

提高海洋产几丁质酶活性研究进展

田玉龙*, 朱欣蓓, 谢启发#, 赵梦冉, 濮晨玥, 周伊茜, 薛小旭

南京医科大学康达学院, 江苏 连云港

收稿日期: 2022年5月5日; 录用日期: 2022年6月8日; 发布日期: 2022年6月17日

摘要

海洋几丁质酶既可以有效地开发和利用大量的海洋甲壳类物质, 又可以通过节约能源、环境友好的方式, 制备更多的几丁寡糖及其衍生物等高价值的产物, 在食品、纺织、生物防治和环保等领域有着广泛的应用前景。本文着重阐述了几丁质酶学性质研究, 综述了利用发酵条件的优化和菌种诱变改良及基因工程等手段, 以提高野生海洋微生物的产酶能力。

关键词

几丁质酶, 发酵条件, 高产, 诱变因素

Advances in Research on Improving Marine Chitinase Activity

Yulong Tian*, Xinbei Zhu, Qifa Xie#, Mengran Zhao, Chenyue Pu, Yiqian Zhou, Xiaoxu Xue

Kangda College of Nanjing Medical University, Lianyungang Jiangsu

Received: May 5th, 2022; accepted: Jun. 8th, 2022; published: Jun. 17th, 2022

Abstract

Marine chitinase can not only effectively develop and utilize a large number of marine crustaceans, but also prepare more high-value products such as chitooligosaccharides and its derivatives in energy-saving and environment-friendly ways. It has a broad application prospect in food, textile, biological control and environmental protection. This paper focuses on the study of chitinase properties, and summarizes the use of optimization of fermentation conditions, mutation and improvement of strains and genetic engineering to improve the enzyme production capacity of wild marine microorganisms.

*第一作者。

#通讯作者。

Keywords

Chitinase, Fermentation Conditions, High Yield, Mutagenic Agent

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

几丁质, 又称甲壳质, 是一种可以在自然中发现的可更新的物质。海水中含有大量的甲壳质, 大部分来自贝类、原生动物、甲壳类以及菌类, 是海洋中最多的一种产物, 每年产量约为 10^{11} 吨[1]。尽管海洋中存在大量的几丁质, 但在海底的沉积物中, 其数量并未明显增长, 这是由于海洋几丁质沉淀期间, 海洋微生物通过分解几丁质而使几丁质含量维持平衡。由于几丁质降解产生的几丁寡糖及其衍生物分子量小, 溶解性强, 易被机体吸收, 被化工、食品、医药和农业等领域广泛应用。目前, 生产几丁寡糖主要是化学法和酶解法, 化学法利用浓酸或浓碱在加热条件下使几丁质分解, 反应时间长, 生产成本低, 专一性差, 容易产生其他副产物, 同时易造成环境污染[2]; 而生物酶解法是利用微生物分泌的酶使几丁质降解, 相比于化学法, 微生物酶解法具有反应条件温和、无污染、专一性强、降解过程容易控制等优点, 因此, 酶解法是绿色降解几丁质主要的研究方向和热点[3]。海洋产几丁质酶微生物因具有催化温度低、耐高压高盐、寡营养等优点, 在极端的环境有较高的催化活性等优点, 可以克服工业生产中催化温度等问题, 从而降低生产成本, 因此研究海洋微生物几丁质酶对几丁寡糖生产产业的发展有重要的现实意义和巨大的经济价值。

2. 几丁质酶的酶学性质

几丁质酶的作用环境丰富多样, 为了满足不同类型微生物的生存需求, 产酶的酶学性质变化多样, 因此不同微生物来源几丁质酶的酶学性质往往存在很大差异。就目前研究发现, 来源于细菌的几丁质酶数目明显多于其他来源的几丁质酶, 可见不同来源的几丁质酶仍有大量空白有待表征。

2.1. 分子量

通常情况下, 大部分几丁质酶的分子量在 20~120 kDa 之间, 其中放线菌几丁质酶约 30 kDa, 细菌是 60~110 kDa, 真菌类则是 30 kDa 以上[4]。菌类产生的几丁质酶的分子量差异很大。例如, 粘沙雷氏菌 (*S.marchese said* MB1466)可生成 5 个分子量分别为 21、36、48、52、57 kDa 的几丁质酶[5]。

2.2. pH 性质

pH 值的变化可以明显地影响几丁质酶的活性。大部分海洋细菌性几丁质酶的最佳 pH 值为 3.5~9.0, 而真菌和放线菌的最佳 pH 值则为 5.0~8.0 [6]。一般, 在 pH 4~7 之间, 细菌和放射菌的几丁质酶都是最活跃的, pH 值为 3~10 仍有活性; 在 pH 为 8~14 的条件下, 链霉菌来源的几丁质酶仍然能维持 50% 的活性[7]。

2.3. 温度性质

目前已有的几丁质酶的研究方向主要是中高温几丁质酶, 其最佳反应温度为 40°C ~ 50°C 。在高温下

易失活, 低温下活性很低或无酶活[8] [9]。一般情况下, 几丁质酶的耐热性约为 60℃。拟杆菌的几丁质酶在 50℃~60℃保温 6 h, 活力保持 80%以上, 枯草杆菌的几丁质酶在 100℃处理 20 min, 其活力几乎不变[10]。另外, 一些来自于海洋的微生物的几丁质酶在低温下也能起到一定的效果, 例如 *Pseudoalteromonas* sp. DL-6 表达的几丁质酶 Chi A 和 Chi C 的最适温度为 20℃和 30℃ [11]。另外, 一些菌株的几丁质酶也表现出一定的耐热能力, 目前已知的木霉几丁质酶中乙酰葡糖胺酶 CHIT 102 和内切几丁质酶 CHIT52 以及 CHIT33 均能在 100℃ 3 min、55℃ 15 min 的作用下维持其活力[12]。最近, Tanaka 从嗜高热的古菌 KOD1 中分离出一种具有极高的抗高温降解酶类[13], 其最适宜的反应温度为 85℃, 3 min 后即失去活性, 但其同族物质 ChiAΔ2 具有较高的耐热性, 在 100℃处理 3 h 后仍保留 70%的酶活力。几丁质酶对温度的耐受性越高, 在工业生产中的应用前景越广泛。

2.4. 金属离子对几丁质酶的影响

有许多金属离子, 例如 Ag^+ 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^+ 、 Sn^{2+} 、 Co^{2+} 等都对海洋微生物来源的几丁质酶活性有一定的影响[14]。但某些金属元素, 例如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 等对微生物产生的几丁质酶活性没有影响, 有些甚至具有活化活性[15]。若 Mg^{2+} 为 1~40 mmol/L, 则能增加交链单胞杆菌 *Alteromonas* sp. 0~7 产几丁质酶的活性为 1.6 倍[16]。另外, 由于木霉菌等几丁质酶酶活性不依赖其他因素, 所以其对几丁质酶的抑制效果不显著, 只有 Zn^{2+} 能抑制内切几丁质酶的活性[10]。

3. 提高微生物几丁质酶的活性

从海洋等自然界中筛选的野生几丁质酶产生菌因酶活低, 催化效率低, 在工业生产中难以大规模化利用, 因此, 为提高野生几丁质酶的酶活和催化效率, 国内外进行了大量的研究, 主要集中在发酵条件优化、诱变育种和基因工程等。

3.1. 发酵条件优化

产酶条件对菌株产酶有着显著的影响, 通过优化发酵条件可以显著提高几丁质酶菌株的发酵水平。目前, 国内外关于优化发酵条件提高几丁质微生物产酶的研究报道较多, 并且取得了较好的成效, 为工业化发酵产几丁质酶提供了理论参考。碳源、氮源、金属离子、培养基初始 pH、温度、摇瓶转速、接种龄和接种量都可对几丁质酶的合成产生一定的影响。郑家敏等[17]通过单因素和响应面实验方法, 对筛选得到的 G3-1 细菌进行发酵条件优化, 得出最佳发酵条件: 培养基初始 pH 9.0, 发酵时间 5 h, 接种量 10%, 摇床转速 220 r/min, 温度 30℃, 在此发酵条件下, 细菌产几丁质酶酶活比优化前提高了 109.3%, 效果显著。

3.2. 高产几丁质酶的诱变育种技术

目前, 有关微生物几丁质的研究工作在国际上有了很大的突破, 但较低的产酶量且遗传不稳定的菌株极大限制了几丁质酶在各个生产及生活方面的应用。通过对几丁质酶进行突变, 以增强其活力, 可分为常规突变和遗传学突变两大类。常规的基因突变技术有物理诱变和化学诱变两大类。而遗传学类主要采用了基因工程技术。

3.2.1. 物理诱变

物理诱变多为辐照突变, 其中以紫外光照射、X 射线、激光、微波等方法诱导突变为主。最常用的方法是紫外线诱导法, 将原质体浸出物放在 1 个培养皿内, 然后放在一个磁性搅拌机上, 在距离紫外线 30 厘米的地方进行搅拌 12 秒, 接着取出被辐射的细胞悬浮物, 最后在暗用 SMM 缓冲剂进行 10^{-6} 倍的

稀释, 涂布作为对照[18]。在紫外诱变 10 min 的剂量下, 可使微生物几丁质酶活性提高, 有望选育出高产几丁质酶菌株[19]。谢湘玉[20]的电子束诱变表明了诱变剂量有阈值, 当电子束为 0.04×10^6 rad 时诱变率达到最大, 酶活为出发菌株的 1.28 倍。马钦元等[15]利用室温等离子体诱导突变和微液滴流控过滤技术, 在 25 秒诱变照射的条件下, 获得了 1 株产酶量为 419.11 U/mL 的高产菌 B4, 发酵产物的产酶量是原来的 3.90 倍。

3.2.2. 化学诱变

化学诱变是将某些化学试剂添加至菌株培养基中, 使其发生基因突变。KAHARP 等[21]利用亚硝基胍作为诱导物, 通过化学方法诱导了白链霉菌 410 的变异, 最后获得了一株 ϵ -聚赖氨酸摇瓶产率 2.11 g/L 的高产双抗性变异体, 其产率比普通的野生菌数提高了 10 倍; 陈玮玮等[22]利用化学诱导试剂硫酸二乙酯诱导北里孢菌 PL6-3 进行了化学突变, 获得了 1 个单株 ϵ -聚赖氨酸摇瓶产量 1.2 g/L 的高产菌种, 其产率比非突变之前提高 3 倍; 尤丽新等[23]以硫酸二乙酯为原料, 通过对白色链霉菌进行化学诱导, 获得了一株产率为 2.90 g/L 的高变异菌系。

3.2.3. 物理 - 化学复合诱变

通过研究我们发现, 紫外线、X 射线、激光、微波辐射、离子束等物理方法具有设备简单、安全快速、操作方便等优点, 虽然可以获得较好的突变作用, 但如果长时间反复利用, 则会导致突变速率及耐水解度下降[24]。化学诱变突变频率较高, 但太高的诱变剂量极大程度上会产生毒性, 因此研究者们大胆尝试采用物理 - 化学复合诱变的方法以便达到更好的诱变效果。

田强等[25]利用 UV-LiCl 联合诱导获得 1 个高产的几丁质酶 TUC13, 通过对发酵工艺的优选, 得到了 0.11 U/mL 的酶活性, 比起始菌的活性高 236.5%。张敏等[26]采用紫外线、氯化锂和硫酸二乙酯三种不同的方法合成了 1 个具有很好的稳定度的菌株, 经优化得到的酶活为 1.53 U/mL, 比起始菌高 347.7%。郑家敏等[17]采用 UV-LiCl 与 LiCl 组合技术进行了诱变, 获得了 1 个具有优良基因的 GF-21, 经优化后, 其酶活性达到 4.73 U/mL, 比起始菌高 470%。

3.2.4. 基因工程技术

近年来, 分子生物学迅速发展, 大量的几丁质酶 DNA 片段被成功地复制到了基因工程和蛋白工程化领域。NCBI 数据库中大量基因序列的收录使得我们能够深入研究几丁质酶[5]。在 2008 年, Liu 等[27]对 *Chaetomium globosum* 进行了纯化, 获得了名为 chi46 的几丁质酶, 并获得了 0.71 U/mL 的活性; 2012 年, 汤伟等[28]通过基因工程技术, 从 *T. asperellum* 中获得了新基因并实现了几丁质酶基因的高效分泌表达, 酶活力高达 17.93 U/mL; 2016 年, Huo 等[29]克隆 *A. veronii* strain B565 得到 chi92 基因并在毕赤酵母中成功表达, 酶活高达 69.4 U/mL; 2021 年, 宋柳等[30]通过对三疣梭子蟹几丁质酶基因克隆及功能鉴定发现了基因表达量上调 9.96 倍的 PtCht1 基因; 2022 年, 张巧等[31]通过基因克隆及诱导表达获得 VnChit4 重组几丁质酶, 利用亲和纯化测得酶活为 2.66 U/mL。由此可见基因工程技术能高效表达并极大程度上提高几丁质酶的活性, 但实际能够成功的例子并不多, 基因工程技术在日后的发展就显得尤为重要。目前有的学者成功地分离出几丁质酶基因, 并将其分离到 ELISA 中进行异种表达, 得到了与 ELISA 基质能够良好结合且催化活性提高数倍的几丁质酶[32]。

4. 展望

本文主要介绍了海洋微生物几丁质酶的酶学性质, 着重探究了几丁质酶发酵条件的优化以及高产几丁质酶的诱变育种技术。越来越多的学者开始深入研究几丁质酶, 逐渐发现海洋中丰富的几丁质资源并加以利用。通过研究产几丁质酶海洋菌株的最佳发酵条件及诱变育种技术, 提高海洋产几丁质酶活性,

掌握工业生物酶法制备几丁寡糖工艺中的关键技术, 为实现几丁质酶的规模化工业化生产打下了良好的理论基础, 同时也为今后的几丁寡糖类的开发与应用作出了积极的探索。

基金项目

江苏省大学生创新创业资助项目(项目编号: 202113980007Y), 南京医科大学康达学院科技发展一般项目(项目编号: KD2021KYYB21114)。

参考文献

- [1] 文霞, 周少璐, 杨秀荏, 孙廷丽, 谢小保. 海洋微生物多糖降解酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(11): 38-46.
- [2] Yavari-Bafghi, M., Babavalian, H. and Amoozegar, M.A. (2019) Isolation, Screening and Identification of Haloarchaea with Chitinolytic Activity from Hypersaline Lakes of Iran. *Archives of Biological Sciences*, **71**, 71-81. <https://doi.org/10.2298/ABS180525049Y>
- [3] Jankiewicz, U. and Brzezinska, M.S. (2015) Purification, Characterization, and Gene Cloning of a Chitinase from *Stenotrophomonas maltophilia* N4. *Journal of Basic Microbiology*, **55**, 709-717. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400717>
- [4] 陈少波, 吴根福. 几丁质酶研究进展[J]. 科技通报, 2004, 20(3): 259-262.
- [5] Harpster, M.H. and Dunsmuir, P. (1989) Nucleotide Sequence of the Chitinase B Gene of *Serratia marcescens* QMB1466. *Nucleic Acids Research*, **17**, 5395. <https://doi.org/10.1093/nar/17.13.5395>
- [6] Wang, S.L. and Chang, W.T. (1997) Purification and Characterization of Two Bifunctional Chitinases/Lysozymes Extracellularly Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 380-386. <https://doi.org/10.1128/aem.63.2.380-386.1997>
- [7] Le, B. and Yang, S.H. (2019) Microbial Chitinases: Properties, Current State and Biotechnological Applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **35**, 144. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2721-y>
- [8] Shiladitya, D.S., Capes, M.D., Ram, K., et al. (2013) Amino Acid Substitutions in Cold-Adapted Proteins from *Haloarubrum lascusprofundi*, an Extremely Halophilic Microbe from Antarctica. *PLOS ONE*, **8**, e58587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058587>
- [9] Sun, Q., Di, W., Zhang, Z., et al. (2017) Effect of Cold-Adapted Microbial Agent Inoculation on Enzyme Activities during Composting Start-Up at Low Temperature. *Bioresour Technol*, **244**, 635-640. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.010>
- [10] 徐同, 柳良好. 木霉几丁质酶及其对植物病原真菌的拮抗作用[J]. 植物病理学报, 2002, 32(2): 97-102.
- [11] Pan, M., et al. (2019) Molecular Engineering of Chitinase from *Bacillus* sp. DAU101 for Enzymatic Production of Chitooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, **124**, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.01.012>
- [12] Tanaka, T., Fujiwara, S., Nishikori, S., et al. (1999) A Unique Chitinase with Dual Active Sites and Triple Substrate Binding Sites from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 5338-5344. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.12.5338-5344.1999>
- [13] 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[J]. 微生物学杂志, 2002(5): 47-50.
- [14] 张新月, 张月琪, 王凤彪, 等. 海洋细菌来源几丁质酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 383-389.
- [15] 马钦元, 申雁冰, 丁盼盼, 屠琳娜, 毕心宇, 王敏. 常压室温等离子诱变与微生物微滴培养选育几丁质脱乙酰基酶高产菌株[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 170-174.
- [16] Hara, S., Yamamura, Y., Fujii, Y., et al. (1989) Purification and Characterization of Chitinase Produced by *Streptomyces erythraeus*. *The Journal of Biochemistry*, **105**, 484-489. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122691>
- [17] 郑家敏, 梁燕辉, 朱凡, 等. 高产几丁质酶菌株的诱变选育及发酵条件的优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 88-95.
- [18] 胡基华, 陈静宇, 曹旭, 等. 高产几丁质酶的粘质沙雷氏菌株的诱变选育[J]. 东北林业大学学报, 2016, 44(3): 106-109.
- [19] 谢湘玉. 紫外诱变球孢白僵菌选育几丁质酶高产菌株方法的研究[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 1996, 24(3): 75-77.
- [20] 谢湘玉. 电子束诱变球孢白僵菌高产几丁质酶的研究[J]. 安庆师范学院学报: 自然科学版, 1996, 2(4): 58-59.

- [21] Kahar, P., Iwata, T., Hiraki, J., *et al.* (2001) Enhancement of ϵ -polylysine Production by *Streptomyces albulus* Strain 410 Using pH Control. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, **91**, 190-194. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80064-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80064-5)
- [22] 陈玮玮, 朱宏阳, 徐虹. ϵ -聚赖氨酸高产菌株选育及分批发酵的研究[J]. 工业微生物, 2007, 37(2): 28-30.
- [23] 尤丽新, 胡楠楠, 班硕. 产 ϵ -聚赖氨酸白色链霉菌的化学诱变育种[J]. 中国酿造, 2019(3): 130-133.
- [24] 施巧琴. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 68-70.
- [25] 田强, 张彩, 吴子健. 几丁质酶生产菌的诱变育种及摇瓶发酵条件优化[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 405-409.
- [26] 张敏, 胡晓, 万津瑜, 等. 高产几丁质酶的枯草芽孢杆菌诱变育种及发酵条件研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(11): 279-283.
- [27] Liu, Z.H., Yang, Q., Hu, S., Zhang, J.D. and Ma, J. (2008) Cloning and Characterization of a Novel Chitinase Gene (*chi46*) from *Chaetomium globosum* and Identification of Its Biological Activity. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **80**, 241-252. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1543-x>
- [28] 汤伟, 李雅华, 刘露, 等. 重组毕赤酵母表达棘孢木霉几丁质酶 Tachi1 的酶学性质研究及表达条件优化[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 345-352.
- [29] Huo, F., Ran, C., Yang, Y., *et al.* (2016) Gene Cloning, Expression and Characterization of an Exo-Chitinase with High β -Glucanase Activity from *Aeromonas veronii* B565. *Acta Microbiologica Sinica*, **56**, 787-803.
- [30] 宋柳, 张凤, 吕建建, 刘萍, 高保全, 李健. 三疣梭子蟹几丁质酶基因 1 的克隆及功能鉴定[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 144-153.
- [31] 张巧, 李永成. *Vibrio natriegens* 几丁质酶基因的异源表达及酶学性质研究[J]. 食品科技, 2022, 47(2): 10-17.
- [32] 郑家敏, 梁燕辉, 朱凡, 等. 几丁质酶基因的克隆表达及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1027-1034.