

高产壳聚糖酶菌株筛选鉴定、条件优化及酶学性质分析

梁颖, 刘睿, 宋超东, 谢俊杰, 殷豆豆, 许霞, 杨登峰, 张红岩, 申乃坤

Screening, Identification and Conditions Optimization of High Chitosanase Producing Strains, and Analysis of Its Enzymatic Properties

LIANG Ying, LIU Rui, SONG Chaodong, XIE Junjie, YIN Doudou, XU Xia, YANG Dengfeng, ZHANG Hongyan, and SHEN Naikun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110321>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

产壳聚糖酶海洋*Paenibacillus chitinolyticus* CLT08的鉴定及酶学性质研究

Identification and Enzymatic Properties of Chitosanase Producing Marine *Paenibacillus chitinolyticus* Strain CLT08

食品工业科技. 2022, 43(7): 132-138 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070143>

ARTP诱变法提高蜡状芽孢杆菌中壳聚糖酶的产量

ARTP Mutagenesis Improves the Production of Chitosanase in *Bacillus cereus*

食品工业科技. 2022, 43(1): 141-146 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040172>

产低温脂肪酶菌株鉴定、发酵条件优化及酶学性质分析

Identification of A Cold-active Lipase Producing Strain, Optimization of Fermentation Conditions and Analysis of Enzymatic Properties

食品工业科技. 2023, 44(20): 116-125 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022120159>

竹鼠肠道耐碱性木聚糖酶菌株的筛选及酶学性质研究

Screening of Alkaline Tolerant Xylanase Strains in Rhizomyidae Intestines and Study on Enzymatic Properties

食品工业科技. 2021, 42(23): 118-125 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030231>

热稳定性高 β -甘露聚糖酶产生菌的筛选、鉴定及酶学性质研究

Isolation, Identification and Enzyme Properties of a β -Mannanase Producing Strain with High Thermal Stability

食品工业科技. 2020, 41(19): 127-131 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.020>

牦牛酸奶酪中高产乳糖酶菌株分离鉴定及其酶学性质

Isolation and Identification of Microorganism with High Producing Lactase Activity from Yark Yoghourt Cheese and Its Enzymatic Properties

食品工业科技. 2019, 40(5): 124-129 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.05.021>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

梁颖, 刘睿, 宋超东, 等. 高产壳聚糖酶菌株筛选鉴定、条件优化及酶学性质分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(20): 157-166. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110321

LIANG Ying, LIU Rui, SONG Chaodong, et al. Screening, Identification and Conditions Optimization of High Chitosanase Producing Strains, and Analysis of Its Enzymatic Properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(20): 157-166. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110321

· 生物工程 ·

高产壳聚糖酶菌株筛选鉴定、条件优化 及酶学性质分析

梁颖¹, 刘睿¹, 宋超东¹, 谢俊杰¹, 殷豆豆¹, 许霞¹, 杨登峰², 张红岩¹, 申乃坤^{1,*}

(1.广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西多糖材料与改性重点实验室, 广西南宁 530006;

2.广西科学院, 广西北部湾海洋研究中心, 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室,
广西南宁 530007)

摘要: 为了筛选出高产壳聚糖酶的菌株, 并对其最优产酶条件及酶学性质进行研究。本研究从广西北海养殖虾塘底泥采样, 经初筛、复筛选出高产壳聚糖酶菌株, 并进行鉴定, 再通过单因素实验、Plackett-Burman 及正交试验优化产酶工艺, 最后对其酶学性质及产物进行研究。结果表明, 筛选到 1 株高产壳聚糖酶的菌株 Gxun-5.3.3, 鉴定为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*); 菌株 Gxun-5.3.3 产酶的最优工艺为: 麦芽糖 5 g/L、酵母粉 3 g/L、壳聚糖 15 g/L、初始 pH6.0、发酵时间 84 h, 优化后酶活可达 62.03 ± 1.18 U/mL, 较优化前 (39.87 ± 1.24 U/mL) 提高了 55.58%; 酶学性质研究表明, 该酶最适反应温度为 60 °C, 最适反应 pH 为 5.0, 金属离子中 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 对壳聚糖酶有显著 ($P < 0.05$) 的激活作用, 而 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 则有较强的抑制作用; 酶解壳聚糖产物经薄层层析 (Thin Layer Chromatography, TLC) 测定为聚合度 2~4 的壳寡糖, 表明菌株所产壳寡糖酶为内切型。本研究为 *B. cereus* Gxun-5.3.3 壳聚糖酶的生产 and 壳寡糖的酶法制备提供了理论依据。

关键词: 壳聚糖酶, 蜡样芽孢杆菌, 条件优化, 酶学性质, 壳寡糖

中图分类号: TS203.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)20-0157-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110321



本文网刊:

Screening, Identification and Conditions Optimization of High Chitosanase Producing Strains, and Analysis of Its Enzymatic Properties

LIANG Ying¹, LIU Rui¹, SONG Chaodong¹, XIE Junjie¹, YIN Doudou¹, XU Xia¹, YANG Dengfeng²,
ZHANG Hongyan¹, SHEN Naikun^{1,*}

(1. Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modifications, School of Marine Sciences and
Biotechnology, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, China;

2. Guangxi Academy of Sciences, Guangxi Beibu Gulf Marine Research Center, Guangxi Key Laboratory of Marine Natural
Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Nanning 530007, China)

Abstract: To screen and identify high chitosanase producing strains and to optimize the fermentation condition and analyze the enzymatic properties of the target strain. In this study, high chitosanase-producing strain was screened from the sediment of shrimp ponds in Beihai, Guangxi through primary and secondary screening. The strain underwent

收稿日期: 2023-11-30

基金项目: 广西科技重点研发计划项目 (桂科 AB21196019, 桂科 AB21220020); 国家自然科学基金项目 (31660022, 32060020); 大学生创新创业训练计划项目 (202110608014, S202210608164, S202210608156); 广西民族大学实验技术创新与实验室管理研究项目 (2023MDSY002); 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室开放基金资助。

作者简介: 梁颖 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物资源开发与利用, E-mail: ly_ng_bjyx200112@163.com。

*** 通信作者:** 申乃坤 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物资源挖掘及代谢工程改造研究, E-mail: shennaik05@126.com。

identification, the enzyme production process of the strain was optimized through single-factor, Plackett-Burman and orthogonal optimization methods. The enzymatic properties and products of chitosanase produced by the strain were studied. The results showed that the strain of Gxun-5.3.3 with high chitosanase production was obtained by screening and was identified as *Bacillus cereus*. The optimal components for the enzyme-producing medium of *B. cereus* Gxun-5.3.3 was maltose 5 g/L, yeast powder 3 g/L, chitosan 15 g/L, and the initial pH and fermentation time were 6.0 and 84 h, respectively. Under the optimized conditions, the chitosanase activity reached 62.03 ± 1.18 U/mL, which was 55.58% higher before optimization (39.87 ± 1.24 U/mL). The protease produced by strain Gxun-5.3.3 had maximum activity at 60 °C and optimum pH at 5.0, respectively. Metal ions Fe^{2+} and Mn^{2+} had a significant ($P < 0.05$) activation effect on chitosanase, but Al^{3+} and Cu^{2+} had a strong inhibition. The enzymatic chitosan products were determined by TLC (thin layer chromatography) as chito-oligosaccharides with polymerization degree 2–4, indicating that the chitosanase produced by the strain was acting on endo-oligosaccharides. This study would provide a theoretical basis for the chitosanase production of *B. cereus* Gxun-5.3.3 and the enzymatic preparation of chito-oligosaccharides.

Key words: chitosanase; *Bacillus cereus*; condition optimization; enzymatic properties; chito-oligosaccharides

甲壳素是自然界中仅次于纤维素的第二大天然高分子物质,广泛存在于海洋中的虾蟹壳、陆生昆虫^[1]。甲壳素脱乙酰基后称为壳聚糖,壳聚糖中含有不稳定的糖苷键,可通过水解得到水溶性、相容性和安全性较好的壳寡糖。壳寡糖在较短的 N-葡萄糖胺(N-Glc)单元上暴露出阳离子基团,因此具有较高的细胞传导性,可通过肠上皮细胞进行吸收^[2]。壳寡糖在医学上表现出抗糖尿病^[3]、抗 HIV-1^[4]和调节机体免疫活性^[5]等功能,在食品应用上,可作为食品天然防腐产品替代苯甲酸钠等化学防腐剂^[6],并且具有良好的吸湿保湿能力,对果蔬起到保鲜作用^[7]。总之,壳寡糖在许多方面具有广阔的应用前景。

目前,壳寡糖的生产主要有化学酸解法、物理降解法、生物酶解法。化学酸解壳聚糖过程中 O-糖苷键、N-乙酰键都会被水解,存在条件控制难、活性丧失等问题^[8];物理降解法产物纯度高,但产量低,大规模生产受限制^[9];生物酶解法无毒可控,对产物结构影响较小^[10],且酶解过程具有反应条件温和、稳定性高、无环境污染、可在经济上实现大规模可持续生产等优点^[11]。因此,酶解法生产壳寡糖成为当前的研究热点之一。

壳聚糖酶又称壳聚糖 N-乙酰氨基葡萄糖水解酶,可专一性催化壳聚糖生成壳寡糖或氨基葡萄糖,由 Monaghan 等^[12]1973 年首次提出。根据其在底物上的切割方式不同可分为内切壳聚糖酶和外切壳聚糖酶。自然界中许多微生物都可以产壳聚糖酶, Aktuganov 等^[13]的研究表明苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis* var. *dendrolimus*) B-387 产壳聚糖内切酶活性为 3~12.5 U/mL。Wang 等^[14]研究的水状杆菌属(*Aquabacterium* sp.) A7-Y 产壳聚糖内切酶能够降解真菌细胞壁,产酶活性为 18 U/mg。陈小娥^[15]研究的曲霉属(*Aspergillus* sp.) CJ22-3 产外切酶壳聚糖酶活性为 3.06 U/mL。尽管目前对产壳聚糖酶菌株的筛选取得一定的进展,但仍存在酶活水平低,抗逆性差等问题,严重影响壳寡糖的酶法生产。因此,亟需筛选出产壳聚糖酶活性高、抗逆性强的菌株。

本研究旨在筛选出高产壳聚糖酶的菌株,并进

行鉴定及产酶条件优化,进一步对菌株产酶性质及产物进行分析,以期利用该菌株所产壳聚糖酶生产壳寡糖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株 由本实验室从广西北海海虾养殖场底泥中分离获得;葡萄糖、麦芽糖、粉末壳聚糖 上海源叶生物科技有限公司;酵母粉、大豆粉、革兰氏染色试剂盒、芽孢染色试剂盒 青岛海博生物科技有限公司; K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 均为国产分析纯。

Epoch 酶标仪 美国 BioTek 公司; Fresco 21 微量离心机 金博仕生物技术有限公司; T100 PCR 仪

上海超敏生物科技有限公司; WD-9413C 凝胶成像分析仪 济南来宝医疗器械有限公司; SUPRA 55 Sapphire 场发射扫描电子显微镜 德国卡尔蔡司公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制 富集培养基(g/L): 壳聚糖 5, KH_2PO_4 0.1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 5, pH7.0; 筛选培养基(g/L)^[16]: A 液: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.4, KH_2PO_4 0.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, NaCl 7, 酵母粉 4, 琼脂 40, pH 8.5; B 液: 胶体壳聚糖 10。A 液和 B 液灭菌冷却至 60 °C 后等体积混合。种子培养基(g/L): 酵母粉 3, 蛋白胨 5, 葡萄糖 3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.7, NaCl 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 0.3, pH7.0; 发酵培养基(g/L): 壳聚糖 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.4, NaCl 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.3, KH_2PO_4 0.3, 酵母粉 3, pH7.0。以上培养基均 121 °C 灭菌 20 min。

1.2.2 菌株的筛选

1.2.2.1 初筛 取采集样品 10 g 与 20 mL 无菌水混合, 35 °C、200 r/min 避光振荡 30 min, 稀释涂布至 LB 培养基, 35 °C 培养 48 h 后挑选单菌落接至初筛培养基, 35 °C 培养 72 h 后测量透明圈直径(D)和菌落直径(d), 计算圈径比值(D/d), 圈径比大小能够反

应菌株产酶能力,根据 D/d 值大小初步筛选出产壳聚糖酶能力较强的菌株^[17]。

1.2.2.2 复筛 将圈径比较大的菌株接种至种子液,按照 2%(v/v)接种量接种至发酵培养基,35 ℃、200 r/min 发酵 72 h,测定不同菌株产壳聚糖酶酶活进行复筛,选酶活最大的菌株进行下一步研究。

1.2.3 菌株的鉴定

1.2.3.1 形态学鉴定 取出保藏好的菌株在 LB 固体培养基进行划线,35 ℃ 恒温培养 24 h 后,挑取菌体进行革兰氏染色、芽孢染色。通过光学显微镜及扫描电子显微镜观察菌株形态结构。

1.2.3.2 生理生化鉴定 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[18]及《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》^[19]对菌株进行生理生化鉴定。

1.2.3.3 分子生物学鉴定 挑取 LB 培养基上的单菌落,置于 100 μL EP 管中,加入 35 μL Chelex-100,螺旋振荡仪中振荡 30 s,99 ℃ 恒温水浴 20 min,离心取上清液做 PCR 体系中的模板。使用 16S rRNA 通用引物(27F 和 1492R)进行 PCR 扩增,测序结果利用 Ezbiocloud 数据库进行比对;使用 MEGA 7.0 软件 Neighbor-Joining 法(自展数为 1000)构建菌株系统发育进化树。

1.2.4 壳聚糖酶粗酶液的制备 取发酵液 2 mL,12000 r/min 离心 5 min,取上清液缓慢加入硫酸铵粉末至饱和度为 70%,于 4 ℃ 过夜,10000 r/min,低温离心 30 min,收集沉淀,加入等体积磷酸盐缓冲液(pH7.2)溶解后得到粗酶液,放入 4 ℃ 冰箱备用^[20]。

1.2.5 壳聚糖酶活力测定 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法,并配制 1 mg/mL 的 N-乙酰氨基葡萄糖标准溶液绘制标准曲线^[21]。分别取 400 μL 粗酶液置于 2 mL 的 EP 管中,做为试验组和对照组,其中对照组沸水浴灭活 10 min,再分别加入 400 μL 10 g/L 胶体壳聚糖,50 ℃ 反应 15 min,取反应液 200 μL 与 300 μL DNS 混合,沸水浴 10 min,12000 r/min 离心 3 min,取 200 μL 测 540 nm 吸光值,根据标曲公式计算壳寡糖含量。壳聚糖酶活定义^[13]:上述反应条件下 1 mL 粗酶液在 1 min 内反应产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为 1 个酶活单位(U/mL)。

1.2.6 菌株 Gxun-5.3.3 产壳聚糖酶条件优化

1.2.6.1 单因素实验 在发酵培养基的基础上,研究不同因素对菌株 Gxun-5.3.3 产壳聚糖酶的影响。碳源及浓度:分别添加 10 g/L 可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖、木薯淀粉、麦芽糖、果糖;确定最适碳源后再进行浓度优化(0、1、2、5、10、15、20 g/L)。氮源及浓度:10 g/L 玉米浆、蛋白胨、大豆粉、尿素、氯化铵、酵母粉;确定最适氮源后再进行浓度优化(0、2、5、10、15、20 g/L)。无机盐种类:0.15 g/L MnSO₄、KCl、MgSO₄、CaCl₂、FeSO₄。发酵初始 pH:4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。底物浓度(壳聚糖):2、5、

10、15、20 g/L。发酵时间:24、36、48、60、72、84、96 h。培养条件为:接种量 2%(v/v),发酵温度 35 ℃,转速 200 r/min,发酵时间 72 h,测定壳聚糖酶活,确定各因素最适合条件。

1.2.6.2 Plackett-Burman(PB)优化试验 对单因素筛选出影响酶活较大的 6 个因素(碳源、氮源、初始 pH、温度、NaCl、时间)进行 PB 优化试验,每个因素取高、低 2 个水平(表 1)。

表 1 Plackett-Burman(PB)试验设计
Table 1 Experimental design of Plackett-Burman (PB)

序号	因素	低水平	高水平
A	麦芽糖(g/L)	1	2
B	酵母粉(g/L)	2	5
C	初始pH	6	7
D	温度(℃)	32	35
E	NaCl(g/L)	2	5
F	时间(h)	72	84

1.2.6.3 正交试验 对 PB 试验结果进行显著性分析,选取显著性最高的 3 个因素(氮源、碳源、初始 pH),进行下一步 L₉(3⁴)正交优化试验(表 2)。

表 2 L₉(3⁴)正交试验因素水平设计
Table 2 Factors and levels of orthogonal experiments design of L₉(3⁴)

水平	因素		
	A: 氮源(g/L)	B: 碳源(g/L)	C: 初始pH
1	2	1	6
2	5	2	7
3	8	3	8

1.2.7 菌株 Gxun-5.3.3 产壳聚糖酶粗酶液酶学性质分析

1.2.7.1 温度对酶活性及稳定性的影响 将反应体系在 30、40、50、60、70、80 ℃ 条件下反应 15 min,测定壳聚糖酶活力,确定最佳反应温度。同时,将粗酶液分别置于上述温度梯度恒温孵育 2 h 后,测定壳聚糖酶活力,以最高酶活力为 100%,计算不同反应温度下的相对酶活,计算公式如下:

$$\text{相对酶活}(\%) = \frac{A}{A_0} \times 100$$

式中: A 表示各实验组酶活; A₀ 表示实验组中最高酶活。

1.2.7.2 pH 对酶活性及稳定性的影响 将反应体系 pH 设置在 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,测定粗酶液在不同 pH 缓冲液下的酶活性,确定最佳反应 pH。将粗酶液置于上述 pH 缓冲液中最适温度下恒温孵育 2 h 后,测定壳聚糖酶活力,计算不同 pH 条件下的相对酶活。

1.2.7.3 金属离子对酶活性的影响 将粗酶液置于终反应金属离子浓度为 10 mg/mL 的 Mn²⁺、Al³⁺、

Fe^{2+} 、 K^{+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 中孵育 2 h, 测定壳聚糖酶活力, 以未加金属离子酶活为 100%, 计算添加不同金属离子的相对酶活。

1.2.7.4 酶的底物特异性 将粗酶液分别与 10 g/L 的胶体壳聚糖、羧甲基纤维素钠、可溶性淀粉、粉末壳聚糖、葡萄糖等底物进行反应, 测定壳聚糖酶活力, 以最高底物酶活为 100%, 计算其他底物相对酶活。

1.2.8 薄层层析法(Thin Layer Chromatography, TLC) 测定酶解产物 以 10 g/L 胶体壳聚糖为底物, 与粗酶液 1:1(v/v)混合, 60 ℃ 条件下, 分别反应 0、5、10、15、20 min 后, 沸水浴 5 min, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清用毛细管于硅胶板上点样, 以壳寡糖及盐酸氨基葡萄糖为标样, 将硅胶板置于层析缸中, 加入展层剂(异丙醇:氨水=2:1, v/v)缓慢展开。层析液离硅胶板上边缘 1 cm 处时层析结束, 将硅胶板从层析缸中取出吹干, 均匀喷涂 10 g/L 茚三酮溶液后进行高温烘干显色^[22]。通过酶解产物在硅胶板上分离的位置, 与标样壳寡糖及盐酸氨基葡萄糖薄层位置比对, 判断酶解产物为内切型壳聚糖酶或外切型壳聚糖酶。

1.3 数据处理

本研究每个样品设置三个生物学重复, 结果取平均值。采用 Excel 2019 进行数据处理, 用 Design Expert 10 对 PB 试验进行分析, 用 IBM SPSS statistics 21.0 对单因素实验、酶学性质的实验数据进行显著性分析(多重比较用 S-N-K 法)及对正交实验进行方差分析(单变量交互分析), 用 GraphPad Prism 8 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 产壳聚糖酶菌株的筛选、鉴定

从采集的 14 份海虾养殖场底泥样品中筛选到 96 株菌株, 可在壳聚糖平板产明显透明圈, 其中有 7 株圈径比(D/d)≥1.1, 菌株 Gxun-5.3.3 的 D/d 最大为 1.67±0.13(表 3、图 1a)。进一步对 7 株圈径比较大的菌株进行复筛测定酶活, 菌株 Gxun-5.3.3 酶活最高, 可达 39.87±1.24 U/mL(表 3)。这说明圈径比可以作为壳聚糖酶初筛的依据, 圈径比越大说明菌株分泌胞外壳聚糖酶能力越强。因此, 将酶活最高的 Gxun-5.3.3 作为后续试验菌株。

表 3 菌株圈径比及酶活结果

Table 3 Results of strain cycle diameter ratio and enzyme activity

菌株	圈径比 (D/d)	酶活 (U/mL)
Gxun-5.3.3	1.67±0.13 ^a	39.87±1.24 ^a
Gxun-21.7.1	1.46±0.03 ^b	35.33±1.91 ^b
Gxun-3.3.2	1.20±0.09 ^{cd}	34.32±0.95 ^b
Gxun-TX2.1.3	1.27±0.12 ^c	34.13±1.36 ^b
Gxun-6.3.1	1.34±0.01 ^{bc}	31.14±0.65 ^c
Gxun-1.2X	1.23±0.05 ^{cd}	30.58±0.76 ^c
Gxun-21.1.1	1.10±0.04 ^d	25.14±0.84 ^d

注: 同列不同字母表示存在显著性差异($P<0.05$)。

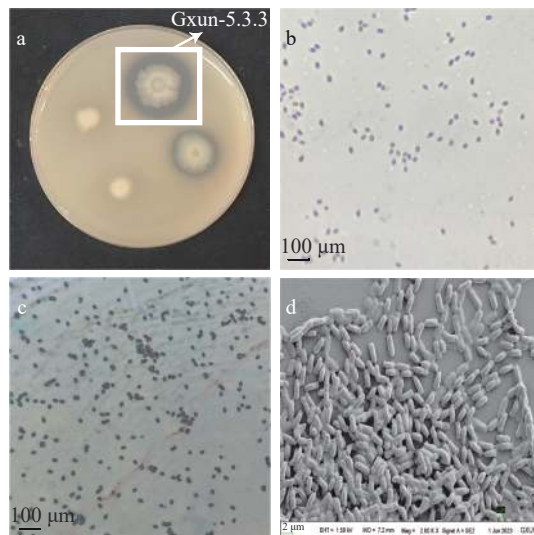


图 1 菌株 Gxun-5.3.3 透明圈及形态学鉴定

Fig.1 Strain Gxun-5.3.3 transparencies and morphological identification

注: a. 平板初筛图壳聚糖平板透明圈; b. 革兰氏染色图(100×); c. 芽孢染色图(100×); d. 电镜图(2000×)。

将菌株 Gxun-5.3.3 划线于 LB 平板 35 ℃ 培养 48 h, 菌落表面呈现蜡状, 颜色为乳白色且不透明, 菌落边缘不规则; 进一步生理生化鉴定结果为: 革兰氏染色阳性(图 1b), 产芽孢(图 1c); 扫描电镜显示菌株为短杆状、长约 2.5 μm(图 1d); 由表 4 可知, 甲基红(MR)试验、靛基质试验(吡啶试验)、β-半乳糖苷酶试验、明胶液化试验鉴定结果均为阳性, 而氧化发酵试验(OF 试验)、硫化氢试验、氨基酸脱羧酶试验、淀粉水解酶试验鉴定结果均为阴性, 说明该菌株为芽孢杆菌属。菌株 16S rRNA 比对结果与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) ATCC 14579 相似性最高, 达到 99%。用 MEGA7.0 软件对菌株 Gxun-5.3.3 的 16S rRNA 序列进行比对分析并构建系统发育树, 菌株 Gxun-5.3.3 与 *B. cereus* 的亲缘关系最近(图 2), 综合形态学鉴定、生理生化鉴定、16S rRNA 序列分析, 菌株 Gxun-5.3.3 鉴定命名为 *B. cereus* Gxun-5.3.3, 现保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC), 保藏号为 GDMCC NO: 62890。

表 4 生理生化鉴定结果

Table 4 Results of physiological and biochemical characterization

项目名称	结果	项目名称	结果
革兰氏染色	+	芽孢染色	+
硫化氢试验	-	氧化发酵试验(OF试验)	-
甲基红试验(MR试验)	+	明胶液化试验	+
靛基质试验(吡啶试验)	+	淀粉水解酶试验	-
β-半乳糖苷酶试验	+	氨基酸脱羧酶试验	-

注: “+”结果为阳性; “-”结果为阴性。

2.2 菌株 Gxun-5.3.3 产酶条件优化

2.2.1 单因素实验结果 碳源优化结果表明(图 3A), 与对照相比, 除添加果糖组对酶活无显著促进外

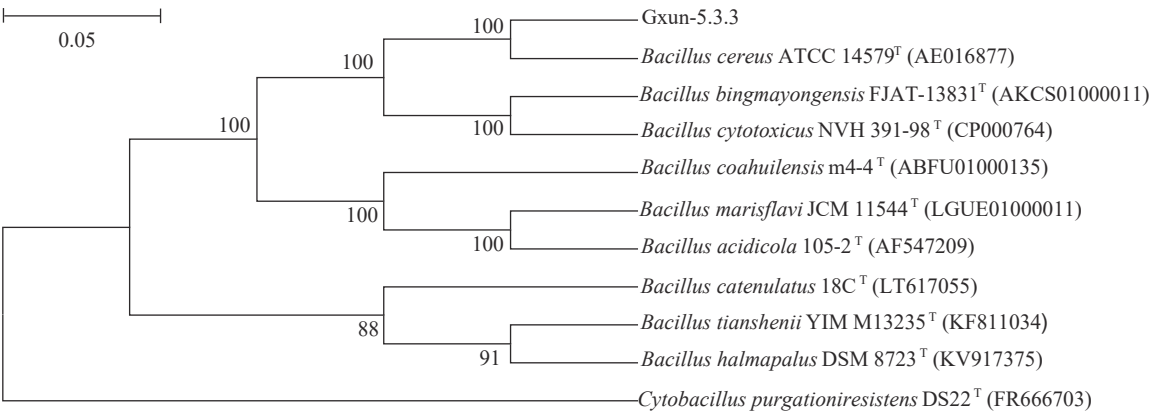


图 2 基于菌株 Gxun-5.3.3 序列构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree constructed based on the sequence of strain Gxun-5.3.3

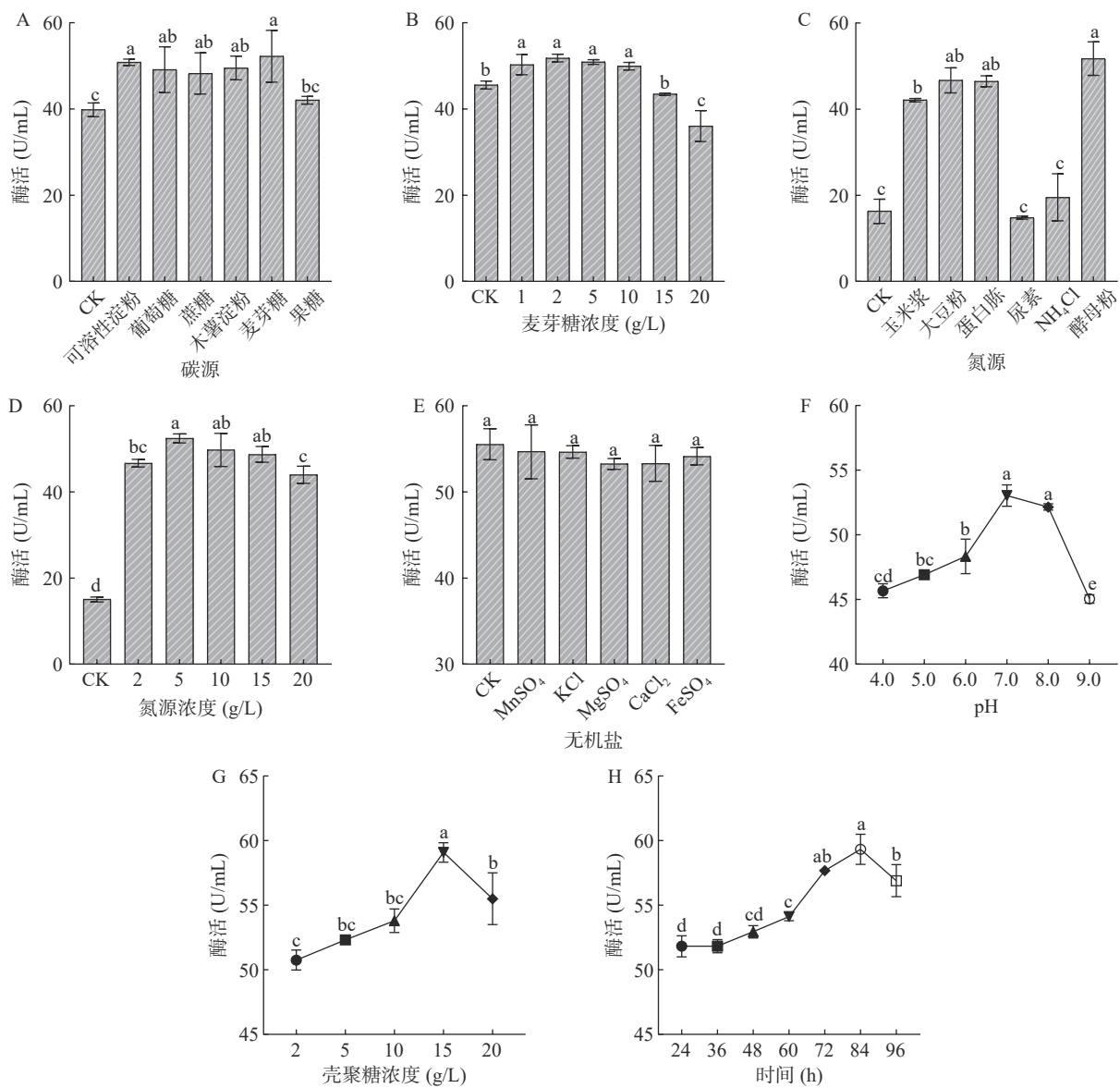


图 3 培养基及培养条件对菌株产壳聚糖酶的影响

Fig.3 Effects of medium and culture conditions on chitosanase production by strains of bacteria

注: A. 碳源; B. 麦芽糖浓度; C. 氮源; D. 酵母粉浓度; E. 无机盐; F. pH; G. 壳聚糖浓度; H. 时间; 不同字母代表组别之间存在显著性差异($P<0.05$); 图 4~图 7 同。

($P>0.05$), 添加其他不同碳源对酶活均起到显著促进作用($P<0.05$), 其中麦芽糖对菌株产酶促进作用最强。麦芽糖浓度优化结果表明, 当浓度 0~2 g/L 时, 酶活随浓度的增加而增大, 添加浓度为 2 g/L 时,

酶活达到最大为 52.25 ± 0.83 U/mL。当添加浓度为 2~10 g/L, 对酶活影响较小 ($P > 0.05$)。但当浓度高于 15 g/L 时, 酶活随着麦芽糖浓度增加而显著降低 ($P < 0.05$) (图 3B), 这表明添加过多的麦芽糖会对菌株产酶产生抑制。因此, 菌株 Gxun-5.3.3 产壳聚糖酶的最适碳源为 2 g/L 的麦芽糖。

由图 3C 可知, 添加酵母粉、玉米浆、大豆粉、蛋白胨有机氮源均对菌株产酶起到显著促进作用 ($P < 0.05$), 其中酵母粉促进作用最强, 而添加无机氮源尿素和氯化铵对酶活影响效果不显著 ($P > 0.05$)。进一步对酵母粉浓度优化结果表明 (图 3D), 当添加量为 5 g/L 时, 酶活最高可达 52.49 ± 1.00 U/mL。但当添加量为 20 g/L 时, 对菌株产酶产生显著抑制作用 ($P < 0.05$), 可能是高浓度酵母粉会使菌体生长旺盛, 不利于酶的积累。因此, 菌株 Gxun-5.3.3 产酶的最适氮源为 5 g/L 酵母粉。

添加无机盐对菌株产酶无显著影响 ($P > 0.05$) (图 3E)。因此, 菌株 Gxun-5.3.3 产酶过程中无需额外添加无机盐, 可降低发酵成本。

菌株发酵培养基初始 pH 为 4.0~7.0 时, 酶活随着 pH 增加逐渐增大, pH 为 7.0 时酶活最高为 53.03 ± 0.83 U/mL; 但当 pH 为 7.0~9.0 时, 酶活随着 pH 的增加反而降低, 表明过高或过低的 pH 不适合菌株产酶 (图 3F)。因此, 菌株 Gxun-5.3.3 产酶最适初始 pH 为 7.0。

当底物浓度低于 15 g/L 时, 酶活随底物浓度增加而逐渐增大, 当底物浓度为 15 g/L 时, 酶活达到最高为 59.08 ± 0.75 U/mL; 但当底物浓度高于 15 g/L 时, 酶活随浓度升高而迅速下降, 可能是过高底物浓度对菌株生长和产酶产生抑制作用。因此, 菌株 Gxun-5.3.3 产酶最适底物浓度为 15 g/L 壳聚糖, 此时酶活最高可达 59.08 ± 0.75 U/mL (图 3G)。

发酵时间优化结果表明 (图 3H), 当发酵时间小于 84 h 时, 酶活随着发酵时间的增加而增大, 发酵 84 h 时酶活最高可达 59.33 ± 1.16 U/mL; 但当发酵时间大于 84 h 时, 酶活随时间延长反而降低, 可能是酶在长时间发酵过程中被降解或失活。因此, 菌株 Gxun-5.3.3 产壳聚糖酶最适发酵时间为 84 h。

2.3 Plackett-Burman (PB) 试验

根据 Plackett-Burman 试验设计及结果 (表 5), 经由 Design Expert 10 软件分析得到 B(氮源)、C(初始 pH) 对 Gxun-5.3.3 产酶水平具有显著影响 ($P < 0.05$) (表 6), 因此选取 B(氮源)、C(初始 pH) 及较显著的 A(碳源) 进行下一步的正交试验。

2.4 正交试验

综合正交试验结果及方差分析 (表 7、表 8), R 表示各因素对菌株 Gxun-5.3.3 产酶活性的影响程度, R 越大影响越显著, 因此在碳源、氮源、初始 pH 三个因素中对菌株 Gxun-5.3.3 产酶活性影响的主次关系为 $A > B > C$ 。各因子最佳发酵组合为 5 g/L

表 5 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 5 Design and results of Plackett-Burman experimental

实验号	A碳源 (g/L)	B氮源 (g/L)	C初始 pH	D温度 (℃)	E NaCl (g/L)	F时间 (h)	酶活 (U/mL)
1	1	5	7	32	2	84	4.54 ± 0.58
2	1	2	7	32	5	72	1.84 ± 0.83
3	1	5	6	35	5	72	20.59 ± 2.49
4	2	2	7	32	5	84	3.02 ± 0.83
5	1	2	6	35	5	84	12.60 ± 3.99
6	2	5	7	35	5	72	16.77 ± 0.75
7	2	2	7	35	2	72	2.33 ± 0.71
8	2	5	6	32	2	72	48.86 ± 7.07
9	1	5	7	35	2	84	8.83 ± 0.16
10	2	2	6	35	2	84	3.02 ± 2.08
11	1	2	6	32	2	72	11.95 ± 0.42
12	2	5	6	32	5	84	38.57 ± 0.47

表 6 Plackett-Burman 试验分析结果

Table 6 Results of Plackett-Burman experimental analysis

方差来源	平方和	自由度	平方和均	F值	P值	显著性
模型	2189.17	6	364.86	5.58	0.0394	**
A	227.17	1	227.17	3.48	0.1212	*
B	891.38	1	891.38	13.64	0.0141	**
C	804.64	1	804.64	12.31	0.0171	**
D	166.13	1	166.13	2.54	0.1717	
E	15.99	1	15.99	0.24	0.6418	
F	84.05	1	84.05	1.29	0.3081	
误差	326.67	5	65.33			
总和	2515.84	11				

注: **代表显著 ($P < 0.05$); *代表除显著因素外影响较大的因素。

表 7 正交试验结果

Table 7 Results of orthogonal experimental

实验号	A氮源 (g/L)	B碳源 (g/L)	C初始pH	酶活(U/mL)
1	2	1	6	44.30 ± 6.76
2	2	2	8	48.68 ± 3.02
3	2	3	7	53.03 ± 2.55
4	5	1	8	50.02 ± 2.27
5	5	2	7	51.07 ± 1.68
6	5	3	6	59.46 ± 2.87
7	8	1	7	33.21 ± 2.92
8	8	2	6	39.67 ± 3.37
9	8	3	8	40.53 ± 1.82
k1	48.67	42.51	47.81	
k2	53.52	46.48	45.77	
k3	37.80	51.01	46.41	
R	15.72	8.50	2.04	
主次	A>B>C			
最优组合	A2	B3	C1	

表 8 正交试验方差分析

Table 8 Orthogonal experimental analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	平方和均	F值	P值
修正模型	1510.696	6	251.783	22.125	0.000
氮源浓度	1165.371	2	582.685	51.204	0.000
碳源浓度	325.777	2	162.888	14.314	0.000
pH	19.548	2	9.774	0.859	0.439
误差	227.596	20			
总计	6054.171	27			

酵母粉(A2)、3 g/L 麦芽糖(B3)、初始 pH6.0(C1)。对正交试验获得最佳条件进行验证试验,测得酶活为 62.03 ± 1.18 U/mL, 优于 6 号实验组酶活最佳值,表明正交试验的准确性。优化后壳聚糖酶活较优化前(39.87 ± 1.24 U/mL)提高了 55.58%。

2.5 菌株 Gxun-5.3.3 产壳聚糖粗酶液的酶学性质

2.5.1 温度对酶活性及稳定性的影响

温度对酶促反应起关键作用,因此对酶的最适反应温度及稳定性的探究对酶法生产壳寡糖具有重要意义。当反应温度在 30~60 °C 时,酶活随着温度的升高显著增加 ($P < 0.05$), 60 °C 时达到最大。但当反应温度高于 70 °C 时,酶活逐渐降低,80 °C 时,相对酶活显著降低 ($P < 0.05$), 仅有 50% 左右(图 4),可能是由于温度过高引起酶分子结构的改变,从而导致酶失活,因此,菌株 Gxun-5.3.3 产壳聚糖酶的最适反应温度为 60 °C。酶温度稳定性结果表明,当温度高于 50 °C 后,酶活性急剧下降,这与酶的最适反应温度不同,这是因为酶没有反应底物的保护,更容易受温度影响而失活^[23]。Gxun-5.3.3 产壳聚糖酶温度稳定性与多数研究报道壳聚糖酶在 30~45 °C 热稳定性较好,而 50~80 °C 热稳定性较差结果类似^[24-25],因此,该酶更适合在 30~50 °C 下保存。

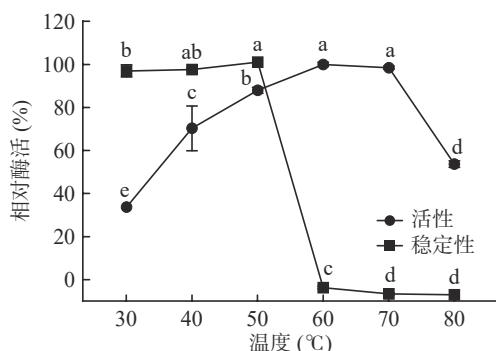


图 4 温度对酶活性及稳定性影响

Fig.4 Effects of temperature on enzyme activity and stability

2.5.2 pH 对酶活性及稳定性的影响

pH 对酶活性影响结果表明(图 5), 当 pH 为 3.0~5.0 时,相对酶活随 pH 升高而增大, pH 为 5.0 达到最大。但当 pH 为 5.0~9.0 时,相对酶活随 pH 增加而迅速降低,可能

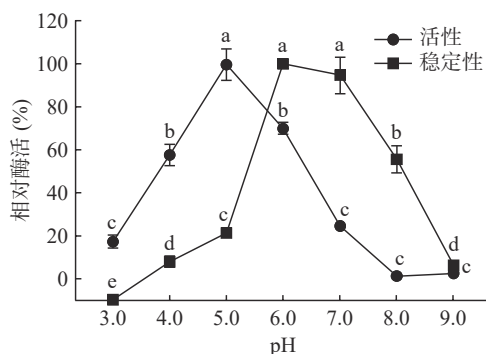


图 5 pH 对酶活性及稳定性的影响

Fig.5 Effects of pH on enzyme activity and stability

是过高的 pH 影响了酶与底物结合或直接影响了酶的催化活性^[26]。因此,酶的最适 pH 为 5.0。pH 稳定性结果表明,当 pH 为 6.0~7.0 孵育 2 h 时,相对酶活维持在 90% 以上,表现出较强的稳定性;但当 pH 为 3.0~6.0 和 7.0~9.0 时,相对酶活下降显著 ($P < 0.05$),酶的稳定性较差,可能是 pH 偏高或偏低会使酶本身变性失活,会改变及影响底物的解离或酶分子活性部位上相关基团的解离,进而影响酶的催化活性^[24]。

2.5.3 金属离子对酶活性的影响

金属离子可以与酶结合,从而影响酶蛋白的中心构象,进而对酶起到促进或抑制作用^[27]。本研究中,与未加金属离子相对酶活相比, Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶活性具有显著激活作用 ($P < 0.05$), 其中 Fe^{2+} 效果最明显(图 6), 相对酶活大于 173%。而 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 对酶活性具有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 其中 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 可使酶的活性几乎完全丧失。 K^{+} 和 Ca^{2+} 对壳聚糖酶活力无显著影响 ($P > 0.05$)。这与大多数微生物来源的壳聚糖酶一致^[13,21,28],但也有部分金属离子对不同来源的壳聚糖酶活力起着相反的作用^[20]。进一步表明不同来源的壳聚糖酶有一定的差异。今后利用该酶进行壳寡糖生产过程中需要考虑金属离子对酶活性的影响。金属离子对酶活的影响机制可能与金属离子和壳聚糖酶形成稳定的复合物有关,金属离子通过参与壳聚糖酶活性中心的构建,结合酶活性中心以外的部位,增大酶与底物之间的亲和力,使酶活力得到增强^[25],或金属离子通过螯合作用,影响酶的构象,干扰酶对底物的降解作用,从而导致酶活力下降^[29]。金属离子对该酶活的具体作用机制有待进一步深入研究。

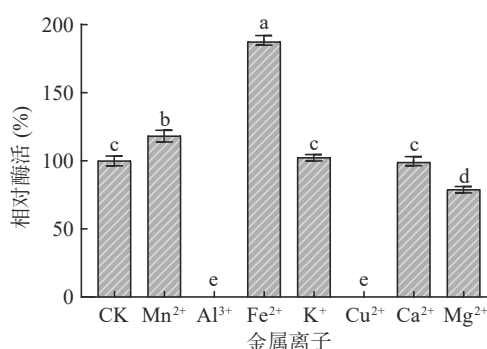


图 6 金属离子对酶活性的影响

Fig.6 Effects of metal ions on enzyme activity

2.5.4 菌株 Gxun-5.3.3 产壳聚糖酶底物特异性探究

壳聚糖酶活性中心关键氨基酸只与氨基葡萄糖的氨基形成氢键,因此,大多数壳聚糖酶对壳聚糖有着高度的专一性^[30]。底物特异性研究表明,菌株 Gxun-5.3.3 所产壳聚糖酶最适反应底物为胶体壳聚糖,其他天然高分子物质如羧甲基纤维素钠、可溶性淀粉、葡萄糖、粉末壳聚糖等为底物时相对酶活很低,这说明该酶对其他天然高分子物质酶解能力弱(图 7)。因此,菌株 Gxun-5.3.3 所产壳聚糖酶具有专一性水解可溶性壳聚糖的能力。

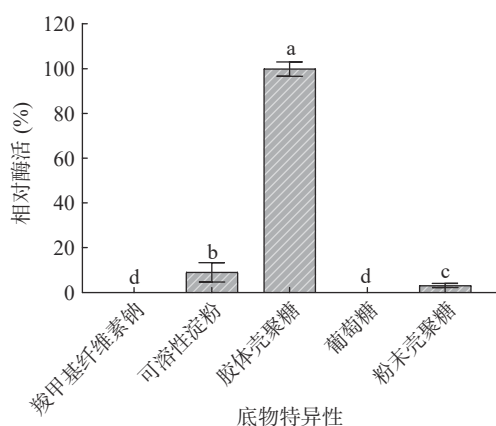


图 7 底物对酶活性的影响

Fig.7 Effects of substrate on enzyme activity

2.6 菌株 Gxun-5.3.3 产壳聚糖酶的酶解产物测定

壳聚糖酶有 2 种类型, 内切型壳聚糖酶是以内切方式催化水解部分乙酰化壳聚糖中的 β -(1,4)-氨基葡萄糖苷键生成低聚糖; 而外切型壳聚糖酶是从壳聚糖非还原端外切的方式水解 β -(1,4)-氨基葡萄糖苷, 产生壳聚糖单体 (GlcN)^[31]。通过 TLC 薄层层析对酶降解壳聚糖的产物分析结果表明(图 8), 随着时间的增加壳聚糖逐渐被水解为壳寡糖, 其中多数为壳二糖、壳三糖和壳四糖, 并在水解过程中未出现单糖, 这表明菌株 Gxun-5.3.3 产壳聚糖酶为内切型壳聚糖酶。这与来自芽孢杆菌属菌株所产壳聚糖酶为内切型酶结果一致^[20-21]。

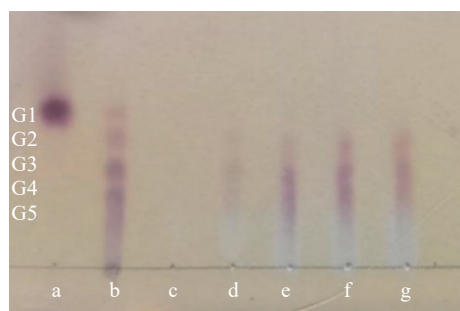


图 8 壳聚糖酶酶解产物薄层层析

Fig.8 Thin-layer chromatography of chitosanase digestion products

注: a. 盐酸氨基葡萄糖标样; b. 壳寡糖标样; c. 反应 0 min; d. 反应 5 min; e. 反应 10 min; f. 反应 15 min; g. 反应 20 min; G1. 单糖; G2. 二糖; G3. 三糖; G4. 四糖; G5. 五糖。

3 讨论

壳聚糖酶在工业生产壳寡糖上具有巨大的应用价值, 目前利用微生物产壳聚糖酶水解壳聚糖生产壳寡糖是较为环保、高效的方法。谷亚茹等^[32]研究的芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 产壳聚糖酶酶活为 11.5 U/mL。Huynh 等^[33]研究的伦茨氏菌属 (*Lentzea* sp.) OUR-I1 产壳聚糖酶酶活为 2.4 U/mL。张馨月等^[34]研究的淡紫紫孢菌 (*Purpureocillium lilacinum*) M7a 产壳聚糖酶酶活为 16.8 U/mL。本研究中, 筛选获得的 *B. cereus* Gxun-5.3.3 菌株, 酶活性高达

39.87±1.24 U/mL, 高于目前大多数文献报道菌株的酶活, 产酶优势强, 在工业生产壳寡糖上有较好的应用潜力。

当前利用微生物产壳聚糖酶依旧存在酶活低、稳定性差等问题。通过发酵工艺的优化提高菌株的产酶活性, 为工业化高效生产壳寡糖提供潜在可能。卢波斯等^[35]研究的松江菌属 (*Mitsuaria* sp.) SH-50, 优化前酶活为 5.0 U/mL, 通过 PB 试验及响应面优化产酶条件后, 酶活达 26.6 U/mL。Liaqat 等^[36]研究的莫哈韦芽孢杆菌 (*Bacillus mojavensis*) EGE-B-5.2i, 优化前酶活为 2.2 U/mL 通过 PB 试验及中心复合设计优化后, 酶活达 21.1 U/mL。本研究优化产酶条件后, 酶活达 62.03±1.18 U/mL, 较优化前 (39.87±1.24 U/mL) 提高了 55.58%, 优化后的酶活高于大多数文献报道, 为工业高效生产壳寡糖提供理论支持, 具有较好的应用价值。

目前报道壳聚糖酶反应的最适温度一般在 30~50 °C 之间, 李佳茵等^[37]研究的海洋真菌 MF-08 产壳聚糖酶最适反应温度为 40 °C。本研究中菌株 Gxun-5.3.3 产壳聚糖酶的最适反应温度 (60 °C) 更高, 具有更大的应用潜力, 且该酶在 30~50 °C 之间有较好的热稳定性, 这与 Wang 等^[38]报道的贝莱斯芽孢杆菌 (*B. cereus*) TKU031 产壳聚糖酶在低于 50 °C 时有良好的稳定性, 而高于 50 °C 时稳定性较差的研究结果类似。陈聪聪^[39]研究的松江菌属 (*Mitsuaria* sp.) C4 产壳聚糖酶最适 pH 为 7.2。而本研究中壳聚糖酶的最适 pH 为 5.0, pH 6.0~7.0 条件下稳定性较好, 这表明不同菌株所产壳聚糖酶最适 pH 也不同, 本研究壳聚糖酶更适于中性偏酸环境下与底物反应。此外, 不同金属离子与壳聚糖酶螯合后, 对酶活起到激活或抑制作用, 本研究中一定浓度的 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 对菌株产壳聚糖酶有激活作用, 而 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 有抑制作用。这与严寅琿等^[40]报道的 Mn^{2+} 对来源于中村氏芽孢杆菌 (*Bacillus nakamurai*) 的壳聚糖酶具有较高激活作用结果类似。因此, 今后将菌株应用于壳聚糖酶工业化生产过程中要考虑金属离子对酶活的影响。

目前, 文献报道来源于芽孢杆菌的壳聚糖酶多为内切型。Chiang 等^[41]报道的枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) IMR-NK1 产壳聚糖酶水解产物为壳二糖~壳四糖。Jiang 等^[42]报道的从巴伦氏类芽孢杆菌 (*Paenibacillus barengoltzii*) 克隆基因 PbCsn8 在枯草芽孢杆菌中表达后产壳聚糖酶水解产物为壳二糖、壳三糖。而本研究筛选的 *B. cereus* Gxun-5.3.3 所产壳聚糖酶也为内切型, 这与大多数文献报道壳聚糖酶类型类似。

4 结论

本研究从广西北海虾塘底泥中筛选出 1 株高产壳聚糖酶的菌株 *B. cereus* Gxun-5.3.3。通过单因素实验、Plackett-Burman 和正交优化试验得到菌株产

酶最优发酵工艺为:麦芽糖 5 g/L,酵母粉 3 g/L,壳聚糖 15 g/L,初始 pH6.0,发酵时间 84 h,优化后酶活可达 62.03 ± 1.18 U/mL,较优化前提高了 55.58%。酶学性质结果表明,菌株 Gxun-5.3.3 所产壳聚糖酶为内切酶,酶的最适温度为 60 °C,30~50 °C 时稳定性较好,最适 pH 为 5.0, pH6.0~7.0 稳定性较好,金属离子中 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 对壳聚糖酶有显著的激活作用,而 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 则有较强抑制作用。本研究为 *B. cereus* Gxun-5.3.3 壳聚糖酶的生产和壳寡糖的酶法制备提供了重要的理论依据。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] MA J H, FAQIR Y, TAN C J, et al. Terrestrial insects as a promising source of chitosan and recent developments in its application for various industries[J]. *Food Chemistry*, 2022, 373: 131407.
- [2] FU H Y, LIU H Z, GE Y F, et al. Chitosan oligosaccharide alleviates and removes the toxicological effects of organophosphorus pesticide chlorpyrifos residues[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 446: 130669.
- [3] JU C X, YUE W, YANG Z H, et al. Antidiabetic effect and mechanism of chitooligosaccharides[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 33(9): 1511–1516.
- [4] VO T S, KIM S K. Potential anti-HIV agents from marine resources: an overview[J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(12): 2871–2892.
- [5] WANG Y Y, ZHAO K, LI L, et al. A review of the immune activity of chitooligosaccharides[J]. *Food Science and Technology*, 2023, 43: e97822.
- [6] SINGH A, MITTAL A, BENJAKUL S. Chitosan, chitooligosaccharides and their polyphenol conjugates: preparation, bioactivities, functionalities and applications in food systems[J]. *Food Reviews International*, 2023, 39(4): 2297–2319.
- [7] ARANAZ I, ALCÁNTARA A R, CIVERA M C, et al. Chitosan: An overview of its properties and applications[J]. *Polymers*, 2021, 13(19): 3256.
- [8] BENJAKUL S, SINGH A, MITTAL A. Chitooligosaccharides: Preparation and applications in food and nutraceuticals[M]. Chitooligosaccharides: Prevention and Control of Diseases. Cham: Springer International Publishing, 2022: 203–221.
- [9] YUAN X B, ZHENG J P, JIAO S M, et al. A review on the preparation of chitosan oligosaccharides and application to human health, animal husbandry and agricultural production[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 220: 60–70.
- [10] 郭蔓,赵华,张朝正.壳寡糖的制备及应用研究[J].中国食品添加剂,2022,33(10):267–271. [GUO M, ZHAO H, ZHANG C Z. Preparation and application of chitosan oligosaccharides[J]. *China Food Additives*, 2022, 33(10): 267–271.]
- [11] 杨苏亮,闫冰雪,李海静,等.壳寡糖的理化特性及制备方法[J].饲料博览,2016,291(7):27–30. [YANG S L, YAN B X, LI H J, et al. The physiochemical properties and preparation methods of chitooligosaccharides[J]. *Feed Review*, 2016, 291(7): 27–30.]
- [12] MONAGHAN R L, EVELEIGH D E, TEWARI R P, et al. Chitosanase, a novel enzyme[J]. *Nature New Biology*, 1973, 245 (142): 78–80.
- [13] AKTUGANOV G E, SAFINA V R, GALIMZIANOVA N F, et al. Constitutive chitosanase from *Bacillus thuringiensis* B-387 and its potential for preparation of antimicrobial chitooligomers[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 38(10): 167–192.
- [14] WANG Y X, LI D, LIU M X, et al. Preparation of active chitooligosaccharides with a novel chitosanase Aq CoA and their application in fungal disease protection[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(11): 3351–3361.
- [15] 陈小娥.曲霉产壳聚糖酶酶学性质及作用机理研究[D].无锡:江南大学,2005. [CHEN X E. Study on the characterization and mechanism of chitosanases from *Aspergillus* sp. [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2005.]
- [16] ZHU X F, WU X Y, DAI Y. Fermentation conditions and properties of a chitosanase from *Acinetobacter* sp. C-17[J]. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014, 67: (2),284–290.
- [17] 刘阳,赵华,郑雅元,等.产壳聚糖酶菌株的筛选、鉴定及发酵条件优化[J].中国食品添加剂,2017(2):106–111. [LIU Y, ZHAO H, ZHENG Y Y, et al. Screening and identification of a chitosanase-producing strain and optimization of its fermentation conditions[J]. *China Food Additives*, 2017(2): 106–111.]
- [18] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001. [DONG X Z, CAI M Y. Manual for the identification of common bacterial systems [M]. Beijing: Science Press, 2001.]
- [19] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯.伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1995. [BUCHANAN R E, GIBBONS N E. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. Beijing: Science Press, 1995.]
- [20] 刘进杰,吕娟娟,陈国忠,等.莫海威芽孢杆菌产壳聚糖酶的分离纯化及酶学性质分析[J].江苏农业科学,2019,47(14):231–235. [LIU J J, LÜ J J, CHEN G Z, et al. Isolation, purification and enzymatic properties of chitosanase produced by *Bacillus mohaweis* [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(14): 231–235.]
- [21] 李甜.产耐酸性壳聚糖酶芽孢杆菌属 CLT07 菌株的筛选、鉴定及酶学性质研究[D].连云港:江苏海洋大学,2022. [LI T. Screening, identification and enzymatic properties of *Bacillus* sp. CLT07 producing acid resistant chitosan enzyme [D]. Lianyungang: Jiangsu Ocean University, 2022.]
- [22] 尹雅洁,谭光迅,胡远亮. *Mitsraria* sp. 1412 产壳聚糖酶的分离纯化及性质研究[J].湖北师范大学学报(自然科学版),2019,39(1):70–75. [YIN Y J, TAN G X, HU Y L. Isolation, purification and characterization of chitosanase produced by *Mitsraria* sp. 1412 [J]. *Journal of Hubei University(Natural Science)*, 2019, 39 (1): 70–75.]
- [23] 袁建平,侯晓强.壳聚糖酶的分离纯化及性质研究[J].湖北农业科学,2013,52(15):3647–3649. [YUAN J P, HOU X Q. Study on Purification and Properties of Chitosanase [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2013, 52(15): 3647–3649.]
- [24] YANG G S, SUN H H, CAO R, et al. Characterization of a novel glycoside hydrolase family 46 chitosanase, Csn-BAC, from *Bacillus* sp. MD-5[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 518–523.
- [25] CAO S N, GAO P, XIA W S, et al. A novel chitosanase from *Penicillium oxalicum* M2 for chitooligosaccharide production: Purification, identification and characterization[J]. *Molecular Biotechnology*, 2022, 64(9): 947–957.
- [26] LIU Y, LI Y L, TONG S, et al. Expression of a *Beauveria bassiana* chitosanase (BbCSN-1) in *Pichia pastoris* and enzymatic

- analysis of the recombinant protein[J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 166: 105519.
- [27] ZHOU L, LIU W, TEREFE N S. The inactivation kinetics of soluble and membrane-bound polyphenol oxidase in pear during thermal and high-pressure processing[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2018, 11(5): 1039–1049.
- [28] CAHYANINGTYAS H A A, SUYOTHA W, SUYOTHA, et al. Statistical optimization of halophilic chitosanase and protease production by *Bacillus cereus* HMRSC30 isolated from Terasi simultaneous with chitin extraction from shrimp shell waste[J]. *Bio-catalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021, 31: 101918.
- [29] DALTON T D, THOMAS A C, ANNA M S, et al. Design, heterologous expression, and application of an immobilized protein kinase[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2023, 34(1): 204–211.
- [30] 季更生, 陈爱春. 微生物产壳聚糖酶的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 297–301. [JI G S, CHEN A C. Research progress of chitosanase from microorganisms[J]. *Food Science*, 2010, 31(3): 297–301.]
- [31] 李振梅, 侯庆爱, 牛其东, 等. 壳聚糖酶的分子结构与作用机制的研究进展[J]. 齐鲁工业大学学报, 2021, 35(2): 34–40. [LI Z M, HOU Q A, NIU Q D, et al. Advances in studies on molecular structure and mechanism of chitosanase[J]. *Journal of Qilu University of Technology*, 2021, 35(2): 34–40.]
- [32] 谷亚茹, 郝雅莽, 张硕, 等. 一种产壳聚糖酶野生菌株的筛选及产酶工艺优化[J]. 食品科技, 2021, 46(9): 14–21. [GU Y R, HAO Y Q, ZHANG S, et al. Screening of a wild strain with chitosanase-producing ability and optimization of its production conditions[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(9): 14–21.]
- [33] HUYNH N T, SUYOTHA W, SHIGEKAZU Y, et al. Low-cost production of chitosanolytic enzymes from *Lentzea* sp. strain OUR-II for the production of antimicrobial substances against food-borne pathogens[J]. *International Food Research Journal*, 2019, 26(4): 1293–1304.
- [34] 张馨月, 岳晓洁, 李铮峥, 等. 淡紫紫孢菌的筛选、鉴定及产壳聚糖酶固体发酵条件优化[J]. 中国食品学报, 2020, 20(4): 160–169. [ZHANG X Y, YUE X J, LI Z Z, et al. Isolation and identification of *Purpureocillium lilacinum* and optimization of its solid fermentation conditions for producing chitosanase[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(4): 160–169.]
- [35] 卢波斯, 崔丹丹, 李志明, 等. 高效产壳聚糖酶海洋菌株 *Mitsuaria* sp. SH-50 的筛选、鉴定及产酶条件优化[J]. 中国调味品, 2022, 47(7): 1–9. [LU B S, CUI D D, LI Z M, et al. Screening, identification and optimization of enzyme production conditions of the chitosanase-producing marine strain *Mitsuaria* sp. SH-50 with high efficiency[J]. *China Condiment*, 2022, 47(7): 1–9.]
- [36] LIAQAT F, SÖZER BAHADIR P, et al. Optimization of chitosanase production by *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2018, 58(10): 836–847.
- [37] 李佳茵, 王慧敏, 祖国仁. 海洋真菌 MF-08 产壳聚糖酶诱导条件及酶学性质分析[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(7): 1778–1781. [LI J Y, WANG H M, ZU G R. Isolation, identification and enzyme characteristics of the chitosanase producing marine fungal MF-08[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55(7): 1778–1781.]
- [38] WANG C L, SU J W, LIANG T W, et al. Production, purification and characterisation of a chitosanase from *Bacillus cereus*[J]. *Research on Chemical Intermediates*, 2014, 40(6): 2237–2248.
- [39] 陈聪聪. 产壳聚糖酶 *Mitsuaria* sp. C4 菌株的研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2018. [CHEN C C. To produce chitosan enzyme *Mitsuaria* sp. C4 strain of research[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2018.]
- [40] 严寅晖, 鲁晶娣, 黄锦翔, 等. 中村芽胞杆菌壳聚糖酶在大肠杆菌中重组表达及酶学性质[J]. 中国食品学报, 2022, 22(9): 74–81. [YAN Y H, LU J D, HUANG J X, et al. Recombinant expression and enzymatic characterization of *Bacillus nakamurai* chitosanase in *E. coli*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(9): 74–81.]
- [41] CHIANG C L, CHANG C T, SUNG H Y. Purification and properties of chitosanase from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(2): 260–267.
- [42] JIANG Z Q, MA S, GUAN L Y, et al. Biochemical characterization of a novel bifunctional chitosanase from *Paenibacillus barengoltzii* for chitooligosaccharide production[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(5): 83–95.