкозаминидазы в нерастворимой форме (данные не приведены). Практически весь белок находился в виде телец включения. Треки 1 и 4 на Рисунке 3 соответствуют растворимой фракции лизатов *E. coli* BL21-Gold(DE3) с экспрессией N-ацетил-D-глюкозаминидазы при двух условиях – 1 mM ИПТГ и 3 и 4 ч индукции при 30 и 25 °C соответственно для треков 1 и 4.

Треки 2, 3 и 5 соответствуют растворимой фракции лизатов клеток *E. coli* ArcticExpress™ (DE3), полученных в результате оптимизации концентрации ИПТГ, а также времени индукции и температуры. Из Рисунка 3 следует, что наилучшей растворимой экспрессии N-ацетил-D-глюкозаминидазы удалось достичь при снижении концентрации ИПТГ до 0,3 mM, снижении температуры культивирования штамма до 10 °C и увеличении времени культивирования после индукции до 24 ч. Очевидно, что данный эффект связан с более медленным и правильным фолдированием N-ацетил-D-глюкозаминидазы. Немаловажным фактором в данном случае является и наличие в штамме *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) плазмиды pRARE. Введение в клетку плазмиды pRARE, несущей гены tRNK шести редких для *E. coli* кодонов значительно повышает эффективность экспрессии N-ацетил-D-глюкозаминидазы.

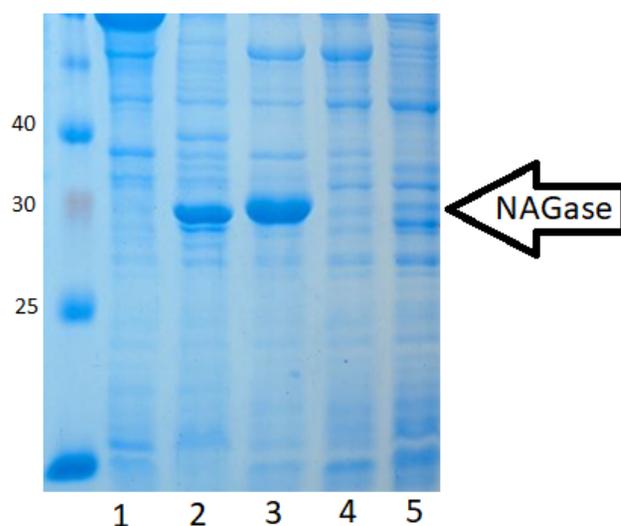


Рисунок 3. Результаты Na-ДДС-ПААГ электрофореза образцов лизатов после разрушения ультразвуком и центрифугирования. 1 - *E. coli* BL21-Gold(DE3) (1 mM ИПТГ, 3 ч, 30°C), 2 - *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) (0,3 mM ИПТГ, 24 ч, 11°C), 3 - *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) (0,3 mM ИПТГ, 24 ч, 10°C), 4 - *E. coli* BL21-Gold(DE3) (1 mM ИПТГ, 4 ч, 25°C), 5 - *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) (1 mM ИПТГ, 18 ч, 15°C).

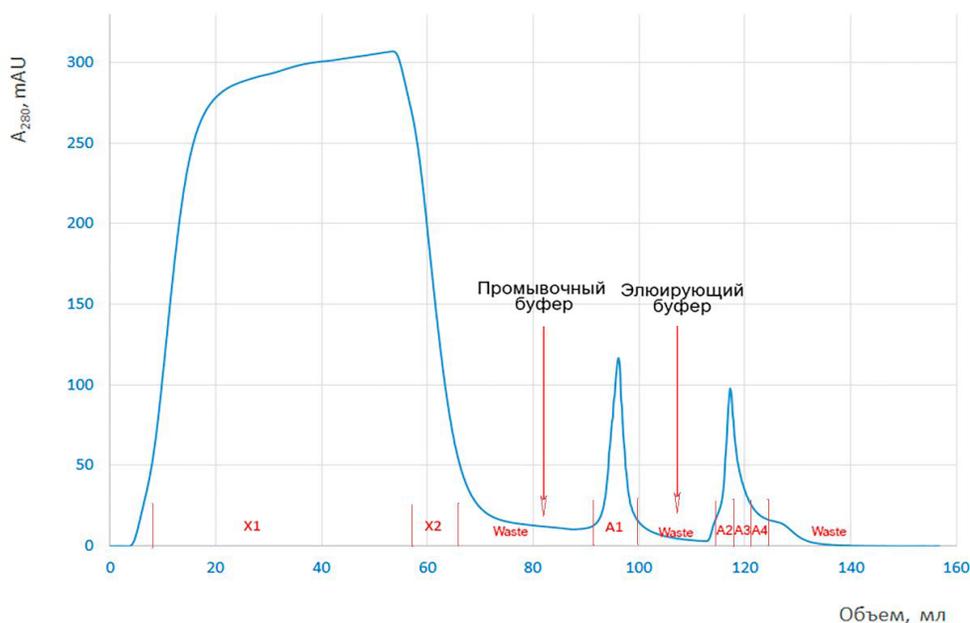


Рисунок 4. Хроматографический профиль выделения N-ацетил-глюкозаминидазы на колонке с носителем Ni Sepharose Excel

Выделение гомогенной формы N-ацетил-D-глюкозаминидазы

Лизат центрифугировали в течение 20 минут при 15000 g и температуре 10 °С. Для замены буфера и отделения от низкомолекулярных метаболитов надосадочную жидкость, содержащую растворимую фракцию белков, наносили на колонку для гель-проникающей хроматографии с носителем BioGel P6. Элюирование проводили в 20 mM Na-фосфатном буфере, pH 6,7, содержащем 500 mM NaCl, который использовали как стартовый буфер для ме-

талло-хелатной хроматографии.

Полученные белковые фракции объединяли и наносили на колонку с носителем Ni Sepharose Excel. Промывали колонку стартовым буфером, затем промывочным буфером, содержащем 15 mM имидазола. По окончании промывки смывали связавшийся целевой белок элюирующим буфером, содержащим 20 mM Na-фосфат, pH 6,7, 500 mM NaCl и 400 mM имидазола. Хроматографический профиль представлен на Рисунке 4. Собирали несвязавшуюся фракцию (X1, X2), фракцию после промывки (A1), а также фракции (A2-A4), содержащие целевой белок.

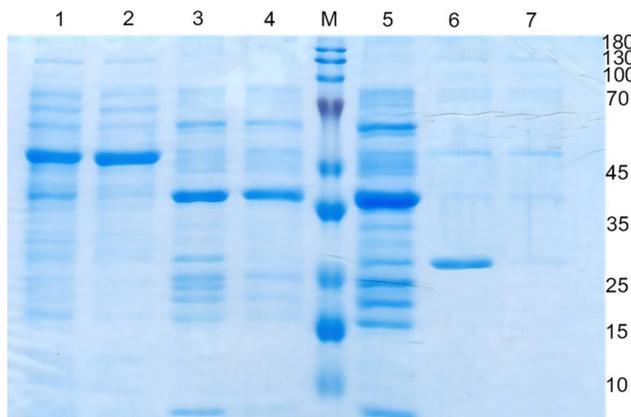


Рисунок 5. Электрофореграмма белковых фракций после хроматографического разделения. 1 – лизат после обессоливания; 2 – несвязавшаяся фракция X1; 3-5 – различные разбавления фракции A1; 6 – фракция A3; 7 – фракция A4. М – белковый маркер, значения молекулярных масс белков (в кДа) приведены справа.

Был проведен электрофорез в денатурирующих условиях, на Рисунке 5 представлена электрофореграмма лизата после обессоливания, а также фракций, полученных после металло-хелатной хроматографии.

Бактериолитическая активность N-ацетил-D-глюкозаминидазы

Для определения бактериолитической активности препарата гомогенной N-ацетил-D-глюкозаминидазы был использован турбидиметрический метод, разработанный ранее для лизоцима [10]. В качестве контроля использовался коммерческий препарат лизоцима – LISOPROQ (Proquiga Biotech, Испания), концентрация которого составляла 30 мкг/мл (также как и концентрация гомогенной N-ацетил-D-глюкозаминидазы). В качестве модельных бактерий был взят грамположительный штамм *Micrococcus lysodeikticus*. Результаты приведены в Таблице 1.

Из полученных данных следует, что полученный ферментный препарат гомогенной N-ацетил-D-глюкозаминидазы

Таблица 1 – Бактериолитическая активность лизоцима и N-ацетил-D-глюкозаминидазы по отношению к *Micrococcus lysodeikticus*

Фермент	Активность, ед/мл	
	pH 5.0	pH 7.0
Лизоцим (Lisoproq)	260±12	127±11
N-ацетил-D-глюкозаминидаза	477±31	750±62

нидазы проявляет значительную лизисную активность по отношению к клеткам грамположительного штамма *M. lysodeikticus*. Аналогичный эффект наблюдался для N-ацетил-D-глюкозаминидазы из *Serratia marcescens* [6], *Staphylococcus saprophyticus* [11].

Важно отметить, что ферменты, гидролизующие компоненты пептидогликана используются не только в сельском хозяйстве, но и в пищевой промышленности. Они находят применение как антибактериальные препараты, добавки для консервирования/сохранения пищевых продуктов, в качестве добавки к детским молочным смесям, а также в сыроварении [12].

Таким образом, новый препарат на основе N-ацетил-D-глюкозаминидазы из *Streptomyces kuranovii*, позволяет расширить панель ферментов с бактериолитическими свойствами, что открывает перспективы апробации полученного ферментного препарата не только в сельском хозяйстве в качестве замены или частичной замены антибиотиков в кормах, но и возможность испытания новой N-ацетил-D-глюкозаминидазы в технологических процессах пищевой промышленности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для получения и изучения ферментного препарата с бактериолитической активностью клонирован ген *nagI*, кодирующий N-ацетил-D-глюкозаминидазу из *Streptomyces kuranovii*. Проведена внутриклеточная экспрессия гена *nagI* в клетках *E. Coli* и получена рекомбинантная N-ацетил-D-глюкозаминидаза с хроматографической чистотой. Бактериолитическая активность рекомбинантного фермента в отношении грамположительных бактерий подтверждена в тестах с использованием *Micrococcus lysodeikticus*. Результаты свидетельствуют, что новый фермент обладает бактериолитической способностью, превышающей лизисную активность куриного лизоцима.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке КПНИ ФНТПР сельского хозяйства на 2017-2030 годы (№122112300051-8)

ЛИТЕРАТУРА

1. Moroz OV, Blagova E, Taylor E, Turkenburg JP, Skov LK, Gippert GP, Schnorr KM, Ming L, Ye L, Klausen M, Cohn MT, Schmidt EGW, Nymand-Grarup S, Davies GJ, Wilson KS. Fungal GH25 muramidases: New family members with applications in animal nutrition and a crystal structure at 0.78Å resolution // PLoS One. – 2021 Mar 12. – Vol. 16(3). – P. e0248190. doi: 10.1371/journal.pone.0248190.
2. Lombard V, Ramulu HG, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes data-base (CAZy) in 2013 // Nucleic Acids Res. – 2014. – Vol. 42(D1). – P. D490–D5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
3. Consortium CAZyedia. Ten years of CAZyedia: a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes // Glycobiology. – 2018. – Vol.28(1). – P. 3–8. Epub 2017/10/19. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx089>
4. Sais M., Barroeta A.C., López-Colom P., Nofrarías

M., Majó N., Lopez-Ulibarri R., Pérez Calvo E., Martín-Orúe S M. Martín-Orúe, Evaluation of dietary supplementation of a novel microbial muramidase on gastrointestinal unctuality and growth performance in broiler chickens // Poultry Science. – 2020. – Vol. 99 (1). – P.235-245, <https://doi.org/10.3382/ps/pez466>.

5. Hussain AM, Daniel RC, Frost AJ. The bactericidal effect of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase on bacteria // Vet Microbiol. – 1992, Jul. – Vol.32(1). – P.75-80. doi: 10.1016/0378-1135(92)90008-h.

6. Rathee A., Panwar A., Kumari S., Chhibber S., Kumar A. Functional Characterization and Structural Modelling of Peptidoglycan Degrading β-N-acetylglucosaminidase from a Dental Isolate of *Serratia marcescens* // Comb Chem High Throughput Screen. – 2021. – Vol. 24(9). – P.1514-1526. doi: 10.2174/1386207323999201103204234.

7. Патент RU 206175C1, дата публикации 10.06.1996.

8. Aslanidis C., de Jong P.J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR) // Nucleic Acids Res. – 1990. – Vol. 18. – P. 6069–6074

9. James P. Proteome Research: Mass Spectrometry // Heidelberg: Springer Verlag. – 2001. – 274 p.

10. Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A.V., Levashov P.A. Lysis of *Escherichia coli* cells by lysozyme: Discrimination between adsorption and enzyme action// Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2011. – Vol. 88 (1). – P.131-133

11. Hell W, Meyer HG, Gatermann SG. Cloning of aas, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties // Mol Microbiol. – 1998, Aug. – Vol. 29(3). – P.871-81. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00983.x. PMID: 9723925.

12. de Ruyter PGGA, Kuipers OP, Meijer WC, de Vos WM. Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening // Nat Biotechnol. – 1997. – Vol. 15(10). – P.976-9. <https://doi.org/10.1038/nbt1097-976>

REFERENCES

1. Moroz OV, Blagova E, Taylor E, Turkenburg JP, Skov LK, Gippert GP, Schnorr KM, Ming L, Ye L, Klausen M, Cohn MT, Schmidt EGW, Nymand-Grarup S, Davies GJ, Wilson KS. Fungal GH25 muramidases: New family members with applications in animal nutrition and a crystal structure at 0.78Å resolution // PLoS One. – 2021 Mar 12. – Vol. 16(3). – P. e0248190. doi: 10.1371/journal.pone.0248190.
2. Lombard V, Ramulu HG, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes data-base (CAZy) in 2013 // Nucleic Acids Res. – 2014. – Vol. 42(D1). – P.D490–D5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
3. Consortium CAZyedia. Ten years of CAZyedia: a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes // Glycobiology. – 2018. – Vol.28(1). – P. 3–8. Epub 2017/10/19. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx089>
4. Sais M., Barroeta A.C., López-Colom P., Nofrarías M., Majó N., Lopez-Ulibarri R., Pérez Calvo E., Martín-Orúe S M. Evaluation of dietary supplementation of a novel microbial muramidase on gastrointestinal unctuality and

growth performance in broiler chickens // Poultry Science. – 2020. – Vol. 99 (1). – P.235-245, <https://doi.org/10.3382/ps/pez466>.

5. Hussain AM., Daniel RC., Frost AJ. The bactericidal effect of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase on bacteria // Vet Microbiol. – 1992, Jul. – Vol.32(1). – P.75-80. doi: 10.1016/0378-1135(92)90008-h.

6. Rathee A., Panwar A., Kumari S., Chhibber S., Kumar A. Functional Characterization and Structural Modelling of Peptidoglycan Degrading β -N-acetylglucosaminidase from a Dental Isolate of *Serratia marcescens* // Comb Chem High Throughput Screen. – 2021. – Vol. 24(9). – P.1514-1526. doi: 10.2174/1386207323999201103204234.

7. Patent RU 206175C1, data publikacji 10.06.1996.

8. Aslanidis C., de Jong P.J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR) // Nucleic Acids Res. – 1990. – Vol. 18. – P. 6069–6074

9. James P. Proteome Research: Mass Spectrometry // Heidelberg: Springer Verlag. – 2001. – 274 p.

10. Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A.V., Levashov P.A. Lysis of *Escherichia coli* cells by lysozyme: Discrimination between adsorption and enzyme action // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2011. – Vol. 88 (1). – P.131-133

11. Hell W, Meyer HG, Gatermann SG. Cloning of *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties // Mol Microbiol. – 1998, Aug. – Vol. 29(3). – P.871-81. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00983.x. PMID: 9723925.

12. de Ruyter PGGA, Kuipers OP, Meijer WC, deVos WM. Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening // Nat Biotechnol. – 1997. – Vol. 15(10). – P.976-9. <https://doi.org/10.1038/nbt1097-976>

ӘОЖ: 579.66, 579.6, 577.15

ЖАҢА БАКТЕРИОЛИТИКАЛЫҚ N-АЦЕТИЛ-D-ГЛЮКОЗАМИНИДАЗА ФЕРМЕНТТІ ПРЕПАРАТЫ

Рожкова А.М.¹, Чулкин А.М.¹, Синельников И.Г.¹, Синицына О.А.², Зоров И.Н.^{1,2}, Синицын А.П.^{1,2}

¹Ресей ғылым академиясының «Биотехнологияның фундаменталды негіздері» федералды зерттеу орталығы, Ресей Федерациясы, 119071, Мәскеу қ., Ленинский проспекті 33, 2 құр., e-mail: info@fbras.ru

²М.В. Ломоносов атындағы Мәскеу мемлекеттік университеті, химия факультеті, Ресей Федерациясы, 119991, Мәскеу, Ленинские горы 1, 11 құр., e-mail: dekanat@chem.msu.ru

АБСТРАКТ

Streptomyces kursanovii N-ацетил-D-глюкозаминидазасын кодтайтын жаңа *nagI* гені клондалды. *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) жасушаларында N-ацетил-D-глюкозаминидаза экспрессиясының оптимизациясынан кейін еритін формадағы фермент алынды. Аффинді хроматографияның көмегімен ферменттің гомогенді формасы бөлініп, олардың *Micrococcus lysodeikticus* грам-оң бактериясына қатысты бактериолитикалық қасиеті зерттелді. Жаңа фермент тауық лизоцимінің лизисті белсенділігінен асатын бактериолитикалық қасиетке ие екендігі көрсетілген.

Түйін сөздер: ген, ферменттік препарат, глюкозаминидаза, жемдік антибиотиктер, лизоцим, пробиотик

UDC: 579.66, 579.6, 577.15

NEW BACTERIOLYTIC ENZYME PREPARATION N-ACETYL-D-GLUCOSAMINIDASE

Rozhkova A.M.¹, Chulkin A.M.¹, Sinelnikov I.G.¹, Sinitsyna O.A., Zorov I.N.^{1,2}, Sinitsyn A.P.²

¹Federal Research Centre 'Fundamental Bases of Biotechnology' of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 119071, Moscow, 33 Leninsky Prospekt, building 2, e-mail: info@fbras.ru

²Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Russian Federation, 119991, Moscow, 1 Leninskie Gory, building 11, e-mail: dekanat@chem.msu.ru

ABSTRACT

A new *nagI* gene encoding N-acetyl-D-glucosaminidase from *Streptomyces kursanovii* was cloned. The soluble form of N-acetyl-D-glucosaminidase was obtained after improving its expression in *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) cells. The homogeneous form of the enzyme was isolated by affinity chromatography, and its bacteriolytic ability against cells of the Gram-positive bacterium *Micrococcus lysodeikticus* was studied. It was demonstrated that the new enzyme's bacteriolytic capacity surpasses that of chicken lysozyme.

Keywords: gene, enzyme preparation, glucosaminidase, feed antibiotics, lysozyme, probiotic