

Chitinibacter sp. GC72 的筛选鉴定及其几丁质降解产物研究

高 聪¹, 张阿磊², 陈可泉², 郝之奎³, 童军茂^{*1}

(1. 石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832003; 2. 南京工业大学 生物与制药工程学院, 江苏 南京 211800; 3. 台州职业技术学院 应用生物技术研究, 浙江 台州 318000)

摘要: 为向几丁质酶资源的开发利用提供研究基础, 作者筛选获得了一株具有高产几丁质酶活性的细菌。经形态、生理生化及分子生物学研究手段鉴定表明该菌属奈瑟菌科, *Chitinibacter* 属, 命名为 *Chitinibacter* sp. GC72。经 1 L 发酵体系检测, 其粗酶液酶活可达 2 835 U/g。利用薄层层析法、液相色谱法和质谱法对其酶解几丁质产物进行了分析鉴定, 结果表明产物主要为 N-乙酰-D-氨基葡萄糖。最后利用该酶进行了多次酶解实验, 证实投入 3.44 U 酶量经 27 h 转化可降解 200 mg 几丁质至 159 mg N-乙酰-D-氨基葡萄糖, 收率为 79.6%。

关键词: *Chitinibacter* sp. GC72; 菌种鉴定; 几丁质酶; 降解产物; N-乙酰-D-氨基葡萄糖
中图分类号: Q 55 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)01—0015—06

Isolation and Characterization of a Chitin-Degrading Strain *Chitinibacter* sp. GC72 and Identification of its Chitinase Degradation

GAO Cong¹, ZHANG Alei², CHEN Kequan², HAO Zhikui³, TONG Junmao^{*1}

(1. Food College, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 211800, China; 3. Institute of Applied Biotechnology, Taizhou Vocational and Technical College, Taizhou 318000, China)

Abstract: A novel chitin-degrading aerobe, *Chitinibacter* sp. GC72, was isolated from a soil sample from Nanjing, and was proved to have high chitinolytic activity. The enzyme activity could reach to 2 835 U/g at 72 h of culture time, and one liter fermentation liquid contained 910 U chitinase. Its chitinase hydrolyzate, further investigated by TLC, UHPLC, Q-TOF-MS, was confirmed as GlcNAc. In the experiments of chitin hydrolyzation, the GlcNAc yield was 79.6% by using 3.44 U chitinase to hydrolyze chitin (200 mg) in 27 h.

Keywords: *Chitinibacter* sp. GC72, strain identification, chitinase, degradation product, GlcNAc

几丁质, 又名甲壳素, 主要存在于甲壳纲动物 外壳、昆虫外壳、真菌细胞壁中^[1], 是自然界中含量

收稿日期: 2014-06-09

基金项目: 国家 863 计划项目(2014AA021703)。

* 通信作者: 童军茂(1963—), 男, 新疆石河子人, 教授, 主要从事农产品加工及果蔬保鲜研究。E-mail: tjm9988@163.com

仅次于纤维素的第二大天然高分子化合物,由单体 N-乙酰-D-氨基葡萄糖(GlcNAc)通过 β -1,4-糖苷键连接而成^[2-3]。几丁质经降解后可以生成多种产物,主要包括壳聚糖、几丁寡糖、GlcNAc、氨基葡萄糖(GlcN)等。这些产物目前在食品^[4]、医药^[5]、农业^[6]等领域应用广泛。截至 2011 年,作为营养补充剂的氨基葡萄糖及其衍生物产品的全球销售额已逾 20 亿美元^[7],预计到 2017 年,全球氨基葡萄糖产量可达 46 600 t^[8]。

据中国医药信息网报道,我国 85% 的商用氨基葡萄糖产品是通过化学法降解海洋甲壳动物外壳制备的。但是化学法存在生产成本低、得率低、环境不友好等亟需改进的问题^[9]。目前研究的热点是生物酶法降解几丁质,它具有生产条件温和、环境友好、产物活性高的优点,有望替代化学法生产氨基葡萄糖产品。但是目前的研究也存在酶解效率不高、降解产物不纯的瓶颈,如 *Aeromonas hydrophila* H2330 所产的粗酶降解几丁质 10 d 所获得的 GlcNAc 收率为 77%,*Bacillus licheniformis* SK-1 分泌的粗酶降解几丁质获得的 GlcNAc 收率仅为 41%,而且产物混杂几丁二糖^[10-11]。筛选到一株酶解效率高、降解产物纯度高的菌株将会在未来几丁质高值化利用方面拥有巨大的前景。

作者对筛选获得的菌株进行了形态观察、生理生化实验及基于 16S rDNA 序列的系统发育分析,对菌株进行了分类鉴定。最后利用薄层层析法、色谱法和质谱法对该菌所产几丁质酶降解几丁质的产物进行了定性及定量研究,为今后对其几丁质酶的开发利用提供了理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 菌种

菌种来源于南京浦口区一废弃池塘(32°08'N, 118°64'E),现保藏于中国典型培养物保藏中心(保藏号:CCTCC M 2014113)。

1.2 试剂及仪器

胶体几丁质按 Sun Chul Kang^[12] 的方法制备;DNS 试剂参照国家轻工业部标准方法配置;粉粒几丁质、氨基葡萄糖盐酸盐、N-乙酰-D-氨基葡萄糖:Aladdin 公司产品;TaKaRa 试剂盒:大连宝生物工程公司产品;DNA Marker:北京 TransGen Biotech 公司产品;其他试剂购于国药集团。

Biolog 细菌自动鉴定仪:广州市华粤行仪器有限公司产品;Agilent 1290 UHPLC 超高效液相色谱、Agilent Q-TOF G6520 LC/MS 液质联用仪:美国 Agilent 公司产品。

1.3 培养基

筛选培养基(g/L):粉粒几丁质 0.5;硫酸镁 0.5,磷酸二氢钾 0.7,磷酸氢二钾 0.3,琼脂粉 20,pH 7.0~7.2,121 °C 灭菌 20 min。

种子培养基(g/L):葡萄糖 4;蛋白胨 4;酵母膏 4;硫酸镁 0.5;磷酸氢二钾 0.7;磷酸氢二钾 0.3;pH 7.0~7.2,121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 2;粉粒几丁质 3;蛋白胨 4;硫酸镁 0.5;磷酸氢二钾 0.7;磷酸氢二钾 0.3;pH 7.2~7.4,121 °C 灭菌 20 min。

1.4 几丁质酶活测定方法

将 1.4 mL 50 mmol/L PB 缓冲液(pH 7.0)和 0.5 mL 0.5 g/dL 的胶体几丁质加 100 μ L 酶液组成的反应体系置于 37 °C 水浴 30 min,沸水浴 5 min 中止反应,冷却至室温后加入 2 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min,离心后取上清,在波长 540 nm 下测吸光度,以灭活的等量酶液作空白对照。

酶活定义为 37 °C 下 1 min 转化底物胶体几丁质产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量规定为 1 个活力单位 U^[13]。

1.5 菌株筛选方法

1.5.1 富集培养 取 50 mL 肉汤培养基装于 500 mL 三角瓶中,灭菌后接入待筛样品,37 °C、200 r/min 条件下摇瓶培养 24 h,得到富集的菌液。

1.5.2 平板透明圈筛选 用无菌单层滤纸将富集培养液过滤,梯度稀释至适当浓度,吸取约 0.2 mL 稀释液涂布于筛选培养基平板,37 °C 培养 5 d,观察、挑取产透明圈菌株。将筛选获得的菌株点样于筛选培养基平板上复筛,37 °C 培养 5 d,以菌体生长速度和透明圈大小为标准,择优菌株做斜面保藏。

1.5.3 摇瓶复筛 50 mL 摇瓶筛选培养基装于 500 mL 三角瓶中,每瓶接入 1 环复筛菌株斜面菌种,37 °C、200 r/min 振荡培养 3 d,发酵液离心得粗酶液,测定酶活力,最终保留产酶活力最高的菌株。

1.6 菌株的鉴定

1.6.1 形态和培养特征 参照伯杰氏细菌鉴定手册对菌株进行形态和培养特征观察。

1.6.2 生理生化特征 采用 Biolog 细菌自动鉴定

仪检测该菌对碳源的利用嗜好和对化学物质的敏感程度。并根据最终获得的表型指纹同 Biolog 数据库中的数据进行比较,以判断微生物的种属。

1.6.3 菌株总 DNA 的提取及 16S rDNA 的扩增
细菌总 DNA 提取方法严格按照 TaKaRa 试剂盒提供的操作进行。PCR 的上、下游引物分别为 27F, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R, 5'-GGTTCCTTGTACGACTT-3'。热循环参数为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物由苏州 GENEWIZ 生物科技有限公司测序。

1.7 粗酶液的制备

对该菌进行了 1 L 发酵实验, 产酶结束后离心获得上清酶液。采用梯度缓慢流加饱和硫酸铵溶液的方法去除杂蛋白并获得目标蛋白, 利用浓度为 20 mmol/L 的 PB 缓冲液 (pH 7.0) 充分透析以去除盐离子, 所有操作均在 4 °C 条件下进行。

1.8 酶解产物的制备

以 100 目筛粉粒几丁质作为转化底物, 并加入 pH 7.0 的 PB 缓冲液稳定体系 pH 值, 经 121 °C, 20 min 灭菌后冷却至室温备用。加入适量的无菌过膜 (0.22 μ m) 酶液进行搅拌转化, 酶解温度恒定为 36 $\pm$ 1 °C, 转化结束后离心获得上清液过膜 (0.22 μ m) 后置于 4 °C 条件下贮藏。

1.9 酶解产物的鉴定

1.9.1 TLC 法 TLC 法选用 v (异丙醇): v (水): v (氨水)=70:30:1 作为展层剂, 点样量 10 μ L。点板结束后晾干, 将苯胺-二苯胺磷酸显色剂均匀喷雾在薄层板上, 并置 85 °C 烘箱内加热至层析斑点显现。以常见还原性糖标样为参照, 通过层析斑点位置定性确定酶解产物。

1.9.2 液相检测条件 液相分析在 Agilent 1290 Infinity UHPLC 上进行, 色谱柱为 Alltima HP HILIC 柱 (4.6 $\times$ 250 mm), 流动相为体积分数 85% 乙腈; 流速为 0.8 mL/min, 紫外检测器检测波长 210 nm, 进样量 10 μ L, 柱温 40 °C。

1.9.3 质谱检测条件 质谱分析在 Agilent Q-TOF G6520 LC/MS 系统上进行。使用高纯氮气做雾化器和辅助气, 氩气做碰撞气, 离子源参数为: ESI 毛细管电压 +4.0 kV; 离子源温度 120 °C; 雾化器温度 350 °C; 脱溶剂气流速 600 L/h; 锥孔气流速 50 L/h。TOF 参数为: Fragmentor: 135 V; Skimmer: 65 V; OCT

1RF Vpp: 750 V。质量扫描范围均为 100~1 000。

2 结果与分析

2.1 产几丁质酶细菌的筛选

从安徽阜阳市、江苏南京市两地获得的土壤、腐烂虾壳共 27 份样品中分离出 6 株具有几丁质降解能力的细菌。筛选结果如表 1 所示, 根据透明圈与菌落的比值及摇瓶复筛测定的酶活结果, 选留菌株 GC-72 作为下一步研究菌株。

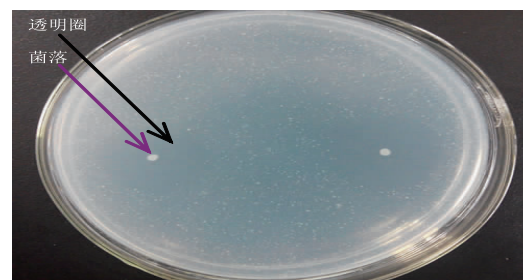
表 1 菌株筛选结果

Table 1 Results of strain screening

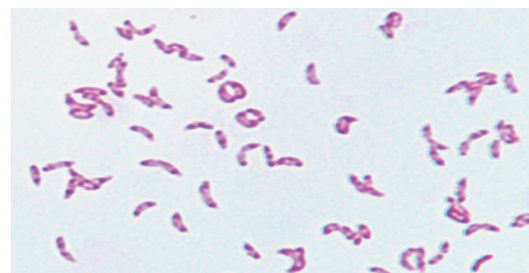
序号	透明圈直径 D/cm	菌落直径 d/cm	D/d	酶活/(U/mL)
GC-11	1.2	0.20	6.00	0.33
GC-23	0.8	0.20	4.00	0.17
GC-26	0.5	0.10	5.00	0.20
GC-49	0.4	0.15	2.67	0.08
GC-72	3.7	0.30	12.33	0.57
GC-93	0.4	0.10	4.00	0.26

2.2 菌落形态特征

菌株在筛选培养基 37 °C 下培养 72 h 后, 能形成 2~3 mm 单菌落。菌落呈圆形 (图 1), 乳白色, 边缘整齐, 表面光滑湿润, 易挑起。光学显微镜观察该菌为革兰氏阴性菌, 经生物显微镜测定该菌大小约为 1.9 μ m $\times$ 0.8 μ m, 呈弯曲梭杆状。



(a)



(b)

图 1 平板透明圈和菌体显微照片

Fig. 1 Clear zone in colloidal chitin agar (a) and photomicrographs of the strain (b)

2.3 菌株的生理生化特征

该菌严格好氧,适应生长温度 20~37 °C,适宜生长 pH 值范围为 7~10。Gen III 微孔板对该菌进行碳源的利用程度试验阳性结果如下表 2。可见该菌对 N-乙酰-D-氨基葡萄糖、葡萄糖醛酰胺、果糖利用好,对糊精、葡萄糖、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、D-果糖-6-磷酸等碳源利用较佳,对其余的碳源利用不佳。化学物质敏感性试验结果表明该菌微弱耐受利福霉素 SV,对高盐环境和低 pH 值、丝氨酸等不耐受。

表 2 碳源利用试验(24 h)

Table 2 Utilization of carbon sources(24 h)

特征	结果	特征	结果
N-乙酰-D-葡萄糖胺	+	α -D-葡萄糖	W
糊精	W	D-葡萄糖酸	W
葡萄糖醛酰胺	+	D-葡萄糖醛酸	W
D-果糖-6-磷酸	W	D-果糖	+

注: + 为阳性; W 为弱阳性。

根据该菌对碳源的利用嗜好性和对化学物质的敏感程度结果, Biolog 细菌自动鉴定仪的鉴定结果为 *Pedobacter heparinus* 菌, SIM 值为 0.251, 经查阅资料该菌为厌氧菌, 与供试菌不符, 可信度较低。可能的原因是该菌目前不在实验室 Biolog 细菌自动鉴定仪数据库内。因此有必要采用分子生物学研究手段继续对该菌进行研究。

2.4 16S rDNA 的扩增及序列分析

采用 TAE 电泳缓冲液, 泳道 1、2 内加入 5 μ L PCR 产物, 泳道 M 内加入 Trans 2KPlus DNA Marker, 在 0.8 g/dL 琼脂糖凝胶上进行电泳。电压稳定在 100 V, 电泳时间约 40 min。电泳结束后在紫外灯下观察, 结果如下图 2 所示, 可见在 1 500 bp 位置处泳道 1、2 内有一明显的条带。

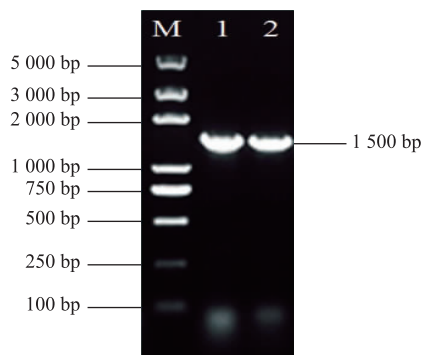


图 2 16S rDNA PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose electrophoresis of 16S rDNA PCR product

2.5 构建同源树

将该菌的 16S rDNA 测序结果与 GeneBank 中的序列进行比较, 发现该菌与其同源性最高的模式菌株均属于 *Chitinibacter* 菌属。向 NCBI 提交该基因组序列, 申请的登录号为: KJ676516。根据 Blast 结果, 选择有代表性的菌株序列, 用软件 Clustalx 1.83 进行序列比对, 使用软件 Mega 3.1 利用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树, 见下图 3。

根据 16S rDNA 基因序列可以得知该菌属变形菌纲 (*Proteobacteria*)、奈瑟菌目 (*Neisseriales*)、奈瑟菌科 (*Neisseriaceae*)、*Chitinibacter* 属, 命名为 *Chitinibacter* sp. GC72。与 Sung K K^[14] 发现的 *Chitinibacter suncheonensis* sp. SK16 菌序列在 NCBI 有 99% 的相似度, 是否为同一菌种尚需进一步鉴定。

2.6 酶解产物分析

2.6.1 TLC 法 薄层层析法能在合适的展开条件下分离不同的还原性糖。如下图 4(a) 所示 GlcNAc ($R_f=0.593$)、GlcN ($R_f=0.421$) 及发酵液中可能存在的还原性葡萄糖 (Glc, $R_f=0.546$)、果糖 (Fru, $R_f=0.531$) 均可通过比移值和颜色的不同区分开来。*Chitinibacter* sp. GC72 几丁质酶降解几丁质产物的薄层层析结果如图 4(b) 所示, 薄层层析结果只有一个点, 可定性判断为 GlcNAc, 无其他还原性糖。

2.6.2 液相色谱检测 高效液相色谱能有效鉴定降解产物, 并且定量测定出转化率, 是目前检测还原性糖最常用的定量方法。液相结果图 5 显示, GlcNAc 标准品和酶解产物的保留时间均为 6.483 min, 峰的对称性良好, 无杂峰, 可以说明该菌降解粉粒几丁质的产物为 GlcNAc。经多次酶解实验研究, 证实利用 3.44 U 酶液在 (36 $\pm$ 1) °C 温度下, 无菌转化 27 h 反应可水解 200 mg 几丁质至 159.2 mg GlcNAc, 收率达 79.6%。具体数据见下表 3。实验结果表明该菌发酵所产几丁质酶能快速降解几丁质, 转化条件温和, 环境友好, 且获得的产物较为单一的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖, 具有良好的工业应用价值。

2.6.3 质谱检测 在液相实验结果基础上, 截取产物出峰时间段的流出液进行质谱分析。结果显示, 相对分子质量为 244.08 (GlcNAc + Na)、260.05 (GlcNAc + K)、465.17 ((GlcNAc)₂ + Na) 的峰均为 N-乙酰-D-氨基葡萄糖, 无几丁二糖 ($M_w=424.4$) 可以判断该菌所产几丁质酶降解几丁质的产物均为 N-乙酰-D-氨基葡萄糖, 产物单一。

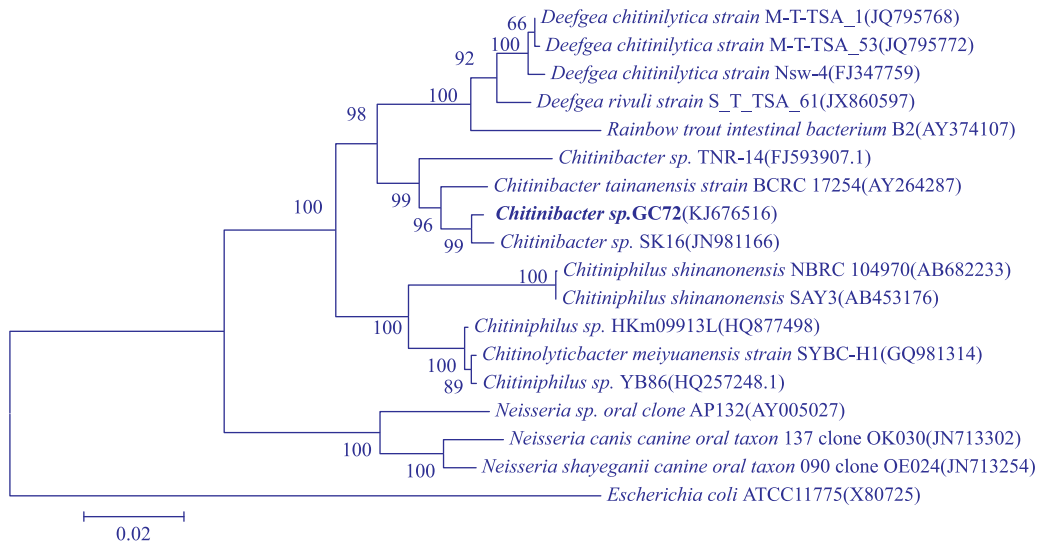
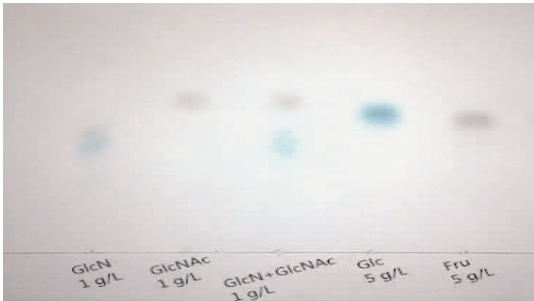
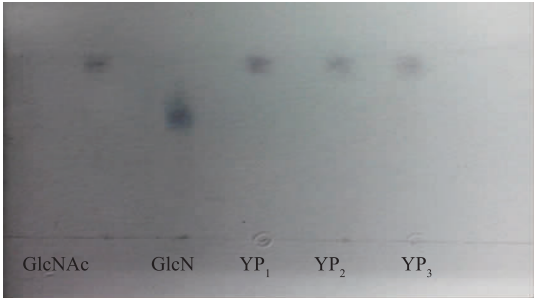


图 3 基于 16S rDNA 基因序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree resulting from analysis of the 16Sr DNA gene sequences



(a) 常见还原性糖标样



(b) 酶解产物

图 4 TLC 检测结果

Fig. 4 Results of TLC

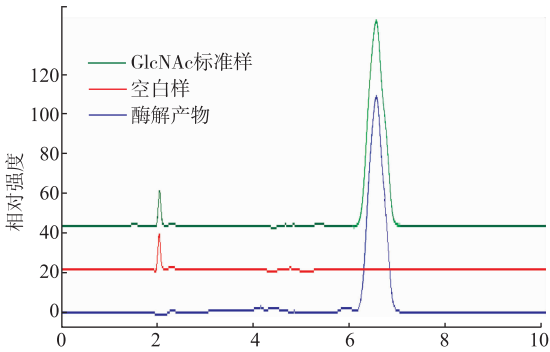


图 5 UHPLC 检测结果

Fig. 5 Results of UHPLC

表 3 酶解反应实验

Table 3 Experiment of enzymatic hydrolysate

酶解反应	酶量/U	粉粒几丁质/mg	酶解时间/h	GlcNAc/mg	收率/%
1	0.9	20	12	13.1	65.5
2	0.9	40	12	16.7	41.8
3	3.44	200	27	159.2	79.6
4	3.44	300	27	108.8	36.3

3 结 语

利用细菌形态学、理化性状、分子生物学手段综合分析才能准确的对未知菌株进行种属划分。菌株 *Chitinibacter* sp. GC72 与 *Chitinibacter suncheonensis* sp. SK16 和 *Chitinibacter tainanensis* strain BCRC 17254 在同源树上距离较近,但是菌株具体的性质却有所不同。*Chitinibacter*

suncheonensis sp. SK16 菌株的发酵参数及酶学性质研究尚未报道,*Chitinibacter tainanensis* strain BCRC 17254 菌上存在的几丁质降解因子“CDF”^[15]在 *Chitinibacter* sp. GC72 菌的发酵过程中没有发现。

从降解产物为 N-乙酰-D-氨基葡萄糖的结果可以推断出,*Chitinibacter* sp. GC72 所产几丁质酶应为复合酶系, β -N-乙酰氨基己糖苷酶活较高,但是其具体的酶学性质仍需要下一步研究^[16]。

实验证实利用 *Chitinibacter* sp. GC72 发酵产酶降解几丁质可获得纯度非常高的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖,且转化条件温和,降解效率高,具有巨大的工业生产潜力。但是由于几丁质的降解产物为 N-乙酰-D-氨基葡萄糖,且转化体系的 pH 和温度非

常适宜菌体的生长,故在转化过程中的无菌操作是必须的。此外,根据酶解实验结果可以推断该酶具有底物抑制现象,是否具有产物抑制现象尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Wang S, Moyné A, Thottappilly G, et al. Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase [J]. **Enzyme Microb Technol**, 2001, 28(6):492-498.
- [2] Nilambari S P, Shailesh R W, Jyoti P J, et al. Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation [J]. **Process Biochemistry**, 2013, 48 (1):176-183.
- [3] Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications[J]. **Progress in Polymer Science**, 2006, 31(7):603-632.
- [4] Chang Y F, Sitanggang A B, Wu H S. Optimizing biotechnological production of glucosamine as food ingredient from *Aspergillus* sp. BCRC 31742[J]. **Journal of Food Technology**, 2011, 9(2):75-82.
- [5] Azuma K, Osaki Y, Wakuda T, et al. Suppressive effects of N-acetyl-D-glucosamine on rheumatoid arthritis mouse models[J]. **Inflammation**, 2012, 35(4):1462-1465.
- [6] Shi S Y, Wang W, Liu L Q, et al. Effect of chitosan/nano-silica coating on the physicochemical characteristics of longan fruit under ambient temperature[J]. **Journal of Food Engineering**, 2013, 118(1):125-131.
- [7] Ranganath M. Glucosamine and osteoarthritis: time to quit?[J]. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, 2011, 27(3):233-234.
- [8] Jose S (2011) Global glucosamine market to reach 46.6 thousand metric tons by 2017, according to a new report by Global Industry Analysts, Inc. http://www.prweb.com/releases/glucosamine/glucosamine_supplements/prweb8561248.htm
- [9] Sashiwa H, Fujishimam S, Yamano N, et al. Production of N-acetyl-D-glucosamine from beta-chitin by enzymatic hydrolysis[J]. **Chem Lett**, 2001, 31(4):308-309.
- [10] Sashiwa H, Fujishimam S, Yamano N, et al. Production of N-acetyl-D-glucosamine from alpha-chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330[J]. **Carbohydr Res**, 2002, 337(8):761-763.
- [11] Pichyangkura R, Kudan S, Kuttiyawong K, et al. Quantitative production of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose from crystalline chitin by bacterial chitinase[J]. **Carbohydr Res**, 2002, 337(6):557-559.
- [12] Kang S C, Park S, Lee D G. Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae*[J]. **Journal of Invertebrate Pathology**, 1999, 73(3):276-281.
- [13] Hao Z K, Cai Y J, Liao X R, et al. *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1 (T), gen. nov., sp. nov., a chitin-degrading bacterium isolated from Soil[J]. **Curr Microbiol**, 2011, 62(6):1732-1738.
- [14] Kim S K, Kim Y H, Jeong Y S, et al. *Chitinibacter suncheonensis* sp. nov., a Chitinolytic bacterium from a mud flat in suncheon bay[J]. **Journal of Microbiology**, 2012, 50(6):1058-1062.
- [15] Chen J K, Shen C R, Yeh C H, et al. N-Acetyl Glucosamine obtained from chitin by chitin degrading factors in *Chitinibacter tainanensis*[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2011, 12(2):1187-1195.
- [16] Liu L, Liu Y F, Shin H D, et al. Microbial production of glucosamine and N-acetylglucosamine: advances and perspectives[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2013, 97(14):6149-6158.