

DOI:10.14188/j.ajsh.2020.05.003

微生物几丁质酶的研究进展、应用及展望

刘力睿^{1,2}, 潘杰¹, 李猛^{1*}

(1. 深圳大学 高等研究院 深圳市海洋微生物组工程重点实验室, 广东 深圳 518060;
2. 深圳大学 物理与光电工程学院 光电子器件与系统重点实验室, 广东 深圳 518060)

摘要: 几丁质普遍存在于地球的陆地和水生生态系统中,是地球上产量最丰富的有机大分子多聚物之一。几丁质酶在自然界中分布广泛,不仅有重要的生态意义,而且在生物技术方面应用广阔。介绍了几丁质的降解过程和几丁质酶的分类,着重阐明了几丁质酶在细菌、真菌、古菌中的分布,总结了近年来微生物几丁质酶的研究进展及其在环境废弃物管理、农业和医药等关键领域的应用,最后基于粤港澳大湾区丰富的海洋几丁质资源,对微生物几丁质酶在新兴海洋生物技术产业中的发展和贡献进行了展望。

关键词: 几丁质酶;微生物;研究进展;生物技术应用
中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-3491(2020)05-0494-11

Recent research progress, application and future perspectives on microbial chitinases

LIU Lirui^{1,2}, PAN Jie¹, LI Meng^{1*}

(1. Shenzhen Key Laboratory of Marine Microbiome Engineering, Institute for Advanced Study, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2. Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: Chitin is one of the most abundant organic macromolecules on Earth, which is found in terrestrial and aquatic ecosystems. Chitinases are widely distributed in nature, and have ecologically and biotechnologically important functions. This review introduces the degradation process of chitin, the classification of chitinases, and the distribution of chitinases in Bacteria, Fungi and Archaea. We summarize recent research progress on microbial chitinases and their biotechnological applications in environmental waste management, agricultural and medical industries. Also, we provide future perspectives on the development and contribution of microbial chitinases in emerging marine biotechnology industries, based on the abundant marine resources in Guangdong-Hong Kong-Macao Greater Bay Area.

Key words: chitinase; microorganism; research progress; biotechnological application

0 引言

几丁质又称甲壳素、壳多糖,由 β -(1,4)-糖苷键将N-乙酰糖胺(GlcNAc)分子连接而成,广泛分布于水生和陆地生态系统中^[1]。几丁质存在三种结晶

形态,即 α -几丁质、 β -几丁质和 γ -几丁质,它们的区别在于晶胞内分子链的排列方式不同。在 α -几丁质中,分子链以反向平行方式排列;在 β -几丁质中,分子链以正交方式排列;在 γ -几丁质中,分子链是以蜂巢式排列形成几丁质纤维。自然界中, α -几丁质是

收稿日期: 2020-05-20 修回日期: 2020-08-24 接受日期: 2020-09-29
作者简介: 刘力睿(1989-),女,博士,研究方向为微生物大分子降解。E-mail: lirui.liu@szu.edu.cn
* 通讯联系人: 李猛(1980-),男,博士,教授,研究方向为环境微生物学。E-mail: limeng848@szu.edu.cn
基金项目: 国家自然科学基金(91851105;31970105;31622002)

引用格式:刘力睿,潘杰,李猛. 微生物几丁质酶的研究进展、应用及展望[J]. 生物资源, 2020, 42(5): 494-504.
Liu L R, Pan J, Li M. Recent research progress, application and future perspectives on microbial chitinases [J]. Biotic Resources, 2020, 42(5): 494-504.

最普遍的存在形式^[2]。

在真菌中,几丁质是细胞基本结构的重要组成,它位于真菌细胞壁的内层,占真菌干重的比例可高达45%。同时,几丁质还广泛存在于昆虫和其他节肢动物的外骨骼以及甲壳纲动物的外壳中,主要起身体结构支撑及保护的作用。除此之外,昆虫的围食膜也是自然界几丁质的重要来源。围食膜是一种由几丁质纤维、糖蛋白和蛋白多糖组成的非细胞薄膜状结构,从中肠延伸至后肠,其最主要的功能是阻挡病原体侵入和保护中肠上皮细胞,是昆虫抵御外界侵害的第一道天然屏障。几丁质构成了围食膜的骨架,在其结构和功能中起着重要作用^[3]。

据估计,节肢动物在淡水生态系统和海洋生态系统中每年产生的甲壳素总量分别约为 2.8×10^7 吨和 1.3×10^9 吨^[4]。而在陆地生态系统中,土壤中大量的氮元素以几丁质的形式被固定,存在于真菌细胞壁中。在全球范围内,几丁质年产量可达 $1.0 \times 10^{10} \sim 1.0 \times 10^{11}$ 吨,是仅次于纤维素的产量最丰富的有机大分子聚合物^[1]。因此,几丁质的代谢和降解不仅是几丁质降解菌的重要营养来源,对海洋和土壤微生物的维持和全球碳氮循环也有着深刻影响,几丁质降解菌和几丁质酶也对维持土壤和海洋生态平衡有重大意义。另外,几丁质酶在环境废弃物管理、生物农药、食品及保健品、医药制品等生物技术领域有广泛应用。本综述旨在介绍几丁质酶的分类和分布,总结近年来微生物几丁质酶相关研究进展及其在不同行业的应用前景。

1 几丁质的降解和几丁质酶的分类

几丁质是由GlcNAc单体聚合而成的直链同聚物,它解聚为GlcNAc单体的过程需要不同种几丁质酶的协同作用。这些几丁质酶都属于糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH),能水解两种或多种碳水化合物之间或碳水化合物与非碳水化合物部分之间的糖苷键,根据水解位置的不同被分为内切几丁质酶和外切几丁质酶。其中,内切几丁质酶(endochitinase, EC 3.2.1.14)作用于几丁质链内部区域,水解 β -(1,4)-糖苷键,产生低分子量的GlcNAc多聚物,如壳四糖、壳三糖和二乙酰基二糖。外切几丁质酶分为两类:一类是chitobiosidase(EC 3.2.1.29),催化从几丁质微纤维的非还原端开始的糖苷键水解,逐渐释放二乙酰基二糖;另一类是exo- β -N-acetylglucosaminidase(EC 3.2.1.30),作用是水解上述两种几丁质酶产生的低聚物,生成GlcNAc单体^[5]。根据系统命名法,这两类外切酶被合并为一

类,即 β -N-乙酰己糖胺酶(β -N-acetylhexosaminidase, EC 3.2.1.52)^[6]。

几丁质还可解聚为葡萄糖胺(GlcN)单体,解聚途径是先通过几丁质脱乙酰酶(chitin deacetylase, EC 3.5.1.41)转化为壳聚糖(chitosan),然后在壳聚糖酶(chitosanase, EC 3.2.1.132)的作用下解聚为GlcN单体。由于壳聚糖通常不是100%脱乙酰化,所以几丁质酶也能参与催化壳聚糖的解聚^[7](图1)。

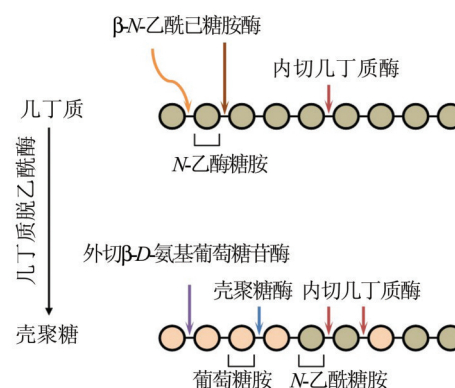


图1 几丁质降解简示意图

Fig. 1 Simplified schematics of chitin degradation

以上对于几丁质酶分类和命名的依据是国际生物化学和分子生物学学会(IUBMB)提出的系统命名法,在该框架下蛋白酶的分类基于它们的底物特异性。然而,这样的分类并不能反映酶的结构特征。因此,另一种基于氨基酸序列相似性的糖苷水解酶家族分类被提出,Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy)被用于持续更新糖苷水解酶家族的信息^[8]。迄今为止,内切几丁质酶主要来源于GH18和GH19两个糖苷水解酶家族,而外切几丁质酶主要来源于GH18和GH20^[9]。

2 几丁质酶的分布及研究现状

几丁质酶在自然界中分布广泛,内源性几丁质酶在多种生物类群中有不同的生理功能。在昆虫和甲壳类动物中,几丁质酶的主要作用是在发育过程中分解旧角质层以重塑外骨骼,从而保持和支撑身体大小和形状。对于一些以几丁质为营养源(如细菌),或以含有几丁质的生物为食物的生物(如脊椎动物),几丁质酶的主要功能是提供能量和营养。真菌几丁质酶除了营养作用,还参与细胞的生长分裂。此外,植物因容易受到真菌感染及虫害,几丁质酶可以降解病原体的保护膜,从而增加植物的抗性^[10]。

根据CAZy数据库的整理,GH18几丁质酶广泛

存在于不同物种,包括细菌、真菌、古菌、病毒、动物和一些植物,是几丁质酶研究的热点。GH19几丁质酶主要来自于植物、一些细菌和病毒,其结构与功能的研究集中在植物,微生物GH19几丁质酶的报道仅限于放线菌、绿非硫细菌和紫细菌几个类群^[11]。GH20则主要源自于细菌和一些真菌,相关研究报道来自少数细菌、真菌、昆虫和人类^[10]。GH18和GH19在序列上不具有相似性,且有着截然不同的蛋白三维结构和催化机制^[12],而GH20家族不仅可以水解几丁质外,还可以水解含 $\beta(1-4)$ 、 $\beta(1-3)$ 、 $\beta(1-2)$ 或 $\beta(1-6)$ 糖苷键的多种底物,包括壳寡糖、糖蛋白和糖脂等^[13]。相较而言,GH18家族在底物专一性、结构、功能等方面的研究较为深入。因此,本文将重点介绍GH18微生物几丁质酶的相关研究进展。

2.1 细菌

细菌是自然界中几丁质的主要降解者。在土壤生态系统中,几丁质的水解速率与细菌丰度有关^[14]。在海洋环境中,几丁质在几丁质降解细菌的作用下快速循环,使得海洋沉积物中没有大量的几丁质积累^[15]。几丁质酶广泛存在于不同细菌门类中,最多的是变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)。由于几丁质在海洋生态系统中非常丰富,一些海洋细菌能以几丁质为唯一能量来源且生长迅速,如弧菌属(*Vibrio*)^[10]。还有许多其他种类的细菌几丁质酶的酶学性质表征研究,如芽胞杆菌属(*Bacillus*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、显色菌属(*Chromobacterium*)和假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)等。

大多数细菌几丁质酶都属于GH18家族。根据蛋白催化域的结构相似性,可以将细菌GH18几丁质酶进一步分为A、B、C三个亚类。A亚类的特征是存在几丁质插入结构域(chitin insertion domain, CID),即在原有的TIM barrel基础结构中插入了一个 $\alpha+\beta$ 结构域,增加了底物结合口袋的深度,有助于酶与长链底物的结合以及酶沿着几丁质长链移动的持续性^[16]。而对于B亚类细菌几丁质酶,除了蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)的ChiNCTU2^[17]和一株假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas aurantia*) Chi23^[18],其余物种均是含有一个或多个碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding module, CBM)的非持续性内切酶,并且都缺乏CID。目前为止,有关C亚类细菌几丁质酶的研究极少。嗜热链霉菌(*Streptomyces* sp.) F-3的几丁质降解酶系统,其中包括一

个属于C亚类的GH18几丁质酶-SsChi18C。与A、B亚类相比较,SsChi18C只含七个 β -折叠,loop7区域较长,形成一个既深且宽的底物结合口袋^[19]。

几丁质降解菌有复杂的酶系统,一些细菌能产生多种几丁质酶来协同、高效地进行降解。粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)是迄今为止研究得最为深入,也是自然界中最高效的几丁质降解菌之一。它能产生四种几丁质酶ChiA、ChiB、ChiC1和ChiC2^[1]。以大肠杆菌为宿主进行异源表达的方法发现ChiA、ChiB和ChiC1对几丁质降解具有协同作用,暗示了这三种酶可能有不同的作用位点和分子反应机制^[20]。后续研究表明,ChiC是非持续性内切几丁质酶,随机在长链内部切割,而ChiA和ChiB则是在长链两端沿着相反方向滑动并持续性地释放二乙酰基二糖^[21]。这种不同类别的几丁质酶之间的协同作用也存在于其他细菌中,如链霉菌(*Streptomyces* sp.)^[19]和纤维弧菌(*Cellvibrio japonicus*)^[22]。

2.2 真菌

由于几丁质酶在真菌细胞分裂、生长和形态发生过程中起关键作用,所有的真菌都能产生不同的几丁质酶以调节细胞壁生长。酵母细胞壁的几丁质含量通常低于丝状真菌,酵母基因组编码的几丁质酶的数量也较低。一般来说,丝状真菌的基因组含有10到25种不同的几丁质酶编码基因^[23],寄生真菌和昆虫病原真菌甚至有30种或更多GH18蛋白^[24]。除了基于基因组的预测,更多的分子实验也证实多种真菌类群都能分泌不同的几丁质酶,包括木霉(*Trichoderma*)、青霉(*Penicillium*)、脉孢霉(*Neurospora*)、毛霉(*Mucor*)和曲霉(*Aspergillus*)等。其中,一些研究还对深绿木霉(*Trichoderma atroviridae*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)中的几丁质酶进行了酶学性质表征的研究(表1)。

目前研究表明,绝大多数的真菌几丁质酶都属于GH18家族,而GH19几丁质酶仅在微孢子门(Microsporidia)的家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)中发现^[25]。根据序列相似性、底物结合区域的结构和酶活性,真菌GH18几丁质酶也可以划分为A、B、C三个亚类。A亚类中的真菌几丁质酶具有单一催化结构域,没有CBM,有较深的底物结合位点,可持续性地催化。B亚类是非持续性的几丁质酶,在其催化结构域的C-末端有CBM或富含丝氨酸/苏氨酸的结构域。C亚类的真菌几丁质酶由于较深的底物结合位点,使其也具有催化持续性。在序列上,它包含几个赖氨酸基序(LysM,也称为CBM 50),

同时在催化域的N-末端有一个CBM^[24]。

除了在序列和结构上的差异,三个亚类的真菌几丁质酶在功能上也有区分。多项研究表明,许多A亚类几丁质酶在真菌的生长和自溶过程中起重要作用,包括构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的ChiB^[26]、黑曲霉(*Aspergillus niger*)的Cfcl^[27]、灰盖鬼伞(*Coprinopsis cinerea*)的ChiB1^[28]、玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)的Cts1和Cts2^[29]等。B、C亚类几丁质酶除了提供营养,还可能参与寄生真菌和昆虫的病原真菌的致病机制。金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)的基因组编码了7个B亚类几丁质酶,实验证实了其中两个酶chi2^[30]和chi3^[31]在植物防御棉红蜡害虫的过程中发挥关键作用。在木霉属中,腐生的里氏木霉(*Trichoderma reesei*)只有4个C亚类几丁质酶,而寄生的深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)和绿木霉(*Trichoderma virens*)分别编码多达9个和15个C亚类几丁质酶,表明这些额外的C亚类几丁质酶可能在真菌寄生过程中发挥作用。但是,后续研究结果显示,C亚类几丁质酶在这两种寄生真菌中的基因表达谱完全不同^[32]。因此,C亚类几丁质酶在真菌中的生物学功能还没有确切的结论。

2.3 古菌

古菌是一个独特的生命形式,在环境中分布广泛,尤其是高温极端环境。古菌适应极端环境条件,能产生在极端温度、pH值和盐浓度下稳定和活跃的酶。这些特殊的理化特性使得古菌及其蛋白酶非常适合工业流程及生物技术应用^[33]。古菌序列在测序技术的发展下高速增长,但是针对古菌几丁质酶的研究却很少。到目前为止,CAZy数据库中属于古菌的GH18序列仅101条,且绝大多数都是利用与已知基因的相似性通过基因组挖掘进行注释的,古菌的实际几丁质降解能力少有涉及。有关酶活性和结构的实验数据仅限于富盐菌属(*Haloferax*)、嗜盐杆菌属(*Halobacterium*)、火球菌属(*Pyrococcus*)、热球菌属(*Thermococcus*)和硫化叶菌属(*Sulfolobus*)中的极个别物种。

最早的古菌几丁质酶性质表征研究来自于热球菌(*Thermococcus kodakaraensis*)KOD1。该酶(Tk-ChiA)具有双催化结构域,这些结构域都属于GH18家族。位于N-末端的催化结构域是外切几丁质酶,而位于C-末端的催化结构域是内切酶,它们对于几丁质的解聚有协同作用,能产生不同聚合度的几丁寡糖^[34]。Chen等^[35]的研究报道了Tk-ChiA具有能与几丁质和纤维素结合的CBM结构域,可以对几丁

质和纤维素进行双重水解活性。另一个研究在对激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)基因组的挖掘中发现,其编码的两种几丁质酶分别与Tk-ChiA的两个催化结构域具有同源性,它们在大肠杆菌中的表达产物也具有几丁质酶的活性。以胶体几丁质作为底物时,这两种几丁质酶展示出了对降解底物的协同作用^[36]。后续DNA序列分析显示,这两个基因是由一个核苷酸插入导致可读框移位而形成的。去除插入的核苷酸后表达的重组几丁质酶,其酶活性大幅度增加^[37]。表1列举了不同来源菌^[38-60]的几丁质酶情况。

2.4 病毒

杆状病毒是一类以节肢动物作为专一性宿主的双链DNA病毒,主要感染鳞翅目(Lepidoptera)、双翅目(Diptera)和膜翅目(Hymenoptera)昆虫。大多数杆状病毒,特别是感染鳞翅目幼虫的杆状病毒,都含有几丁质酶基因^[61]。除杆状病毒之外,感染藻类的小球藻病毒是唯一已知的编码几丁质酶的其他病毒^[62]。病毒几丁质酶通过削弱宿主的屏障结构,促进病毒感染或从被感染细胞中释放新生病毒。小球藻病毒几丁质酶在病毒复制过程中作为一个晚期基因被表达,可能参与细胞裂解所需的细胞壁降解和子代病毒释放的过程^[61]。杆状病毒的几丁质酶和组织蛋白酶一同在昆虫组织液化的过程中起直接作用,它们参与表皮的降解,破坏昆虫的围食膜,使病毒从昆虫体内释放并传播^[63]。

目前,已知的病毒几丁质酶都属于GH18家族,研究较多的是一种来自苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)的几丁质酶ChiA。其在体外实验中具有抗真菌和杀虫的双重作用,ChiA在转基因烟草植株中的表达增强了植株对病原真菌和害虫的抗性^[64]。纯化后,该蛋白在体外能增强对两种鳞翅目昆虫幼虫围食膜的穿透性,抑制植物病原真菌孢子萌发和生长^[65]。AcMNPV的ChiA与粘质沙雷氏菌的几丁质酶SmChiA的氨基酸序列相似度达到60.5%,表明AcMNPV可能通过水平基因转移的方式从细菌中获得了该几丁质酶基因^[66]。在后续研究中,研究者从感染了杆状病毒的Sf-9细胞培养基中纯化了AcMNPV几丁质酶,并对纯化后的几丁质酶进行了作用方式的表征。结果表明,AcMNPV几丁质酶从几丁质低聚糖底物的非还原端开始水解第二个 β -1,4糖苷键,其作用方式与粘质沙雷氏菌几丁质酶SmChiA相似^[66]。这种持续性的作用机制可能有利于被感染宿主幼虫的液化。

表 1 微生物几丁质酶的特性表征研究
Table 1 Characterization studies of some microbial chitinases

物种	门	最适温度/°C	最适 pH	来源	文献
细菌					
嗜热淀粉酶链霉菌(<i>Streptomyces thermodiastaticus</i>)	放线菌门	65	5.5	陆地	[38]
白链霉菌(<i>Streptomyces albolongus</i>)	放线菌门	55	5	陆地	[39]
链霉菌(<i>Streptomyces</i> sp.)	放线菌门	50	8	海洋	[40]
松噬几丁质菌(<i>Chitinophaga pinensis</i>)	拟杆菌门	35	6	陆地	[41]
枯草芽胞杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	厚壁菌门	50	4	陆地	[42]
苏云金芽胞杆菌(<i>Bacillus thuringiensis</i>)	厚壁菌门	55	4~6	陆地	[43]
类芽胞杆菌(<i>Paenibacillus elgii</i>)	厚壁菌门	50	7	—	[44]
紫色色杆菌(<i>Chromobacterium violaceum</i>)	变形菌门	60	5	陆地	[45]
粘质沙雷氏菌(<i>Serratia marcescens</i>)	变形菌门	55	6	—	[46]
嗜麦芽窄食单胞菌(<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)	变形菌门	40	5,7	—	[47]
弧菌(<i>Vibrio</i> sp.)	变形菌门	35	8	海洋	[48]
粪产碱菌(<i>Alcaligenes faecalis</i>)	变形菌门	37	8	海洋	[49]
海摩替亚氏菌(<i>Moritella marina</i>)	变形菌门	28	5	海洋	[50]
橙色假交替单胞菌(<i>Pseudoalteromonas aurantia</i>)	变形菌门	60	5	海洋	[18]
假交替单胞菌(<i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	变形菌门	20	8	海洋	[51]
真菌					
支顶孢属菌(<i>Acremonium</i> sp.)	子囊菌门	23~45	6~7.6	海洋	[52]
雪白曲霉(<i>Aspergillus niveus</i>)	子囊菌门	65	5	—	[53]
曲霉(<i>Aspergillus griseoaurantiacus</i>)	子囊菌门	40	4.5	海洋	[54]
赭绿青霉(<i>Penicillium ochrochloron</i>)	子囊菌门	40	7	—	[55]
灰腐质霉(<i>Humicola grisea</i>)	子囊菌门	70	3	—	[56]
灰盖鬼伞(<i>Coprinopsis cinerea</i>)	担子菌门	35~40	5	—	[28]
家蚕微孢子虫(<i>Nosema bombycis</i>)	微孢子门	40	7	—	[25]
古菌					
热球菌(<i>Thermococcus chitonophagus</i>)	广古菌门	70	7	—	[57]
热球菌(<i>Thermococcus kodakarensis</i>)	广古菌门	65	7	—	[35]
盐沼盐杆菌(<i>Halobacterium salinarum</i>)	广古菌门	40	7.3	海洋	[58]
地中海富盐菌(<i>Haloferax mediterranei</i>)	广古菌门	—	—	—	[59]
激烈火球菌(<i>Pyrococcus furiosus</i>)	广古菌门	90~95	6	—	[36]
东工大硫化叶菌(<i>Sulfolobus tokodaii</i>)	泉古菌门	70	2.5	—	[60]

3 几丁质酶改造及高效表达生产

由于野生型菌株几丁质酶的产量低、活性弱,现阶段利用野生型菌株进行几丁质资源的高效利用仍然具有挑战性。因此,多年来有关几丁质酶的研究重点在于获得更高的产量和提高其催化活性^[11]。除了利用分离培养和环境宏基因组学方法筛选新型几丁质降解菌和几丁质酶,结合外源表达和蛋白质工程的实验方法也对阐明特定结构或氨基酸残基的功能、提高酶活性及产量提供了许多重要信息,并取得了一定进展。

外源表达是提高靶蛋白产量的有效策略。几丁

质酶表达应用最为广泛的表达系统包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[67]、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)^[68]、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)^[69]等,因为它们具有生长速度快、发酵周期短、易于遗传操作、重组蛋白分泌能力强等优点。采用一系列分子生物学方法可提高几丁质酶在枯草芽胞杆菌 WB600 中的表达,包括加入信号肽使几丁质酶成功分泌到细胞外,进一步优化核糖体结合位点和间隔序列,以及结合分子对接技术与定点突变技术,将几丁质酶的表达水平和比活力分别提高至 51.67 和 249.62 U/mg^[70]。

蛋白质工程的主要方法包括定向进化、定点突变和结构域融合,是在已知几丁质酶的基础上进行

改造和优化的重要途径。在定向进化的方法中,通过易出错的PCR进行随机突变,建立突变文库,进行高通量筛选,可以高效地挑选出具有更高活性的突变体^[10]。利用该方法将地衣芽胞杆菌几丁质酶的催化效率提高了2.7倍^[71]。从随机突变文库中筛选到了酶活力提高1.2倍和抗线虫活性提升20%的突变体PachiN35D^[72]。通过定向进化方法获得了几丁质酶突变体并利用枯草芽胞杆菌作为外源表达系统,成功实现高产胞外几丁质酶,其酶比活力最高提升了16.89倍,可达 $(1\,004.83 \pm 0.87) \text{ U/mg}^{[68]}$ 。

许多研究利用几丁质结合和催化位点附近的定点突变来对特定的氨基酸残基进行功能验证。有研究表明,在保守催化区的某些特定氨基酸残基,如天冬氨酸^[73]、色氨酸^[74]被其他氨基酸取代时,会导致几丁质酶活性显著降低或完全失活,说明其对几丁质酶的催化活性至关重要。除此之外,定点突变也是一种提高几丁质酶性状的常用手段。结合同源模拟、分子对接和定点突变,Ni等^[75]构建的苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)几丁质酶突变体酶活性提高了60%以上,且表现出抗虫和抗真菌活性。Emruzi等^[76]通过G191V定点突变显著提高了粘质沙雷氏菌B4A几丁质酶的稳定性。在50℃和60℃条件下,突变体的热稳定性分别提高了约5和15倍。

许多几丁质酶的催化活性较低的原因之一是缺乏几丁质结合域,所以结构域融合对增强几丁质酶与底物的结合从而提高几丁质酶活性可以起到关键作用。将GH18催化域和N-末端LysM结构域进行了融合,结果表明融合蛋白的几丁质水解效率明显高于单催化结构域蛋白^[77]。几丁质酶催化域和CBM的融合也被证明能提高几丁质酶对底物的亲和力、酶活性和构象稳定性^[78]。

4 几丁质酶的潜在应用

近年来,几丁质及其衍生物如几丁寡糖、壳聚糖等在食品、环保、医药等领域的开发和研究引起了国内外的普遍关注。与化学生产法相比,利用几丁质酶降解生产几丁寡糖、壳聚糖具有反应条件温和、对环境友好的优点。在此基础上,几丁质酶在废物管理、农业病虫害防治和人类保健等生物技术领域的应用中都显示出了巨大的潜力。

4.1 废物管理

我国得益于广阔的水域面积,水产品非常丰富。据全国渔业经济统计公报,2018年我国水产养殖的贝类和甲壳类年产量仅次于鱼类,分别为1 463.51万吨和514.11万吨(来源:中国渔业协会,http://

www.china-cfa.org/xwzx/xydt/2019/0605/141.html),而虾、蟹、龙虾、磷虾等甲壳动物在食品加工过程中会产生大量副产品,其总重量的75%是加工产生的固体废物,主要由几丁质、碳酸钙和蛋白质组成^[79]。其中,蛋白质约占所述废物干重的20%~40%,碳酸钙约占20%~50%,几丁质约占15%~40%。针对这些丰富而便宜的可再生资源,几丁质酶可以将甲壳动物废弃物中的几丁质成分降解转化为酵母单细胞蛋白。最早于上世纪90年代,科学家尝试了使用粘质沙雷氏菌的几丁质酶来水解几丁质、利用库德里阿兹氏毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)产生单细胞蛋白^[10]。汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和疣孢漆斑菌(*Myrothecium verrucaria*)也是生产单细胞蛋白的常用菌^[2]。在这种方法中,经过几丁质酶降解的甲壳动物废弃物是很好的碳源或营养源,可用于水产养殖生产,还可将其转化为生物肥料。利用赭绿青霉(*Penicillium ochrochloron*)的几丁质酶和耶氏解脂酵母(*Yarrowia lipolytica*)生产单细胞蛋白,所得产物的蛋白质和核酸含量分别为65%和2.9%^[80],用此单细胞蛋白替代50%的鱼粉饲料能促进鳞头鳅属鱼类的生长,体现了利用几丁质酶生产单细胞蛋白的优势。

4.2 农业病虫害防治

由于几丁质是真菌、昆虫、线虫等生物体中的结构性组成,而几丁质酶能降解害虫和致病菌的不同结构,如昆虫的围食膜和角质层、线虫的蛋壳和真菌的植物病原细胞壁,因此几丁质酶作为潜力巨大的抗真菌药物和生物杀虫剂在近年来受到广泛关注。同时,几丁质的代谢不是哺乳动物维持生命活动所必需,因此,以几丁质酶为靶点的抗真菌药物和生物杀虫剂的优点是对人畜无害。几丁质酶可以直接用作生物农药,也可以与化学制剂结合使用,不仅对合成农药有增效作用,而且可以减少其对生态系统的影响^[12]。据研究,几丁质酶可以水解昆虫幼虫中肠围食膜的几丁质组分,从而加速杀虫剂侵染中肠上皮细胞,提高幼虫死亡率^[3]。

农业作物减产的主要原因之一是真菌感染。几丁质酶作为植物防御机制的一部分,广泛存在于植物中。它能催化真菌细胞壁重要成分的水解,抑制真菌菌丝生长,破坏芽管和顶端细胞壁。因此,在抗病基因工程中,几丁质酶和其他病原体相关保护蛋白经常在转基因植物中协同表达^[81]。研究表明,将几丁质酶基因单独转入或与其他致病相关蛋白基因

一同转入作物中,得到的转基因植株能高效表达具有生物活性的几丁质酶,可以显著提高植物抵抗病虫害的能力。到目前为止,已通过此方法得到的转基因植物包括烟草、番茄、大豆、马铃薯、莴苣、甜菜、玉米、花生、芥末、小米、棉花、小麦和大米等^[82]。将棉铃虫几丁质酶基因在转基因玉米植株中表达,得到的转基因玉米植株对玉米螟的致死率可达到50%^[83]。粘质沙雷菌的几丁质酶基因*SmchiC*被转入烟草中,所得到的转基因植株不仅能提高对草地贪夜蛾幼虫的致死率(最高可达90%),而且对灰霉菌的抗性也显著高于野生型植株^[84]。

4.3 在医学方面的应用

由于在人体和哺乳动物体内未发现内源性几丁质,几丁质酶是抗真菌药物设计研究中的理想靶酶之一,可被添加进抗真菌霜剂和洗剂中,或与其他药物联合使用,治疗各种真菌感染疾病^[85]。除此之外,几丁质酶在哺乳动物免疫系统中是宿主防御的一个重要环节。对小鼠模型的研究证明,酸性哺乳动物几丁质酶(acidic mammalian chitinase, AMCase)的表达与支气管哮喘密切相关。它能抑制几丁质诱导的先天性炎症,也能通过影响Th2炎症因子的表达来增强过敏原诱导的Th2型炎症,被认为在支气管哮喘病理生理机制和过敏反应中起到不可忽视的作用^[86]。目前几丁质酶在免疫方面的研究还处于理论研究阶段,有更多的方向可以深入探索,还需要更多的工作对这些可能性进行应用开发。

几丁质酶在医学上的另一个应用是将几丁质和壳聚糖转化为一些衍生物,例如壳寡糖和N-乙酰氨基葡萄糖。它们既有无毒、无过敏性、可生物相容、可生物降解的优点,又具有抗菌、抗肿瘤、调节人体免疫等生理活性,因此在临床和医药行业应用广泛^[87]。通过克隆和异源表达获得了一个来自巴伦葛兹类芽胞杆菌(*Paenibacillus barengoltzii*)的新型重组几丁质酶PbChi74,在其与来自米氏假根毛霉(*Rhizomucor miehei*)的外切几丁质酶的共同作用下,胶体几丁质解聚为GlcNAc单体的转化率高达92.6%^[88]。天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor* A3(2))的内切几丁质酶*ScChiC*和外切几丁质酶*ScHEX*也能协同将几丁质解聚为GlcNAc单体,转化率同样在90%以上。这样的水解转化率是迄今为止效率最高的,证明了这些微生物多酶混合物在几丁质衍生物工业化生产中有巨大潜力。

5 总结及展望

几丁质是海洋环境中最丰富的可再生高分子碳

水化合物,能为海洋生物提供碳和氮的能量来源。海洋微生物通过几丁质酶降解富含几丁质的物质,使其成为可被利用的小分子,在海洋碳氮循环中发挥着基础性作用。相比于来自陆地上动物、植物或细菌的同系物,一些来自海洋环境的几丁质酶通常展示出更适合工业化的特性,如更耐低温、耐高pH及耐高盐浓度,在各个生物技术领域有着广阔的应用前景。其巨大潜力驱动了几丁质降解菌的筛选、几丁质酶的生化特性、催化的分子机制等相关研究。

广东省海岸线长达3 368.1 km,水产养殖面积达47.9万公顷,是渔业资源丰富的大省。2018年广东省贝类海水产品、贝类淡水产品、虾蟹类海水产品、虾蟹类淡水产品产量分别达到194.24万、3.65万、79.37万和27.10万吨(来源:中华人民共和国国家统计局国家数据, <http://data.stats.gov.cn/>)。这些海洋生物的食品加工和工业处理的过程中产生的海量废弃物中包括了大量的可再利用几丁质资源。粤港澳大湾区自然资源多样,拥有面积广阔的林地、湿地、红树林、海洋等多种生态系统,不仅拥有丰富的渔业资源,也拥有着丰富的微生物基因库。因此,可以充分利用粤港澳大湾区得天独厚的自然资源,挖掘陆地和海洋生态环境的物种、遗传和功能多样性。例如,通过利用高通量技术筛选新型几丁质降解菌,通过随机突变、定点突变、结构域融合等蛋白质工程技术及合成生物学技术对几丁质酶进行改造,获得更稳定高效的新型几丁质酶。对于这些海洋几丁质酶资源的探索 and 开发,不仅有助于生物农药、化工原料、海洋功能食品及保健品、海洋生物医药制品等领域取得进展,还可以加速建成“海洋生物天然产物化合物库”,实现海洋生物资源的高效开发和利用。

参考文献

- [1] Beier S, Bertilsson S. Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies [J]. Front Microbiol, 2013, 4: 149.
- [2] Dahiya N, Tewari R, Hoondal G S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: A review [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 71(6): 773-782.
- [3] Konno K, Mitsunashi W. The peritrophic membrane as a target of proteins that play important roles in plant defense and microbial attack [J]. J Insect Physiol, 2019, 117: 103912.
- [4] Cauchie H M. Chitin production by arthropods in the hydrosphere [J]. Hydrobiologia, 2002, 470(1): 63-95.
- [5] Bhattacharya A S, Bhattacharya A, Pletschke B I. Syn-

- ergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: A novel perspective for enhanced bio-ethanol production [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(6): 1117-1129.
- [6] Beygmoradi A, Homaei A, Hemmati R, *et al.* Marine chitinolytic enzymes, a biotechnological treasure hidden in the ocean? [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(23): 9937-9948.
- [7] Schmitz C, Auza L G, Koberidze D, *et al.* Conversion of chitin to defined chitosan oligomers: current status and future prospects [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(8): 452.
- [8] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (cazy): An expert resource for glycogenomics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(37 suppl_1): D233-D238.
- [9] Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, *et al.* The carbohydrate - active enzymes database (cazy) in 2013 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(D1): D490 - D495.
- [10] Rathore A S, Gupta R D. Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives [J]. *Enzym Res*, 2015, 2015: 1-8.
- [11] Udaya Prakash N A, Jayanthi M, Sabarinathan R, *et al.* Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases [J]. *J Mol Evol*, 2010, 70(5): 466-478.
- [12] Berini F, Katz C, Gruzdev N, *et al.* Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(3): 818-838.
- [13] Slámová K, Bojarová P. Engineered *N*-acetylhexosamine-active enzymes in glycoscience [J]. *Biochimica et Biophys Acta (BBA)-Gen Subj*, 2017, 1861(8): 2070-2087.
- [14] Hui C, Jiang H, Liu B, *et al.* Chitin degradation and the temporary response of bacterial chitinolytic communities to chitin amendment in soil under different fertilization regimes [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 705: 136003.
- [15] Aunkham A, Zahn M, Kesireddy A, *et al.* Structural basis for chitin acquisition by marine *Vibrio* species [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 220.
- [16] Li H, Greene L H. Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8654-e8654.
- [17] Hsieh Y C, Wu Y J, Chiang T Y, *et al.* Crystal structures of *Bacillus cereus* NCTU2 chitinase complexes with chitoooligomers reveal novel substrate binding for catalysis: a chitinase without chitin binding and insertion domains [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(41): 31603 - 31615.
- [18] Wang Y J, Jiang W X, Zhang Y S, *et al.* Structural insight into chitin degradation and thermostability of a novel endochitinase from the glycoside hydrolase family 18 [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2457.
- [19] Sun X M, Li Y J, Tian Z N, *et al.* A novel thermostable chitinolytic machinery of *Streptomyces* sp. F-3 consisting of chitinases with different action modes [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12(1): 136.
- [20] Suzuki K, Sugawara N, Suzuki M, *et al.* Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(5): 1075-1083.
- [21] Hult E L, Katouno F, Uchiyama T, *et al.* Molecular directionality in crystalline beta-chitin: hydrolysis by chitinases A and B from *Serratia marcescens* 2170 [J]. *Biochem J*, 2005, 388(Pt 3): 851-856.
- [22] Monge E C, Tuveng T R, Vaaje-Kolstad G, *et al.* Systems analysis of the glycoside hydrolase family 18 enzymes from *Cellvibrio japonicus* characterizes essential chitin degradation functions [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(10): 3849-3859.
- [23] Seidl V. Chitinases of filamentous fungi: A large group of diverse proteins with multiple physiological functions [J]. *Fungal Biol Rev*, 2008, 22(1): 36-42.
- [24] Hartl L, Zach S, Seidl-Seiboth V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(2): 533-543.
- [25] Han B, Zhou K, Li Z H, *et al.* Characterization of the first fungal glycosyl hydrolase family 19 chitinase (Nb-chiA) from *Nosema bombycis* (Nb) [J]. *J Eukaryot Microbiol*, 2016, 63(1): 37-45.
- [26] Shin K S, Kwon N J, Kim Y H, *et al.* Differential roles of the ChiB chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans* [J]. *Eukaryot Cell*, 2009, 8(5): 738-746.
- [27] van Munster J M, van der Kaaij R M, Dijkhuizen L, *et al.* Biochemical characterization of *Aspergillus niger* Cf-cI, a glycoside hydrolase family 18 chitinase that releases monomers during substrate hydrolysis [J]. *Microbiol Read Engl*, 2012, 158(Pt 8): 2168-2179.
- [28] Zhou Y J, Kang L Q, Niu X, *et al.* Purification, characterization and physiological significance of a chitinase from the pilei of *Coprinopsis cinerea* fruiting bodies [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(12): fnw120
- [29] Langner T, Öztürk M, Hartmann S, *et al.* Chitinases

- are essential for cell separation in *Ustilago maydis* [J]. Eukaryot Cell, 2015, 14(9): 846-857.
- [30] Boldo J T, Junges A, Amaral K B, *et al.* Endochitinase CHI₂ of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* [J]. Curr Genet, 2009, 55(5): 551-560.
- [31] Staats C C, Kmetzsch L, Lubeck I, *et al.* *Metarhizium anisopliae* chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus* [J]. Fungal Biol, 2013, 117(2): 137-144.
- [32] Gruber S, Kubicek C P, Seidl-Seiboth V. Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma* species [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(20): 7217-7226.
- [33] ÁCabrera M, Blamey J M. Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments [J]. Biol Res, 2018, 51(1): 1-15.
- [34] Tanaka T, Fukui T, Imanaka T. Different cleavage specificities of the dual catalytic domains in chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 [J]. J Biol Chem, 2001, 276(38): 35629-35635.
- [35] Chen L N, Wei Y, Shi M, *et al.* An archaeal chitinase with a secondary capacity for catalyzing cellulose and its biotechnological applications in shell and straw degradation [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1253.
- [36] Gao J, Bauer M W, Shockley K R, *et al.* Growth of hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* on chitin involves two family 18 chitinases [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(6): 3119-3128.
- [37] Kreuzer M, Schmutzler K, Waage I, *et al.* Genetic engineering of *Pyrococcus furiosus* to use chitin as a carbon source [J]. BMC Biotechnol, 2013, 13: 1-10.
- [38] Take K, Fujiki H, Suyotha W, *et al.* Enzymatic and molecular characterization of an acidic and thermostable chitinase 1 from *Streptomyces thermodiastaticus* HF 3-3 [J]. J Gen Appl Microbiol, 2018, 64(4): 190-197.
- [39] Gao L, Sun J, Secundo F, *et al.* Cloning, characterization and substrate degradation mode of a novel chitinase from *Streptomyces albolongus* ATCC 27414 [J]. Food Chem, 2018, 261: 329-336.
- [40] Han Y, Yang B, Zhang F, *et al.* Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. Da11 associated with south china sea sponge craniella australiensis [J]. Mar Biotechnol, 2009, 11(1): 132-140.
- [41] Ramakrishna B, Vaikuntapu P, Mallakuntla M K, *et al.* Carboxy-terminal glycosyl hydrolase 18 domain of a carbohydrate active protein of *Chitinophaga pinensis* is a non-processive exochitinase [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 115: 1225-1232.
- [42] Senol M, Nadaroglu H, Dikbas N, *et al.* Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum* [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2014, 13: 1-7.
- [43] Honda S, Kunii T, Nohara K, *et al.* Characterization of a *Bacillus thuringiensis* chitinase that binds to cellulose and chitin [J]. AMB Express, 2017, 7(1): 1-11.
- [44] Kim Y H, Park S K, Hur J Y, *et al.* Purification and characterization of a major extracellular chitinase from a biocontrol bacterium, *Paenibacillus elgii* HOA 73 [J]. Plant Pathol J, 2017, 33(3): 318-328.
- [45] Sousa A J S, Silva C F B, Sousa J S, *et al.* A thermostable chitinase from the antagonistic *Chromobacterium violaceum* that inhibits the development of phytopathogenic fungi [J]. Enzyme Microb Technol, 2019, 126: 50-61.
- [46] Li J C, Zheng J M, Liang Y H, *et al.* Expression and characterization of a chitinase from *Serratia marcescens* [J]. Protein Expr Purif, 2020, 171: 105613.
- [47] Suma K, Podile A R. Chitinase a from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities [J]. Bioresour Technol, 2013, 133: 213-220.
- [48] Bendt A, Hüller H, Kammel U, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a chitinase gene from the antarctic psychrotolerant bacterium *Vibrio* sp. strain Fi:7 [J]. Extremophiles, 2001, 5(2): 119-126.
- [49] Annamalai N, Veeramuthu Rajeswari M, Vijayalakshmi S, *et al.* Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes faecalis* AU02 by utilizing marine wastes and its antioxidant activity [J]. Ann Microbiol, 2011, 61(4): 801-807.
- [50] Stefanidi E, Vorgias C E. Molecular analysis of the gene encoding a new chitinase from the marine psychrophilic bacterium *Moritella marina* and biochemical characterization of the recombinant enzyme [J]. Extremophiles, 2008, 12(4): 541-552.
- [51] Wang X H, Zhao Y, Tan H D, *et al.* Characterisation of a chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. D1-6, a marine psychrophilic bacterium [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 70: 455-462.
- [52] Chung D, Baek K, Bae S S, *et al.* Identification and characterization of a marine-derived chitinolytic fungus, *Acremonium* sp. YS₂-2 [J]. J Microbiol, 2019, 57(5): 372-380.
- [53] Alves T B, de Oliveira Ornela P H, de Oliveira A H

- C, *et al.* Production and characterization of a thermostable antifungal chitinase secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niveus* under submerged fermentation [J]. 3 Biotech, 2018, 8(8): 1-10.
- [54] Shehata A N, Abd El Aty A A, Darwish D A, *et al.* Purification, physicochemical and thermodynamic studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988 [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 107: 990-999.
- [55] Patil N S, Waghmare S R, Jadhav J P. Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation [J]. Process Biochem, 2013, 48(1): 176-183.
- [56] Kumar M, Brar A, Vivekanand V, *et al.* Process optimization, purification and characterization of a novel acidic, thermostable chitinase from *Humicola grisea* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 116: 931-938.
- [57] Andronopoulou E, Vorgias C E. Purification and characterization of a new hyperthermostable, allosamidin-insensitive and denaturation-resistant chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus* [J]. Extremophiles, 2003, 7(1): 43-53.
- [58] García-Fraga B, da Silva A F, López-Seijas J, *et al.* Functional expression and characterization of a chitinase from the marine archaeon *Halobacterium salinarum* CE-CT 395 in *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(5): 2133-2143.
- [59] Hou J, Han J, Cai L, *et al.* Characterization of genes for chitin catabolism in *Haloferax mediterranei* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(3): 1185-1194.
- [60] Staufenberger T, Imhoff J F, Labes A. First crenarchaeal chitinase found in *Sulfolobus tokodaii* [J]. Microbiol Res, 2012, 167(5): 262-269.
- [61] Hiramatsu S, Ishihara M, Fujie M, *et al.* Expression of a chitinase gene and *Lysis* of the host cell wall during *Chlorella* virus CVK₂ infection [J]. Virology, 1999, 260(2): 308-315.
- [62] de Ishimwe E, Hodgson J J, Clem R J, *et al.* Reaching the melting point: degradative enzymes and protease inhibitors involved in baculovirus infection and dissemination [J]. Virology, 2015, 479-480: 637-649.
- [63] Kong M, Zuo H, Zhu F F, *et al.* The interaction between baculoviruses and their insect hosts [J]. Dev Comp Immunol, 2018, 83: 114-123.
- [64] Corrado G, Arciello S, Fanti P, *et al.* The Chitinase a from the baculovirus acmnpv enhances resistance to both fungi and herbivorous pests in tobacco [J]. Transgenic Res, 2008, 17(4): 557-571.
- [65] Di Maro A, Terracciano I, Sticco L, *et al.* Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco [J]. J Biotechnol, 2010, 147(1): 1-6.
- [66] Fukamizo T, Sato H, Mizuhara M, *et al.* Chitinase from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus: rapid purification from sf-9 medium and mode of action [J]. Biosci, Biotechnol, Biochem, 2011, 75(9): 1763-1769.
- [67] Yang S Q, Fu X, Yan Q J, *et al.* Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii* [J]. Food Chem, 2016, 192: 1041-1048.
- [68] Wang S J, Fu G, Li J L, *et al.* High-efficiency secretion and directed evolution of chitinase BcChiA1 in *Bacillus subtilis* for the conversion of chitinaceous wastes into chitooligosaccharides [J]. Frontiers Biotechnol, 2020, 8: 432.
- [69] Kidibule P E, Santos-Moriano P, Jiménez-Ortega E, *et al.* Use of chitin and chitosan to produce new chitooligosaccharides by chitinase Chit42: enzymatic activity and structural basis of protein specificity [J]. Microb Cell Fact, 2018, 17(1): 1-13.
- [70] Pan M Y, Li J H, Lv X, *et al.* Molecular engineering of chitinase from *Bacillus* sp. Dau101 for enzymatic production of chitooligosaccharides [J]. Enzyme Microb Technol, 2019, 124: 54-62.
- [71] Songsiririthigul C, Pesatcha P, Eijssink V G, *et al.* Directed evolution of a *Bacillus* chitinase [J]. Biotechnol J, 2009, 4(4): 501-509.
- [72] Chen J P, An Y, Kumar A, *et al.* Improvement of chitinase Pachi with nematocidal activities by random mutagenesis [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 96: 171-176.
- [73] Lu Y M, Zen K C, Muthukrishnan S, *et al.* Site-directed mutagenesis and functional analysis of active site acidic amino acid residues D142, D144 and E146 in *Manduca sexta* (tobacco hornworm) chitinase [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(11): 1369-1382.
- [74] Zhang H, Huang X, Fukamizo T, *et al.* Site-directed mutagenesis and functional analysis of an active site tryptophan of insect chitinase [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(11): 1477-1488.
- [75] Ni H, Zeng S Q, Qin X, *et al.* Molecular docking and site-directed mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* chitinase to improve chitinolytic, synergistic lepidopteran-larvicidal and nematocidal activities [J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(3): 304-315.
- [76] Emruzi Z, Aminzadeh S, Karkhane A A, *et al.* Improv-

- ing the thermostability of *Serratia marcescens* B4A chitinase via G191V site-directed mutagenesis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 116: 64-70.
- [77] Takashima T, Sunagawa R, Uechi K, *et al.* Antifungal activities of lysm-domain multimers and their fusion chitinases [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154: 1295-1302.
- [78] Neeraja C, Moerschbacher B, Podile A R. Fusion of cellulose binding domain to the catalytic domain improves the activity and conformational stability of chitinase in *Bacillus licheniformis* DSM 13 [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(10): 3635-3641.
- [79] Hamed I, Özogul F, Regenstein J M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): a review [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2016, 48: 40-50.
- [80] Patil N, Jadhav J P. Single cell protein production using *Penicillium ochrochloron* chitinase and its evaluation in fish meal formulations [J]. *J Microbial Biochem Technol*, 2014, s4.
- [81] Nagpure A, Choudhary B, Gupta R K. Chitinases: in agriculture and human healthcare [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2014, 34(3): 215-232.
- [82] Cletus J, Balasubramanian V, Vashisht D, *et al.* Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance [J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(11): 1719-1732.
- [83] Osman G H, Assem S K, Alreedy R M, *et al.* Development of insect resistant maize plants expressing a chitinase gene from the cotton leaf worm, *Spodoptera litoralis* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18067.
- [84] Navarrogonzalez S S, Ramírez-Trujillo J A, Peña-Chora G, *et al.* Enhanced tolerance against a fungal pathogen and insect resistance in transgenic tobacco plants overexpressing an endochitinase gene from *Serratia marcescens* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3482.
- [85] Hamid R, Khan M A, Ahmad M, *et al.* Chitinases: an update [J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2013, 5(1): 21-29.
- [86] Elieh Ali Komi D, Sharma L, Dela Cruz C S. Chitin and its effects on inflammatory and immune responses [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2018, 54(2): 213-223.
- [87] Patel S, Goyal A. Chitin and chitinase: role in pathogenicity, allergenicity and health [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 97: 331-338.
- [88] Fu X, Yan Q, Yang S, *et al.* An acidic, thermostable exochitinase with β -N-acetylglucosaminidase activity from *Paenibacillus barengoltzii* converting chitin to n-acetyl glucosamine [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 174.
-
- (编辑: 杨晓翠)