

# 几丁质降解菌 *Acinetobacter* sp. WML1 的生物安全性和发酵优化

唐白露<sup>1</sup>, 刘木兰<sup>1</sup>, 旷琦颖<sup>1</sup>, 何雪婷<sup>1</sup>, 刘佳<sup>1</sup>, 唐映红<sup>1</sup>, 何海伦<sup>2\*</sup>

(1. 湖南文理学院 生命与环境科学学院 常德市农业生物大分子研究中心 环洞庭湖水产健康养殖及加工湖南省重点实验室, 中国湖南 常德 415000; 2. 中南大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410013)

**摘要:** *Acinetobacter* sp. WML1 分离自淡水湖渔场沉积物, 能降解几丁质, 具有一定的应用价值。为了评价菌株 WML1 的生物安全性, 为菌株的安全使用提供参考和保障, 采用常规纸片扩散法检测耐药性, 用血琼脂平板划线法检测溶血性, 用溴甲酚紫显色法检测氨基酸脱羧酶活性, 用试剂盒测定硝酸还原酶活性。在菌株生物安全性分析的基础上, 通过单因素试验法和正交试验法进行菌株 WML1 产几丁质酶发酵条件的优化。结果表明, 菌株 WML1 对多种抗生素敏感, 无溶血性, 无硝酸还原酶活性, 有精氨酸脱羧酶活性及微弱的赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶活性; 其最优产酶条件为 0.4% 黄豆粉、0.20% 半乳糖、0.03%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.07%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.002%  $\text{FeSO}_4$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.001%  $\text{ZnSO}_4$ 、0.60% 胶体几丁质、pH 9.5、5.0% 的接种量、25 mL 的装液量(对应 250 mL 容量瓶)、37 °C 的培养温度, 优化后的几丁质酶活为  $(2.72 \pm 0.09)$  U/mL。综上所述, 不动杆菌 WML1 在使用安全性上危害较小, 可防可控, 经发酵条件优化后其所产几丁质酶的活性提高了约 4.61 倍, 为产几丁质酶菌株的工业化应用提供了理论基础。

**关键词:** 几丁质降解菌; 几丁质酶; 不动杆菌 WML1; 生物安全性; 发酵优化

中图分类号: Q939.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)04-0361-10

## Biosafety and Fermentation Optimization of *Acinetobacter* sp. WML1 for Chitinase Production

TANG Bailu<sup>1</sup>, LIU Mulan<sup>1</sup>, KUANG Qiyang<sup>1</sup>, HE Xueting<sup>1</sup>, LIU Jia<sup>1</sup>,  
TANG Yinghong<sup>1</sup>, HE Hailun<sup>2\*</sup>

(1. Hunan Provincial Key Laboratory for Health Aquaculture and Product Processing in Dongting Lake Area, Changde Research Center for Agricultural Biomacromolecule, College of Life and Environmental Sciences, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, Hunan, China; 2. School of Life Sciences, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China)

**Abstract:** *Acinetobacter* sp. WML1 was isolated from the fishery sediments of freshwater lakes and proved to have application value due to its ability to degrade chitin. Herein, the biosafety of the chitinase-producing strain WML1 was first evaluated for application. The drug resistance of the strain was detected with the disk diffusion method, haemolytic activity was analyzed by streaking the blood agar plate, amino acid decarboxylase and nitrate reductase activities were measured by the chromogenic assay with bromocresol purple and nitrate reductase activity assay kit, respectively. On the basis of biosafety analysis, the fermentation conditions of the strain were then optimized by single-factor and orthogonal tests for chitinase production. The results showed that the strain WML1 was sensitive to most antibiotics, and had no haemolytic activity or nitrate reductase activity, had arginine decarboxylase activity and weak lysine and ornithine decarboxylase ac-

收稿日期: 2022-09-14; 修回日期: 2022-12-23; 网络首发日期: 2023-03-15

基金项目: 湖南省自然科学基金青年基金项目(2021JJ40377); 湖南省自然科学基金面上项目(2021JJ30029); 湖南省教育厅科学研究一般项目(20C1270); 常德市农业生物大分子研究中心开放课题(2020AB07); 湖南省科技创新计划资助项目(2021RC1013)

作者简介: 唐白露(1991—), 女, 湖南永州人, 博士, 讲师, 主要从事环境功能微生物及功能产物的研究, E-mail: tangbl@huas.edu.cn; \* 通信作者: 何海伦(1976—), 女, 湖南长沙人, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物酶结构和功能及生物资源酶解利用的相关研究, Tel: 0731-82650230, E-mail: helenhe@csu.edu.cn。

tivities. The optimal enzyme production conditions of strain WML1 were as follows: 25 mL medium containing 0.4% soybean powder, 0.20% galactose, 0.03%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.07%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.002%  $\text{FeSO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001%  $\text{ZnSO}_4$ , 0.60% colloidal chitin in a 250 mL flask, with the initial pH of 9.5, 5.0% inoculum size and culture temperature of 37 °C. Under the optimized conditions, the chitinase activity reached  $(2.72 \pm 0.09)$  U/mL. In conclusion, *Acinetobacter* sp. WML1 is generally safe in application, with only low toxicity that is preventable and controllable, and the enzyme activity could be about 4.61 times higher than that before optimization. The study provides a theoretical foundation for the industrial application of chitinase-producing bacteria. **Key words:** chitinase-producing bacterium; chitinase; *Acinetobacter* sp. WML1; biosafety; fermentation optimization

(*Life Science Research*, 2023, 27(4): 361–370)

几丁质是自然界中含量仅次于纤维素的可再生资源, 中国是几丁质的产量大国, 其相关产业正成长为一个重要的高分子产业。利用几丁质的一种方法是将其降解成低相对分子质量的产物。几丁质酶解法是一种最理想的降解几丁质的方法, 具有很多优点, 如生产工艺简单、反应条件温和、降解产物容易控制、产物活性高、无污染等<sup>[1]</sup>。此外, 几丁质酶在生物农药、食品及保健品、医药制品、环境废弃物管理等生物技术领域也具有广泛的应用<sup>[2-4]</sup>。细菌是自然界中几丁质的主要降解者, 也是几丁质酶研究最多的来源之一。微生物胞外酶具有来源广、可分泌到胞外、生产周期短、易发酵、易提取、操作性强、经济效益好等优点, 在医学、食品、化工和饲料等领域具有广阔的应用前景和现实意义<sup>[5-6]</sup>。目前, 已经发现的产几丁质酶的细菌种类很多, 其中比较常见的有气单胞菌属、沙雷氏菌属、弧菌属和芽孢杆菌属<sup>[7-8]</sup>。有研究表明, 在将废弃的粗制蟹壳转化为 *N*-乙酰葡萄糖胺时, 来自枯草芽孢杆菌的几丁质酶优于作为商业化产品的灰色链霉菌的几丁质酶, 转化率可达 60%<sup>[9]</sup>。此外, 有研究者通过优化菌株发酵生产几丁质酶的工艺来制备几丁寡糖或几丁单糖<sup>[10-11]</sup>。然而, 绝大部分细菌产几丁质酶的能力不够理想, 这使得产业化的几丁质酶价格昂贵, 难以实现商业应用。因此, 对不同环境来源的产几丁质酶菌株的研究, 可为产几丁质酶微生物资源的开发和应用提供基础。

不动杆菌属(*Acinetobacter*)菌株较为常见, 目前已有关于该属菌株产几丁质水解酶的报道。例如: 顾张慧等<sup>[12]</sup>从海泥中筛选得到了产几丁质脱乙酰酶细菌 MCDA01, 经单因素和正交试验优化其发酵条件后, 所产几丁质脱乙酰酶的活性提高了 4.14 倍, 具有工业应用潜力; Kim 等<sup>[13]</sup>从犊牛粪

便中分离的新型产几丁质酶不动杆菌 HANDI 309 可以在短时间内不经过任何预处理而实现几丁质酶的工业化生产, 在食品和制药行业具有潜在的应用价值。但到目前为止, 分离自淡水湖渔场沉积物的产几丁质酶的不动杆菌尚未见报道。此外, 需要注意的是, 细菌在应用过程中可能会存在一定的安全风险, 如某饲料添加剂中的蜡状芽孢杆菌因携带含四环素耐药基因(*tetracycline resistance gene B, tetB*)的质粒, 存在潜在的安全风险, 从而被停用<sup>[14]</sup>。由此可见, 为更好地实现产酶菌株的大规模生产和商业应用, 在通过发酵优化提高产酶量之前, 有必要对产酶菌株进行生物安全性分析。

本研究首先对分离自天津市西湖渔场沉积物中的产几丁质酶菌株 *Acinetobacter* sp. WML1 (16S *rRNA* 基因序列号为 OM959512, 与其系统发育关系最密切的有效命名的典型菌株 *A. tandoii* DSM 14970<sup>T</sup> 的 16S *rRNA* 基因序列的相似性为 98.81%) 的耐药性、溶血性、氨基酸脱羧酶活性和硝酸还原酶活性进行测定, 从耐药性和有害代谢产物两方面来评估菌株 WML1 的生物安全性, 为菌株的安全使用提供参考和保障, 随后采用单因素和正交试验法对菌株 WML1 产酶的发酵条件进行优化, 为产几丁质酶菌株的工业化应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

菌株 WML1 分离自淡水湖渔场天津市西湖渔场沉积物, 由湖南文理学院生命与环境科学学院环洞庭湖水产健康养殖及加工湖南省重点实验室分离并保存。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

实验使用的试剂主要有: 几丁质、*N*-乙酰葡

糖胺、L-赖氨酸、L-精氨酸、L-鸟氨酸(上海麦克林生化科技有限公司), 抗菌药物药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司), 血琼脂平板培养基(江门市凯林贸易有限公司), 硝酸还原酶活性测定试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司)。其他试剂均为分析纯。DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)试剂按照文献[15]配制。实验用到的仪器主要有: Hirayama 灭菌器(HVE-50, 日本 Hirayama 公司), 真空冷冻干燥机(LC-18N-50A, 上海力辰邦西仪器科技有限公司), 超净工作台[SW-CJ-1F (D), 苏州真田洁净设备有限公司], 生化培养箱(SPX-250, 北京中兴伟业仪器有限公司), 恒温振荡器(THZ-98C, 上海一恒科学仪器有限公司), 台式冷冻离心机(Centrifuge 5417R, 德国 Eppendorf 公司), 酶标仪(SN: 1807235, 美国 BioTek 仪器有限公司), HH 恒温水浴锅(KW-1000DC, 金坛市中大仪器厂), pH 计(S229, 美国梅特勒-托利多仪器有限公司)。

### 1.1.3 胶体几丁质的制备

按照如下步骤制备胶体几丁质。将 10 g 几丁质加入 200 mL 浓盐酸中, 充分溶解。28 °C、180 r/min 振荡约 1.5 h。将红棕色溶液加入 2.5 L 冷蒸馏水中, 快速混匀, 4 °C 静置过夜。4 °C、5 000 r/min 离心 20 min 收集胶体几丁质, 并用冷蒸馏水反复清洗, 直至 pH 值大于 5.0。用 200 mL 蒸馏水重悬沉淀, 制成胶体几丁质溶液, 4 °C 保存。使用真空冷冻干燥机通过干重法测定胶体几丁质含量(质量体积分数)。

### 1.1.4 培养基的制备

卢里亚-贝尔塔尼(Luria-Bertani, LB)液体/固体培养基按照文献[16]配制。氨基酸脱羧酶测定培养基按照文献[17]配制。胶体几丁质发酵培养基(质量体积分数, g/mL): 0.2%蛋白胨、0.1%葡萄糖、0.2%酵母粉、0.03%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.07%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.002%  $\text{FeSO}_4$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.001%  $\text{ZnSO}_4$ 、0.30%胶体几丁质, 蒸馏水配制, pH 7.5, 115 °C 高压蒸气灭菌 30 min。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 菌株安全性评价

采用常规纸片扩散法(Kirby-Bauer 法, K-B 法)<sup>[18]</sup>进行抗生素敏感性实验, 具体方法参考文献[19]。通过四区划线法于血琼脂平板上划出目标菌株的单菌落, 于 28 °C 培养 2 d, 观察菌株周围有无透明溶血环, 结果参照 Luis-Villaseñor 等<sup>[20]</sup>的方法判定。氨基酸脱羧酶活性测定实验和硝酸

还原酶活性测定实验参考文献[19]进行。

### 1.2.2 几丁质酶活性的测定

分别取 4  $\mu\text{mol/mL}$  *N*-乙酰葡萄糖胺溶液 0、66  $\mu\text{L}$ 、132  $\mu\text{L}$ 、198  $\mu\text{L}$ 、264  $\mu\text{L}$ 、330  $\mu\text{L}$ 、396  $\mu\text{L}$ 、462  $\mu\text{L}$ 、528  $\mu\text{L}$ 、594  $\mu\text{L}$ 、660  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管中, 用蒸馏水补足至 660  $\mu\text{L}$ 。分别加入 300  $\mu\text{L}$  DNS 试剂, 混匀, 于 100 °C 水浴锅中水浴 10 min, 室温冷却 5 min 后, 13 000 r/min 离心 5 min, 取 200  $\mu\text{L}$  上清测定 550 nm 处的吸光度( $\text{OD}_{550\text{nm}}$ )。以 *N*-乙酰葡萄糖胺浓度为横坐标,  $\text{OD}_{550\text{nm}}$  值为纵坐标, 绘制标准曲线。

取培养 3 d 的发酵液于 2 mL 离心管中, 13 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 取上清, 采用 DNS 法进行几丁质酶活性测定。在 660  $\mu\text{L}$  溶液中加入 1.00% (质量体积分数, g/mL) 胶体几丁质, 混匀后于 28 °C、180 r/min 条件下反应 4 h。随后, 按照与绘制标准曲线相同的步骤进行显色并测定  $\text{OD}_{550\text{nm}}$ 。酶活单位(U)定义为在一定条件下, 每小时催化产生 1  $\mu\text{mol}$  还原糖所需的酶量(mL)。

### 1.2.3 菌株产酶条件的优化

#### 1.2.3.1 培养基成分的优化

采用单因素试验法进行无机盐组分(胶体几丁质发酵培养基组、无磷酸盐组、无硫酸盐组和无无机盐组)、碳源(以蔗糖、甘露糖、半乳糖或可溶性淀粉替代葡萄糖)和氮源(以  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、黄豆粉或鱼粉替代蛋白胨和酵母粉)的优化。在单因素试验的基础上, 采用  $L_{16}(4^5)$  正交表设计 3 因素 4 水平正交试验, 对碳源、氮源及胶体几丁质的含量进行优化, 正交试验的因素和水平见表 1。培养条件为 28 °C、180 r/min, 250 mL 三角瓶的装液量为 50 mL, 接种量为 1.0% (体积分数, mL/mL)。

#### 1.2.3.2 培养条件的优化

采用单因素试验法进行初始 pH (7.5、8.5、9.5、10.5)、培养温度(20 °C、24 °C、28 °C、32 °C、36 °C)、装液量(10 mL、25 mL、50 mL、100 mL、150 mL, 采用 250 mL 容量瓶)和接种量(0.5%、1.0%、3.0%、5.0%、10.0%、15.0%、20.0%) (体积分数, mL/mL) 的优化。在单因素试验的基础上, 采用  $L_{16}(4^4)$  正交表设计 4 因素 4 水平正交试验, 对不同培养条件的组合进行优化, 正交试验的因素和水平见表 2。

### 1.2.4 数据统计分析

所有数据用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。多组间比较采用 SPSS Statistics 17.0 软件进行单因素方差分析, 显著水平为  $P<0.05$ 。采用 Excel 软件进行

表1 培养基成分含量正交试验的因素及水平表  
Table 1 Factors and levels in orthogonal experiment for optimizing contents of medium components

Level	Factor		
	A Soybean powder/(%)	B Galactose/(%)	C Colloidal chitin/(%)
1	0.2	0.05	0.05
2	0.4	0.10	0.10
3	2.0	0.20	0.30
4	4.0	0.40	0.60

表2 培养条件正交试验的因素及水平表  
Table 2 Factors and levels in orthogonal experiment for optimizing culture conditions

Level	Factor			
	A Initial pH	B Temperature/°C	C Liquid medium volume/mL	D Inoculation quantity/(%)
1	8.0	15	25	0.1
2	8.5	20	50	0.5
3	9.0	28	100	5.0
4	9.5	37	150	10.0

正交试验结果分析, 极显著水平为  $P < 0.01$ 。采用 Origin 2021 及 Adobe Illustrator CS5 软件制图。

## 2 结果

### 2.1 几丁质降解菌 *Acinetobacter* sp. WML1 的生物安全性

#### 2.1.1 几丁质降解菌 *Acinetobacter* sp. WML1 的耐药性

采用 5 大类 20 种药敏纸片对菌株 WML1 进行抗生素敏感性试验, 结果如表 3 所示。对于青霉素类抗生素, 菌株 WML1 对羧苄西林和哌拉西林表现出敏感, 对氨苄西林表现出中度敏感, 对青霉素和苯唑西林表现出耐药; 对于头孢菌素类抗生素, 菌株 WML1 对头孢氨苄和头孢拉定表现出敏感, 对头孢他啶、头孢曲松和头孢哌酮表现出中度敏感, 对头孢唑啉和头孢呋辛表现出耐药; 对于氨基糖苷类抗生素和四环素类抗生素, 菌株 WML1 对阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、四环素、米诺环素和多西环素均表现出敏感; 对于大环内酯类抗生素, 菌株 WML1 对红霉素表现出耐药。上述结果表明, 菌株 WML1 对多种抗生素敏感, 容易防控, 耐药性转移的潜在风险较低。

#### 2.1.2 几丁质降解菌 *Acinetobacter* sp. WML1 的有害代谢产物

溶血素是一类作用于细胞膜, 能够使细胞膜结构和功能发生紊乱、细胞内容物外泄、细胞死亡的蛋白毒素<sup>[21]</sup>。采用血琼脂平板划线法检测菌株 WML1 的溶血性, 结果如图 1 所示。由图 1 可知,

28 °C 培养 2 d 后, 菌株 WML1 菌落周围没有产生透明溶血环, 无溶血现象, 呈  $\gamma$ -溶血。结果表明菌株 WML1 不产生溶血素, 没有溶血性, 为溶血安全菌株。

生物胺主要由微生物分泌的氨基酸脱羧酶催化游离氨基酸形成, 是世界范围内公认的影响人体健康的物质<sup>[22-23]</sup>。菌株 WML1 的氨基酸脱羧酶活性测定结果如图 2 所示, 无氨基酸无菌组呈蓝紫色, 无氨基酸组呈黄色, L-赖氨酸组和 L-鸟氨酸组在液面表层有少量淡蓝色, L-精氨酸组呈蓝紫色, 表明菌株 WML1 有精氨酸脱羧酶活性及微弱的赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶活性。因此, 在发酵生产中应注意避免菌株 WML1 将氨基酸转化为有毒的生物胺, 以免引起安全问题。



图1 *Acinetobacter* sp. WML1 溶血性检测结果  
Fig.1 Hemolytic results of *Acinetobacter* sp. WML1

具有硝酸还原酶活性的菌株, 能将硝酸盐还原成亚硝酸盐, 进而产生肠毒素和致癌物质,

表 3 *Acinetobacter* sp. WML1 抗生素敏感性试验结果  
Table 3 Antibiotic sensitivity test results of *Acinetobacter* sp. WML1

Type of antibiotic	Antibiotic	Drug content	Criterion of inhibition zone diameter/mm			Inhibition zone diameter/mm	Sensitivity
			Resistant	Intermediary	Sensitive		
Penicillines	Penicillin	10 U/pill	≤19	20~27	≥28	11.67±0.76	R
	Ampicillin	10 μg/pill	≤13	14~16	≥17	13.50±0.25	I
	Carbenicillin	100 μg/pill	≤19	20~22	≥23	23.67±0.29	S
	Oxacillin	1 μg/pill	≤10	11~12	≥13	6.00±0	R
Cephalosporins	Piperacillin	100 μg/pill	≤17	18~20	≥21	20.75±0.25	S
	Cefalexin	30 μg/pill	≤14	15~17	≥18	18.08±0.76	S
	Cefazolin	30 μg/pill	≤14	15~17	≥18	10.75±1.09	R
	Cefuroxime	30 μg/pill	≤14	15~17	≥18	14.42±2.13	R
	Ceftazidime	30 μg/pill	≤14	15~17	≥18	16.33±0.88	I
	Ceftriaxone	30 μg/pill	≤13	14~20	≥21	17.75±0.90	I
	Cefoperazone	75 μg/pill	≤15	16~20	≥21	19.42±0.38	I
Aminoglycosides	Cefradine	30 μg/pill	≤14	15~17	≥18	18.92±0.76	S
	Amikacin	30 μg/pill	≤14	15~16	≥17	19.92±1.01	S
	Gentamicin	10 μg/pill	≤12	13~14	≥15	19.50±0	S
	Kanamycin	30 μg/pill	≤13	14~17	≥18	19.50±0.43	S
Tetracyclines	Neomycin	30 μg/pill	≤12	13~16	≥17	16.67±0.95	S
	Tetracycline	30 μg/pill	≤14	15~18	≥19	22.00±1.50	S
	Minocycline	30 μg/pill	≤14	15~18	≥19	26.25±1.15	S
Macrolides	Doxycycline	30 μg/pill	≤12	13~15	≥16	23.67±0.88	S
	Erythromycin	15 μg/pill	≤13	14~22	≥23	12.92±1.26	R

注: R, 耐药; I, 中度敏感; S, 敏感。

Notes: R, resistant; I, intermediary; S, sensitive.

危害健康<sup>[24]</sup>。菌株 WML1 的硝酸还原酶活性为  $(0.01±0.05) \mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ , 数值约等于 0, 且实验组吸光度值与对照组吸光度值相等, 表明菌株 WML1 是不具有硝酸还原酶活性的安全菌株。

以上生物安全性实验结果显示, 菌株 WML1 对多种抗生素敏感, 无溶血性, 无硝酸还原酶活性, 有精氨酸脱羧酶活性及微弱的赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶活性。这表明菌株 WML1 引发耐药性转移的安全风险较低, 可防可控, 不具有引发败血症和产生亚硝酸盐的隐患, 是安全性较高的菌株, 可以将其应用于发酵产酶。对于菌株 WML1 所具

有的氨基酸脱羧酶活性, 可在其应用时对 pH 进行调节, 避免菌株处于酸性环境, 并保证通氧量, 防止氨基酸分解生成生物胺。

## 2.2 几丁质降解菌 *Acinetobacter* sp. WML1 产酶培养基成分的优化

### 2.2.1 单因素试验法分析培养基成分对菌株产酶的影响

由图 3A 可知, 菌株 WML1 发酵产酶培养基的最佳无机盐组分为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{ZnSO}_4$ , 用该组培养基培养菌株 3 d 后上清液酶活最高, 为  $(0.400±0.002) \text{U}/\text{mL}$ 。由图

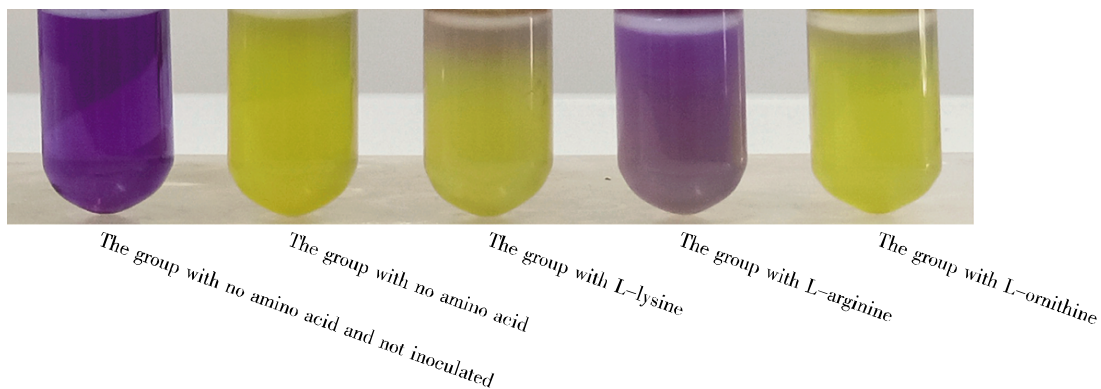


图 2 *Acinetobacter* sp. WML1 氨基酸脱羧酶活性测定结果

Fig.2 The results of amino acid decarboxylase activity of *Acinetobacter* sp. WML1

3B可知,菌株WML1发酵产酶培养基的最佳碳源为半乳糖,用该组培养基培养菌株3d后上清液酶活最高,为 $(0.44\pm 0.05)$  U/mL。由图3C可知,菌株WML1培养3d后上清液酶活最高的组是以蛋白胨和酵母粉为氮源的组,酶活为 $(0.54\pm 0.02)$  U/mL;其次是以黄豆粉为氮源的组,酶活为 $(0.51\pm 0.02)$  U/mL。考虑到两组酶活相近,且黄豆粉的价格比蛋白胨和酵母粉的价格低很多,因此从成本和效益上综合考虑,最终选择黄豆粉为该菌株发酵产酶的最佳氮源。

### 2.2.2 正交试验法分析培养基成分含量对菌株产酶的影响

采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表研究3因素4水平对菌株WML1几丁质酶产量的影响,实验方案与结果见表4和表5。方差分析结果表明,黄豆粉含量(A因素)、半乳糖含量(B因素)和胶体几丁质含量(C因素)对菌株发酵产酶均具有显著性影响,主次顺序为C、B、A。各效应显著性测验结果见表6,黄豆粉含量(A因素)4个水平处理的差异显著,以 $A_2$ 水平产酶量最高;半乳糖含量(B因素)4个水平处理的差异显著,以 $B_3$ 水平产酶量最高;胶体几丁质含量(C因素)4个水平处理的差异显著,以 $C_4$ 水平产酶量最高。综上所述,该正交试验获得的最优方案为 $A_2B_3C_4$ 。因此,选择黄豆粉0.4%、半乳糖0.20%、胶体几丁质0.60%作为发酵产酶的最优组合,并用此方案进行后续发酵产酶培养条件的优化。

## 2.3 几丁质降解菌 *Acinetobacter* sp. WML1 产酶培养条件的优化

### 2.3.1 单因素试验法分析培养条件对菌株产酶的影响

由图4A可知,当初始pH为9.5时,上清液酶活最高,为 $(1.37\pm 0.04)$  U/mL。由图4B可知,当培养温度为28℃时,上清液酶活最高,为 $(1.97\pm 0.07)$  U/mL。由图4C可知,当装液量为100 mL时,上清液酶活最高,为 $(3.52\pm 0.01)$  U/mL。由图4D可知,当菌株WML1的接种量为0.5% (体积分数, mL/mL)时,上清液酶活最高,为 $(2.43\pm 0.17)$  U/mL。

### 2.3.2 正交试验法分析培养条件对菌株产酶的影响

采用 $L_{16}(4^5)$ 正交表进一步研究各培养条件组合对菌株WML1几丁质酶产量的影响,实验方案与结果见表7和表8。方差分析结果表明,初始pH(A因素)、温度(B因素)、装液量(C因素)和接种量(D因素)对菌株发酵产酶均具有显著性影响,主次顺序为C、A、D、B。各效应显著性测验结果见表9,初始pH(A因素)4个水平处理的差异显著,以 $A_4$ 水平产酶量最高;温度(B因素)4个水平处理的差异显著,以 $B_1$ 水平产酶量最高;装液量(C因素)4个水平处理的差异显著,以 $C_1$ 水平产酶量最高;接种量(D因素)4个水平处理的差异显著,以 $D_1$ 水平产酶量最高。综上所述,该正交试验获得的最优方案为 $A_4B_1C_1D_1$ 。因此,初始pH 9.5、温

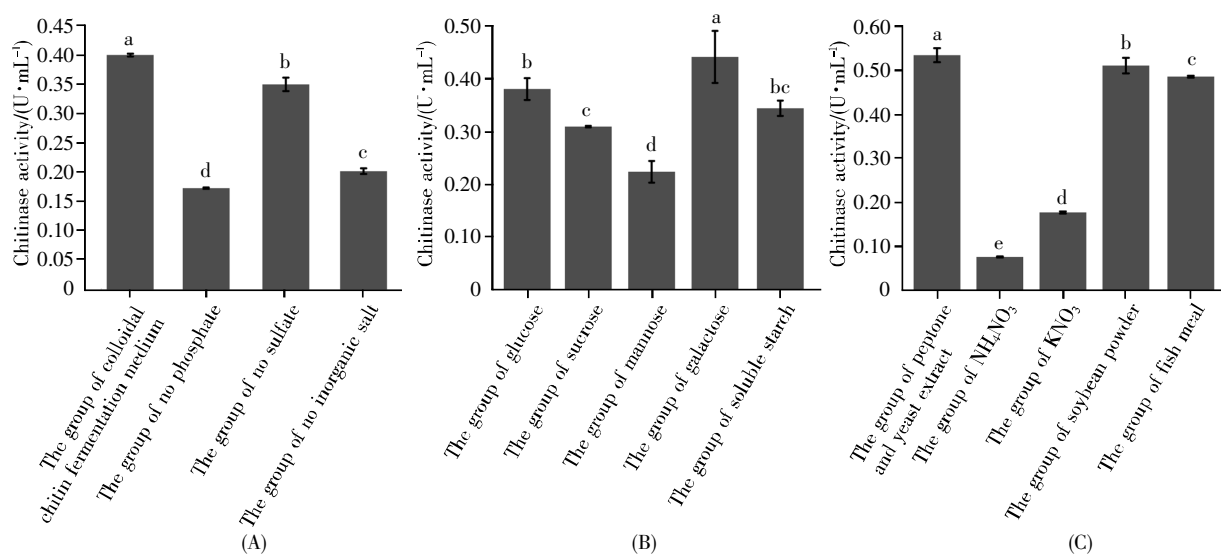


图3 培养基成分对菌株WML1发酵产酶的影响

(A) 不同无机盐组分; (B) 不同碳源; (C) 不同氮源。不同小写字母表示差异具有显著性( $P < 0.05$ ), 下同。

Fig.3 The influence of medium components on chitinase production by the strain WML1

(A) Different inorganic salt components; (B) Different carbon sources; (C) Different nitrogen sources. Different lowercase letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ). The same below.

表 4 培养基成分含量的  $L_{16}(4^5)$  正交试验表头设计和结果  
 Table 4  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experiment table head design and results of medium component contents

No.	A	B	C	Enzyme activity/(U·mL <sup>-1</sup> )			Mean/(U·mL <sup>-1</sup> )
				I	II	III	
1	1	1	1	0.25	0.25	0.25	0.25
2	1	2	2	0.37	0.41	0.39	0.39
3	1	3	3	0.63	0.65	0.66	0.65
4	1	4	4	1.20	1.23	1.22	1.22
5	2	1	2	0.42	0.48	0.52	0.47
6	2	2	1	0.29	0.31	0.30	0.30
7	2	3	4	1.75	1.85	1.84	1.81
8	2	4	3	0.73	0.77	0.74	0.74
9	3	1	3	0.37	0.37	0.34	0.36
10	3	2	4	0.46	0.45	0.42	0.44
11	3	3	1	0.29	0.29	0.27	0.28
12	3	4	2	0.55	0.57	0.54	0.55
13	4	1	4	0.30	0.27	0.24	0.27
14	4	2	3	0.25	0.24	0.23	0.24
15	4	3	2	0.35	0.35	0.35	0.35
16	4	4	1	0.38	0.39	0.39	0.39

表 5 培养基成分含量的方差分析结果  
 Table 5 Variance analysis results of medium component contents

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	P value
Randomized blocks	2	0.002 7	0.001 4	2.8	7.67E-02
Treatment combination	15	7.895 6			
Soybean powder	3	1.948 1	0.649 4	1 298.8**	0.79E-31
Galactose	3	2.018 6	0.672 9	1 345.8**	0.46E-31
Colloidal chitin	3	2.678 5	0.892 8	1 785.6**	0.69E-33
Blank column	6	1.250 5	0.416 9	833.8**	0.57E-31
Error	30	0.015 5	0.000 5		
Total	47	7.913 8			

注: \*\* 表示差异极显著( $P<0.01$ )。

Notes: \*\* means extremely significant difference ( $P<0.01$ ).

表 6 培养基成分含量的新复极差法多重比较  
 Table 6 Duncan's new multiple range test for multiple comparison in medium component contents

Treatment	Mean	Significant difference	
		5%	1%
A <sub>2</sub>	0.83	a	A
A <sub>1</sub>	0.63	b	B
A <sub>3</sub>	0.41	c	C
A <sub>4</sub>	0.31	d	D
B <sub>3</sub>	0.77	a	A
B <sub>4</sub>	0.73	b	B
B <sub>2</sub>	0.34	c	C
B <sub>1</sub>	0.34	c	C
C <sub>4</sub>	0.94	a	A
C <sub>3</sub>	0.50	b	B
C <sub>2</sub>	0.44	c	C
C <sub>1</sub>	0.31	d	D

度 15 ℃、装液量 25 mL (250 mL 容量瓶)、接种量 0.1% (体积分数, mL/mL) 是由正交试验推导出的发酵产酶的最优培养条件。

由于推导出的最优方案 A<sub>4</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub> 不在表 7 的

16 个处理组中, 因此为验证推导出的最优培养条件是否为实际最优培养条件, 并比较优化前后酶活的变化情况, 分别用优化前的培养基和培养条件、优化后的培养基和推导出的最优培养条件以

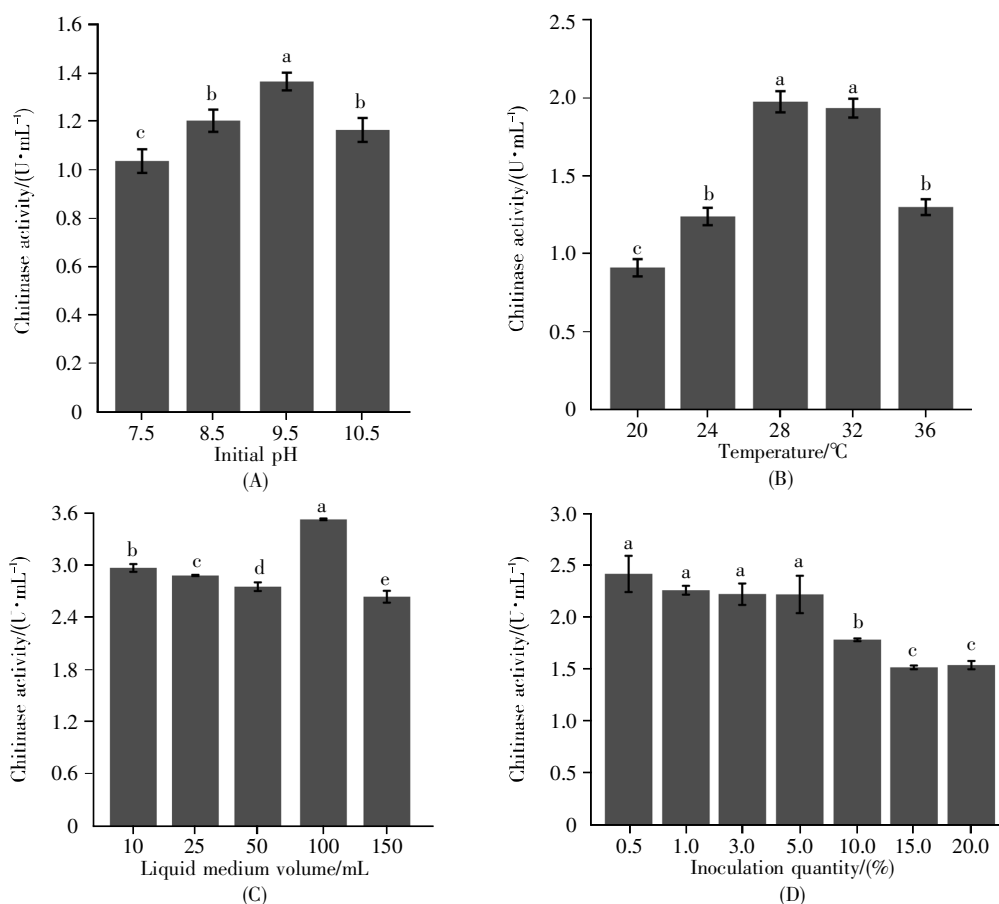


图4 培养条件对菌株 WML1 发酵产酶的影响

(A) 不同初始 pH; (B) 不同培养温度; (C) 不同装液量(采用 250 mL 容量瓶); (D) 不同接种量。

**Fig.4 The influence of culture conditions on chitinase production by the strain WML1**

(A) Different initial pH values; (B) Different culture temperatures; (C) Different liquid medium volumes (used 250 mL flasks); (D) Different inoculation quantities.

及优化后的培养基和 16 号处理组的培养条件对菌株 WML1 进行产酶发酵。结果如图 5 所示,在优化后的培养基和 16 号处理组的培养条件下菌株 WML1 所产几丁质酶的活性最高,为(2.72±0.09) U/mL,约为优化前的 4.61 倍。

### 3 讨论

生物技术产业不仅要求优质新型的微生物资源,而且也需要微生物的安全性和产能潜力得到应有的保证与挖掘。本研究首先对菌株 WML1 的耐药性及有害代谢产物进行了测定,结果表明菌株 WML1 仅对少数几种抗生素耐药,无溶血性,无硝酸还原酶活性,有精氨酸脱羧酶活性及微弱的赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶活性。总体上,菌株 WML1 危害性较小,可以将其应用于发酵产酶。氨基酸脱羧酶能够将氨基酸脱羧还原成生物胺,造成安全隐患。但是该还原反应需要酸性条件,并且氨基酸的分解需要在厌氧条件下进行。因此,

对于菌株 WML1 所具有的氨基酸脱羧酶活性,可通过溶液 pH 的调节,避免菌株处于酸性环境,并保证通氧量,从而防止氨基酸分解生成生物胺。菌株 WML1 的生物安全性分析结果为其安全使用提供了参考和保障。基于此,本研究进一步对其发酵产酶条件进行了优化。结果显示,胶体几丁质含量和装液量是影响酶产量的两大因素,说明菌株 WML1 产几丁质酶需要底物诱导,且对溶氧量有一定的要求。经单因素和正交试验优化后,菌株 WML1 的最优产酶条件为: 0.4% 黄豆粉、0.20% 半乳糖、0.03%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.07%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.002%  $\text{FeSO}_4$ 、0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.001%  $\text{ZnSO}_4$ 、0.60% 胶体几丁质、pH 9.5、5.0% (体积分数, mL/mL) 接种量、25 mL 的装液量(对应 250 mL 容量瓶)、37 °C 的培养温度。最优条件下的几丁质酶活性为(2.72±0.09) U/mL,约为优化前的 4.61 倍。与其他研究相比,从淡水湖渔场沉积物中筛选得到的不动杆菌 WML1 的产酶量一般,例如:张瑶心等<sup>[25]</sup>对从湖北武汉地区

表 7 培养条件的  $L_{16}(4^5)$  正交试验表头设计和结果  
 Table 7  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experiment table head design and results of culture conditions

No.	A	B	C	D	Enzyme activity/(U·mL <sup>-1</sup> )			Mean/(U·mL <sup>-1</sup> )
					I	II	III	
1	1	1	1	1	1.22	1.52	1.50	1.41
2	1	2	2	2	0.86	0.88	0.93	0.89
3	1	3	3	3	0.46	0.49	0.50	0.49
4	1	4	4	4	0.29	0.32	0.38	0.33
5	2	1	2	3	0.66	0.69	0.69	0.68
6	2	2	1	4	0.72	0.77	0.77	0.75
7	2	3	4	1	0.60	0.63	0.63	0.62
8	2	4	3	2	0.41	0.42	0.47	0.43
9	3	1	3	4	0.68	0.76	0.79	0.75
10	3	2	4	3	0.56	0.60	0.59	0.58
11	3	3	1	2	0.82	0.89	0.92	0.88
12	3	4	2	1	0.55	0.58	0.58	0.57
13	4	1	4	2	0.76	0.81	0.81	0.79
14	4	2	3	1	0.89	0.93	0.94	0.92
15	4	3	2	4	0.82	0.86	0.86	0.85
16	4	4	1	3	1.64	1.73	1.75	1.71

表 8 培养条件的方差分析结果  
 Table 8 Variance analysis results of culture conditions

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	P value
Randomized blocks	2	0.048 0	0.024 0	16.0**	0.19E-04
Treatment combination	15	5.504 8			
Initial pH	3	1.372 1	0.457 4	304.9**	0.15E-21
Temperature	3	0.259 9	0.086 6	57.8**	0.14E-11
Liquid medium volume	3	2.691 7	0.897 2	598.2**	0.77E-26
Inoculation quantity	3	0.362 0	0.120 7	80.4**	0.19E-13
Blank column	3	0.819 0	0.273 0	182.0**	0.25E-18
Error	30	0.045 0	0.001 5		
Total	47	5.597 9			

注: \*\* 表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

Notes: \*\* means extremely significant difference ( $P < 0.01$ ).

表 9 培养条件的新复极差法多重比较  
 Table 9 Duncan's new multiple range test for multiple comparison in culture conditions

Treatment	Mean	Significant difference	
		5%	1%
A <sub>4</sub>	1.07	a	A
A <sub>1</sub>	0.78	b	B
A <sub>3</sub>	0.69	c	C
A <sub>2</sub>	0.62	d	D
B <sub>1</sub>	0.91	a	A
B <sub>2</sub>	0.79	b	B
B <sub>4</sub>	0.76	b	B
B <sub>3</sub>	0.71	c	C
C <sub>1</sub>	1.19	a	A
C <sub>2</sub>	0.75	b	B
C <sub>3</sub>	0.65	c	C
C <sub>4</sub>	0.58	d	D
D <sub>1</sub>	0.88	a	A
D <sub>3</sub>	0.86	a	A
D <sub>2</sub>	0.75	b	B
D <sub>4</sub>	0.67	c	C

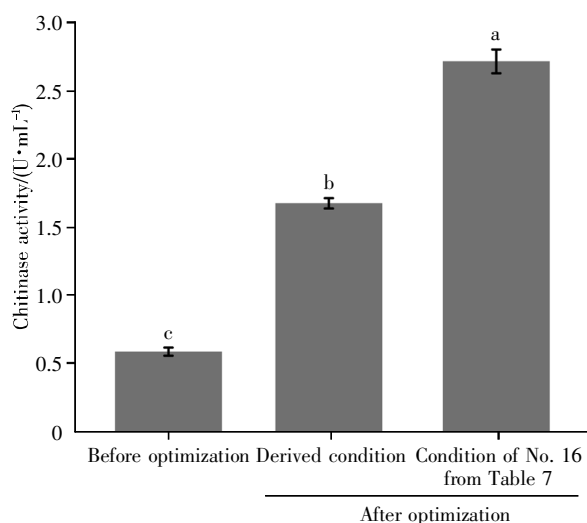


图5 优化前后菌株 WML1 发酵产酶情况

Fig.5 The chitinase production by the strain WML1 before and after optimization

虾壳堆积土壤中分离得到的产几丁质酶无色杆菌 ZW8 的发酵条件进行优化后,其所产酶的活性提升为 2.04 U/mL,是优化前的 8 倍;李静等<sup>[26]</sup>对从土壤中分离得到的产几丁质酶放线菌 L12 的发酵条件进行优化后,其所产酶的活性提升为 63.60 U/mL,是优化前的 1.68 倍;Meriem 等<sup>[27]</sup>对从阿尔及利亚半干旱土壤中分离的产几丁质酶链霉菌 C9 进行发酵条件优化后,其所产酶的活性提升为 91.80 U/mL,是优化前的 26.38 倍。尽管如此,针对不同环境中的产几丁质酶菌株的研究,有助于挖掘产几丁质酶菌株的生物资源。此外,黄豆粉是一种工业副产品,产量多、价格低廉且营养较为丰富,利用其作为氮源可在获得有益产物的同时降低生产成本。相比于其他研究利用蛋白胨<sup>[12]</sup>、NH<sub>4</sub>Cl<sup>[25]</sup>、玉米浆和 NaNO<sub>3</sub><sup>[26]</sup>以及酵母膏<sup>[27]</sup>作为氮源,本研究利用黄豆粉作为发酵培养基中的氮源具有很大的优势。

#### 参考文献(References):

- [1] JUNG W J, PARK R D. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(11): 5328–5356.
- [2] DI ROSA M, DISTEFANO G, ZORENA K, *et al.* Chitinases and immunity: ancestral molecules with new functions[J]. *Immunobiology*, 2016, 221(3): 399–411.
- [3] RATHORE A S, GUPTA R D. Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives[J]. *Enzyme Research*, 2015, 2015: 791907.
- [4] BERINI F, KATZ C, GRUZDEV N, *et al.* Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(3): 818–838.
- [5] 张新军, 范丽卿, 岳海梅, 等. 几丁质酶产生菌发酵条件初步研究[J]. *中国农学通报*(ZHANG Xinjun, FAN Liqing, YUE Hai-mei, *et al.* The initial study on chitinase producing strain fer-

- mentation conditions[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(24): 42–46.
- [6] 王学川, 王雪莹, 杨淑琴, 等. 微生物胶原酶研究进展[J]. *皮革科学与工程*(WANG Xuechuan, WANG Xueying, YANG Shu-qin, *et al.* A review: microbial collagenase[J]. *Leather Science and Engineering*), 2021, 31(2): 16–22, 27.
- [7] VELIZ E A, MARTÍNEZ-HIDALGO P, HIRSCH A M. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol[J]. *AIMS Microbiology*, 2017, 3(3): 689–705.
- [8] BHATTACHARYA D, NAGPURE A, GUPTA R K. Bacterial chitinases: properties and potential[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2007, 27(1): 21–28.
- [9] WANG D, LI A J, HAN H Y, *et al.* A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 116: 863–868.
- [10] SONGSIRIRITTHIGUL C, LAPBOONRUENG S, PECHSRIC-HUANG P, *et al.* Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(11): 4096–4103.
- [11] SURESH P V. Biodegradation of shrimp processing bio-waste and concomitant production of chitinase enzyme and *N*-acetyl-D-glucosamine by marine bacteria: production and process optimization[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(10): 2945–2962.
- [12] 顾张慧, 刘妹, 胡晟源, 等. 一株产几丁质脱乙酰酶海洋细菌的筛选、鉴定及发酵优化[J]. *食品工业科技*(GU Zhanghui, LIU Shu, HU Shengyuan, *et al.* Screening and identification of a marine bacteria producing chitin deacetylase and optimization of its fermentation conditions[J]. *Science and Technology of Food Industry*), 2017, 38(18): 129–134.
- [13] KIM T I, KI K S, LIM D H, *et al.* Novel *Acinetobacter parvus* HANDI 309 microbial biomass for the production of *N*-acetyl-β-D-glucosamine (GlcNAc) using swollen chitin substrate in submerged fermentation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 59.
- [14] ELSHAGHABEE F M F, ROKANA N, GULHANE R D, *et al.* *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1490.
- [15] WANG Q, LIU X H, FU J H, *et al.* Substrate sustained release-based high efficacy biosynthesis of GABA by *Lactobacillus brevis* NCL912[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17: 80.
- [16] DA SILVEIRA BEZERRA DE MELLO F, MANEIRA C, SUAREZ F U L, *et al.* Rational engineering of industrial *S. cerevisiae*: towards xylitol production from sugarcane straw[J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2022, 20: 80.
- [17] 卢士玲, 李文军, 李开雄. 发酵肉制品中优势菌酶学活性初探[J]. *肉类研究*(LU Shiling, LI Wenjun, LI Kaixiong. Preliminary study on enzymatic activity of dominant bacteria in fermented meat products[J]. *Meat Research*), 2006(1): 22–25.
- [18] ANDREWS J M. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 6)[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 60(1): 20–41.
- [19] 唐白露, 谭朵朵, 黎梦姣, 等. 淡水湖渔场沉积物中产胶原蛋白酶菌株的筛选及发酵优化[J]. *微生物学通报*(TANG Bailu, TAN Duoduo, LI Mengjiao, *et al.* Screening of a collagenase-producing strain from the sediments in fishing grounds of freshwater lakes and optimization of the fermentation conditions[J]. *Microbiology China*), 2022, 49(7): 2715–2729.
- [20] LUIS-VILLASEÑOR I E, MACÍAS-RODRÍGUEZ M E, GÓMEZ-GIL B, *et al.* Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2011, 321(1/2): 136–144.
- [21] 陈希, 索占伟, 许剑琴, 等. 细菌溶血素的分类及代表性溶血素研究进展[J]. *中国农学通报*(CHEN Xi, SUO Zhanwei, XU Jianqin, *et al.* Review on classification and representative species of hemolysin[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*), 2008, 24(8): 16–22.

- [15] VERMA R, SAHU R, SINGH D D, *et al.* A CRISPR/Cas9 based polymeric nanoparticles to treat/inhibit microbial infections[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2019, 96: 44–52.
- [16] LI L, WEI Y Q, GONG C Y. Polymeric nanocarriers for non-viral gene delivery[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2015, 11(5): 739–770.
- [17] LIU C Y, WAN T, WANG H, *et al.* A boronic acid-rich dendrimer with robust and unprecedented efficiency for cytosolic protein delivery and CRISPR–Cas9 gene editing[J]. *Science Advances*, 2019, 5(6): eaaw8922.
- [18] QIAO J, SUN W L, LIN S Y, *et al.* Cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for genome editing using chitosan-coated red fluorescent protein[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(32): 4707–4710.
- [19] ABOUREHAB M A S, PRAMANIK S, ABDELGAWAD M A, *et al.* Recent advances of chitosan formulations in biomedical applications[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(18): 10975.
- [20] LIU Q, ZHAO K, WANG C, *et al.* Multistage delivery nanoparticle facilitates efficient CRISPR/dCas9 activation and tumor growth suppression *in vivo*[J]. *Advanced Science*, 2018, 6(1): 1801423.
- [21] YOSHINAGA N, ZHOU J K, XU C, *et al.* Phenylboronic acid-functionalized polyplexes tailored to oral CRISPR delivery[J]. *Nano Letters*, 2023, 23(3): 757–764.
- [22] DUAN L, OUYANG K, XU X, *et al.* Nanoparticle delivery of CRISPR/Cas9 for genome editing[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 673286.
- [23] LEE B, LEE K, PANDA S, *et al.* Nanoparticle delivery of CRISPR into the brain rescues a mouse model of fragile X syndrome from exaggerated repetitive behaviours[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, 2(7): 497–507.
- [24] BERRY–KRAVIS E M, LINDEMANN L, JØNCH A E, *et al.* Drug development for neurodevelopmental disorders: lessons learned from fragile X syndrome[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018, 17(4): 280–299.
- [25] OSTEIKOETXEA X, SILVA A, LÁZARO–IBÁÑEZ E, *et al.* Engineered Cas9 extracellular vesicles as a novel gene editing tool[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2022, 11(5): e12225.
- [26] HORODECKA K, DÜCHLER M. CRISPR/Cas9: principle, applications, and delivery through extracellular vesicles[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 6072.
- [27] LUO N A, LI J B, CHEN Y F, *et al.* Hepatic stellate cell reprogramming via exosome-mediated CRISPR/dCas9–VP64 delivery[J]. *Drug Delivery*, 2021, 28(1): 10–18.
- [28] ROUATBI N, MCGLYNN T, AL–JAMAL K T. Pre-clinical non-viral vectors exploited for *in vivo* CRISPR/Cas9 gene editing: an overview[J]. *Biomaterials Science*, 2022, 10(13): 3410–3432.
- [29] YIP B H. Recent advances in CRISPR/Cas9 delivery strategies[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 839.
- [30] FINN J D, SMITH A R, PATEL M C, *et al.* A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent *in vivo* genome editing[J]. *Cell Reports*, 2018, 22(9): 2227–2235.
- [31] WANG X Y, ISHIDA T, KIWADA H. Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes[J]. *Journal of Controlled Release*, 2007, 119(2): 236–244.
- [32] VAN HAASTEREN J, LI J, SCHEIDELER O J, *et al.* The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 845–855.
- [33] XU Y X, LIU R F, DAI Z F. Key considerations in designing CRISPR/Cas9-carrying nanoparticles for therapeutic genome editing[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(41): 21001–21014.
- [34] WANG Y, XU S, XIONG W, *et al.* Nanogels fabricated from bovine serum albumin and chitosan via self-assembly for delivery of anticancer drug[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 146: 107–113.
- [35] LI L, HU S, CHEN X Y. Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: challenges and opportunities[J]. *Biomaterials*, 2018, 171: 207–218.
- [36] LIU Q, CHEN X M, JIA J L, *et al.* pH-responsive poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles with rapid antigen release behavior promote immune response[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(5): 4925–4938.
- [37] SHIRLEY J L, DE JONG Y P, TERHORST C, *et al.* Immune responses to viral gene therapy vectors[J]. *Molecular Therapy*, 2020, 28(3): 709–722.
- [38] BEHR M, ZHOU J, XU B, *et al.* *In vivo* delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and challenges[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, 11(8): 2150–2171.
- [39] DENG H Z, ZHAO X F, HE D X, *et al.* One-step gene delivery into the cytoplasm in a fusion-dependent manner based on a new membrane fusogenic lipid[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(46): 7406–7408.
- [40] JOHNSON L T, ZHANG D, ZHOU K J, *et al.* Lipid nanoparticle (LNP) chemistry can endow unique *in vivo* RNA delivery fates within the liver that alter therapeutic outcomes in a cancer model[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2022, 19(11): 3973–3986.
- [41] ZHANG R, EL–MAYTA R, MURDOCH T J, *et al.* Helper lipid structure influences protein adsorption and delivery of lipid nanoparticles to spleen and liver[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(4): 1449–1463.

## (上接第 370 页)

- [22] MAH J H, PARK Y K, JIN Y H, *et al.* Bacterial production and control of biogenic amines in Asian fermented soybean foods[J]. *Foods*, 2019, 8(2): 85.
- [23] TOFALO R, PERPETUINI G, SCHIRONE M, *et al.* Biogenic amines: toxicology and health effect[M]//CABALLERO B, FINGLAS P M, TOLDRÁ F. *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Academic Press, 2016: 424–429.
- [24] 凌宇恒. 饲用海洋动物源益生菌在幼鲍养殖中的初步应用研究[D]. 厦门: 厦门大学(LING Yuheng. Application of Feed Probiotics from Marine Animal for Juvenile Abalone Aquaculture[D]. Xiamen: Xiamen University), 2017.
- [25] 张瑶心, 王亮节, 郑文, 等. 产几丁质酶的无色杆菌 ZWW8 的发酵产酶及酶学性质研究[J]. *生物技术通报*(ZHANG Yaoxin, WANG Liangjie, ZHENG Wen, *et al.* Study on enzyme production of a chitinase-producing strain *Achromobacter* sp. ZWW8 by fermentation and its enzymatic characterization[J]. *Biotechnology Bulletin*), 2021, 37(4): 96–106.
- [26] 李静, 刘建军, 赵祥颖. 一株产几丁质酶菌株的筛选及其产酶条件的研究[J]. *工业微生物*(LI Jing, LIU Jianjun, ZHAO Xiangying. Screening of chitinase from strains and conditions for enzyme production[J]. *Industrial Microbiology*), 2007, 37(3): 44–47.
- [27] MERIEM G, MAHMOUD K. Optimization of chitinase production by a new *Streptomyces griseorubens* C9 isolate using response surface methodology[J]. *Annals of Microbiology*, 2017, 67(2): 175–183.