DOI:10.12441/spyswjs.20260204001 [文章编号] 1673-1689(2026)07-0057-11

几丁质酶基因 *chi6380* 的克隆、表达及酶学性质分析

韦玉玲[1,2] 张莉刚[1,2] 王传龙[1,2] 杨可欣[1,2] 欧 玲[1,2] 潘美仪[1,2] 张红岩[1,2] 申乃坤[1,2*]

(1. 广西民族大学海洋与生物技术学院,广西 南宁 530006; 2. 广西多糖材料与改性重点实验室,广西 南宁 530006)

摘要:【目的】探究几丁质酶在生物降解领域的应用潜力,挖掘新型高效的几丁质酶资源。**【方法】**利用原核表达系统对副地衣芽孢杆菌(*Bacillus paralicheniformis*)来源的几丁质酶基因 *chi6380* 进行克隆与异源表达;经镍柱亲和层析纯化后,对 Chi6380 的酶学性质、几丁质降解产物及抗真菌活性进行系统研究。**【结果】**作者成功在大肠杆菌 BL21(*Escherichia coli* BL21)中实现了重组几丁质酶 Chi6380 的异源表达。酶学性质研究结果表明,Chi6380 的最适反应温度为 50 ℃;最适反应 pH 为 5.0;该酶在 30~50 ℃、pH 4.0~9.0 条件下具有良好的稳定性;Mg^{2+}、Ca^{2+}等金属离子及二硫苏糖醇(DTT)等化学试剂均对 Chi6380 酶活力具有抑制作用。底物特异性分析显示,Chi6380 可水解多种类型的几丁质,其中胶体几丁质为最适底物,其水解产物主要为几丁二糖、几丁四糖和几丁六糖。抑菌试验结果表明,Chi6380 对烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)和新月弯孢霉(*Curvularia lunata*)均具有抑菌效果,抑菌率分别为(46.40±0.21)%和(30.53±0.38)%。**【结论】**该研究获得的几丁质酶 Chi6380 具有良好的几丁质降解能力与植物病原菌抑制活性,在几丁质资源生物转化及植物病原菌生物防治方面具有广阔的应用前景。

关键词:副地衣芽孢杆菌;几丁质酶;克隆表达;酶学性质;生物防治

Cloning, Expression, and Enzymatic Characterization of the Chitinase Gene *chi6380*

WEI Yuling[1,2] *ZHANG Ligang*[1,2] *WANG Chuanlong*[1,2] *YANG Kexin*[1,2] *OU Ling*[1,2]
PAN Meiyi[1,2] *ZHANG Hongyan*[1,2] *SHEN Naikun*[1,2*]

(1. School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi Minzu University, Nanning 530006, China; 2. Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modification, Nanning 530006, China)

Abstract: [**Objective**] This study explored the application potential of chitinase in biodegradation, aiming to mine new efficient chitinase resources. [**Method**] This study cloned and heterologously expressed the chitinase gene *chi6380* from *Bacillus paralicheniformis via* a prokaryotic expression system. After purification by Ni-NTA affinity chromatography, the enzymatic properties, chitin degradation products, and antifungal activity of Chi6380 were systematically investigated. [**Result**] The recombinant chitinase Chi6380 was successfully expressed in *Escherichia coli* BL21. Enzymatic characterization revealed that Chi6380 exhibited the optimal activity at 50 ℃ and pH 5.0, and maintained high stability within the ranges of 30~50 ℃ and pH 4.0~9.0. Common metal ions, such as Mg^{2+} and Ca^{2+}, along with chemical reagents including dithiothreitol (DTT), demonstrated inhibitory effects on the activity of Chi6380. Substrate specificity analysis revealed that Chi6380 exhibited hydrolytic activity against various chitin substrates, with colloidal chitin as the optimal substrate, and the main hydrolysis products were chitobiose, chitotetraose, and chitohexaose. Antimicrobial assays indicated that Chi6380 exhibited inhibitory effects against *Phytophthora nicotianae* and *Curvularia lunata*, with inhibition rates of (46.40±0.21)% and (30.53±0.38)%, respectively. [**Conclusion**] The chitinase Chi6380 obtained in this study exhibits good capacity of degrading chitin and activity of inhibiting plant pathogenic fungi, demonstrating

基金项目:广西重点研发计划项目(AB21196019);广西民族大学大学生创新创业训练计划(202310608017,S202510608309)。
通信作者:申乃坤(1980—),男,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事微生物资源收集与利用研究。E-mail:shennaik05@163.com
收稿日期:2026-02-04 **修回日期:**2026-03-30

promising potential for applications in the bioconversion of chitin waste and the biological control of plant pathogenic fungi.

Keywords: *Bacillus paralicheniformis*; chitinase; cloning and expression; enzymatic property; biological control

全球虾、蟹等甲壳类加工产业规模庞大，每年会产生大量壳体废弃物。2020年全球甲壳类水产品产量高达1.683亿t，对应产生的壳体废弃物为700万~900万t[1]。我国是甲壳类水产消费大国，《中国小龙虾消费趋势报告（2025）》显示，国内小龙虾年消费量已突破345万t[2]，结合小龙虾可食用占比测算，国内每年产生的小龙虾壳体废弃物约276万t，富含几丁质的废弃甲壳类资源十分丰富。几丁质是由*N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖（GlcNAc）单体通过*β*-1，4糖苷键缩合形成的线性多糖大分子，是节肢动物外骨骼、甲壳类壳体及真菌细胞壁的核心结构成分，同时也广泛分布于线虫卵壳等生物组织中[3]。由于几丁质在水、弱酸及弱碱体系中溶解性较差，且在甲壳结构中常与蛋白质及矿物质以共价或非共价方式紧密结合，导致甲壳类废弃物中的几丁质难以直接、高效地分离利用，既造成了天然生物资源的严重浪费，也加剧了固体废弃物的环境处理压力。

目前，几丁质的处理方法主要分为物理法、化学法和生物酶法。其中，物理法主要包括超声处理、机械粉碎、热机械-化学预处理等，可有效破坏几丁质的晶体结构、降低相对分子质量，提高其对后续降解方法（尤其是酶法降解）的可及性。但物理法制备GlcNAc单体的效率较低、工艺可控性较差，目前尚未实现大规模工业化应用[4]。化学法主要采用强酸催化体系完成几丁质的水解、脱矿、脱蛋白质处理，反应过程复杂，易造成几丁质分子链随机断裂、结构去乙酰化、母体结构变异等，同时存在设备易腐蚀、环境污染等问题[5]。生物酶法作为绿色高效的新型技术，可有效弥补物理法与化学法的不足。该技术以重组几丁质酶、*N*-乙酰-*β*-葡萄糖苷酶等功能酶为核心，结合机械预处理、液体辅助研磨等方式，能够在温和条件下实现几丁质的高效降解[6]。凭借反应条件温和、产率高、环境友好等优势，生物酶法已成为几丁质资源化利用的主要研究方向。

几丁质酶是一类糖苷水解酶，可特异性催化*β*-1，4糖苷键的水解，将大分子几丁质降解为GlcNAc的低聚体和GlcNAc单体。当几丁质的降解产物为寡糖（chitooligosaccharides，COS）时，因其水溶性较好，能够被植物或动物细胞吸收，具有诱导生物免疫应答、提高作物抗逆性、改善动物机体健康等多种生物活性[7]。已有研究证实，COS可提升肠道拟杆菌属（*Bacteroides*）、粪杆菌属（*Faecalibacterium*）等有益菌属数量，从而改善肠道菌群环境和机体代谢水平。此外，COS能抑制膳食诱导的晚期糖基化终末产物（AGEs）的积累，缓解高糖、肥胖引发的慢性代谢损伤[8]。在食品加工领域，将低浓度COS加入酸奶等发酵乳制品中，可保持乳酸菌活性与营养成分[9]；将其应用于鱼、肉、海鲜等易腐食品保鲜，可有效抑制腐败微生物增殖、延缓脂肪氧化变质[10]。GlcNAc作为几丁质的基本构成单元与生物合成前体，在医药与功能性材料领域应用广泛。研究表明，GlcNAc具有良好的生物相容性和吸收性，可促进软骨细胞II型胶原及糖胺聚糖（GAG）的合成，对关节修复与关节润滑具有积极作用[11]；GlcNAc可激活细胞自噬通路、抑制炎症反应及细胞凋亡，延缓关节退行性病变进程[12]；此外，其良好的稳定性与生物可降解特性，使其在医用敷料、生物可降解薄膜、组织工程水凝胶等生物材料领域展现出广阔的应用前景[13]。

根据氨基酸序列相似性与三级结构特征，几丁质酶在CAZy数据库中被划分为多个糖苷水解酶家族，其中以GH18和GH19家族最具代表性。GH18家族几丁质酶广泛存在于细菌、真菌、植物和动物体内[14]，其催化结构域通常为典型的$(\beta/\alpha)_8$ TIM桶状折叠结构，桶状结构顶端或边缘可形成凹陷的底物结合裂缝及保守的催化残基。例如，海洋橙色假交替单胞菌（*Pseudoalteromonas aurantia*）来源的GH18内切几丁质酶Chi23具有完整的$(\beta/\alpha)_8$桶状结构[15]。GH19家族几丁质酶主要分布于植物中，其催化结构域以多个α螺旋束为主体，并在催化位点形成裂缝，用于识别并结合几丁质或几丁寡糖底物。该家族的几丁质酶通常含有特异性环结构，可精准调控底物定位与催化效率。例如，蕊形真藓（*Bryum coronatum*）来源的GH19家族BcChi-A酶，虽然缺失部分环结构，但在与几丁四糖结合的晶体结构中，可通过Glu70、Ser102等多个氨基酸残基形成氢键，并在−2、−1、+1、+2等多个亚

位点完成底物识别与定位[16]。

目前，多种来源的几丁质酶已在大肠杆菌（*Escherichia coli*，*E. coli*）和枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）等异源宿主中实现高效表达。例如，*Bacillus subtilis*来源的BsChi在*E. coli*中异源表达后，可高效降解α-几丁质与蟹壳几丁质，生成GlcNAc单体[17]；豚鼠气单胞菌（*Aeromonas caviae*）来源的几丁质酶在pET20b(+)/BL21(DE3)系统中可高效表达，对胶体几丁质底物具有优异的降解活性[18]；此外，将黏质沙雷氏菌（*Serratia marcescens*）来源的*chiA*基因导入*Bacillus subtilis*后，重组菌株的几丁质酶活力显著优于野生型菌株[19]。几丁质酶可通过降解几丁质参与自然界物质循环、生物防御与生理发育调控，在农业生物防治、生物医药研发、食品工业保鲜、环保废弃物处理等领域具有重要的应用价值。

作者所在课题组前期从海洋环境中筛选出一株可高效降解几丁质的*Bacillus paralicheniformis*[20]。基于此，作者利用*E. coli*原核系统，对该菌株来源的几丁质酶基因*chi6380*进行克隆与异源表达；通过亲和层析对粗酶液进行分离纯化，系统研究重组酶的酶学性质与几丁质降解能力，并采用高效液相色谱（HPLC）分析了几丁质降解产物，以期为几丁质资源的绿色高效开发与产业化应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Bacillus paralicheniformis：分离自广西北海海岸及滩涂沉积物，于作者所在实验室科研资源库保存；表达载体pET22b(+)、*E. coli* TOP10、*E. coli* BL21(DE3)、DNA提取纯化与回收相关试剂：生工生物工程（上海）股份有限公司；T4 DNA连接酶：武汉塞维尔生物科技有限公司；BCA试剂盒：海门碧云天生物技术有限公司；咪唑、考马斯亮蓝G250：上海麦克林生化科技有限公司。

胶体几丁质：参照Pan等[21]的方法，称取10 g粉末状几丁质，缓慢加到252 mL预冷的盐酸中，持续搅拌混匀，4 ℃静置反应24 h。于8 000 r/min离心5 min，弃去上清液，用去离子水洗涤沉淀至pH接近中性。随后用去离子水定容至1 L，于4 ℃保存备用。

1.2 仪器与设备

PCR仪：Mastercycler nexus型，艾本德（上海）国际贸易有限公司；酶标仪：Multiskan Go型，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；水平电泳仪：PowerPac Basic型，伯乐生命医学产品（上海）有限公司；超声波细胞破碎仪：JY92-IIN型，宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 几丁质酶基因的生物信息学分析

以NCBI数据库中公布的*Bacillus paralicheniformis*全基因组序列为基础，对相关基因进行序列比对和功能注释分析，筛选获得参与几丁质降解的候选基因，并将其命名为*chi6380*。根据该基因的核苷酸序列信息，利用SnapGene 7.2.0软件设计引物，上游引物为TCGGAGGCTGCGAACTCGAG，下游引物为AACACGATGTTCATTCCCATGGCATG，引入*Xho* I和*Nco* I限制性内切酶识别位点。利用NCBI的BLAST功能分析氨基酸序列，通过ExPASy生物信息学平台的ProtParam在线工具，对该蛋白质的理论相对分子质量与等电点等理化性质进行预测和分析。采用SignalP 6.0在线服务器分析信号肽序列，利用ESpript 3.0工具分析保守域，并通过AlphaFold 3工具预测三维结构。

1.3.2 重组表达载体的构建

采用限制性内切酶*Xho* I和*Nco* I分别对目的基因及pET22b(+)表达载体进行双酶切处理。经琼脂糖凝胶电泳回收纯化后，在T4 DNA连接酶的作用下，将获得的目的基因与线性化载体进行连接，构建重组表达质粒。随后，将连接反应体系导入*E. coli* TOP10感受态细胞中，涂布于含100.0 μg/mL氨苄青霉素的LB固体培养基上进行抗性筛选，对筛选得到的阳性克隆进行测序分析。将构建成功的重组质粒命名为pET22b-*chi6380*。

1.3.3 重组几丁质酶的诱导表达和分离纯化

通过热激法将测序验证无误的重组质粒pET22b-*chi6380*转入*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中，将转化后的菌株置于37 ℃、200 r/min的恒温摇床中振荡培养。待菌液OD_{600}达到0.8时，加入终浓度为0.3 mmol/L的异丙基-*β*-硫代半乳糖苷（IPTG），调整培养条件为25 ℃、200 r/min，继续振荡诱导培养16 h。诱导培养结束后，将菌液于4 ℃、8 000 r/min条件下离心10 min，收集菌体沉淀，用Ni-NTA缓冲液洗涤菌体。洗涤后的菌体进行超声破碎处理，破碎参数为：功率300 W，超声5 s、间歇10 s，超声25 min。超声破碎完成后，将样品于4 ℃、12 000 r/min离心20 min，收集的上清液即为粗酶液。将粗酶液上样至镍亲和层析柱中富集

目的蛋白质，纯化产物通过 SDS-PAGE 分析其纯度与相对分子质量。

1.3.4 重组几丁质酶活力的测定

采用 3，5-二硝基水杨酸（DNS）比色法测定几丁质酶活力[22]。以 1 g/dL 的胶体几丁质作为反应底物，取 0.2 mL 酶液与等体积底物充分混匀，50 ℃下反应 15 min，反应结束后于沸水浴中反应 10 min 以终止酶促反应。待反应体系冷却至室温后，于 12 000 r/min 离心 5 min，取 0.2 mL 上清液，加入 0.3 mL DNS，沸水浴处理 8 min。待体系冷却至室温后，取 0.2 mL 反应液加入 96 孔板中，测定各样品在 540 nm 的吸光度，结合 *N*-乙酰基葡萄糖标准曲线和酶活力计算公式，计算样品酶活力。以沸水浴处理 10 min 后完全失活的酶液为空白对照，所有试验组均设置 3 个平行。

酶活力单位（U）定义为：在上述设定的酶促反应条件下，每分钟水解胶体几丁质生成 1 μmol GlcNAc 所需要的酶量。

1.3.5 重组几丁质酶的蛋白质质量浓度测定

采用 BCA 试剂盒测定重组几丁质酶的蛋白质质量浓度[23]。选取牛血清白蛋白（BSA）为标准品，配制 0~1.0 mg/mL 的系列标准品溶液，并据此绘制标准曲线。

1.3.6 重组几丁质酶的酶学性质测定

1）pH 对重组几丁质酶活力及稳定性的影响：将等体积的酶溶液与 1 g/dL 的胶体几丁质溶液混合，于 50 ℃恒温条件下，采用不同 pH 缓冲体系进行酶促反应，探究 pH 对重组几丁质酶活力的影响。所用缓冲体系包括：NaAc-HAc（pH 4.0~6.0）、Na_2HPO_4-NaH_2PO_4（pH 6.0~8.0）、Tris-HCl（pH 8.0~9.0）、Gly-NaOH（pH 9.0~10.0）。以检测得到的最高酶活力为 100%，计算不同 pH 条件下的相对酶活力，确定该重组几丁质酶的最适 pH。为评估重组几丁质酶的 pH 稳定性，采用上述不同 pH 的缓冲体系对重组几丁质酶溶液进行稀释，4 ℃下孵育 1 h，在最适反应条件下测定残余酶活力。以未经缓冲液处理的原始酶活力为空白对照（设定为 100%），计算不同 pH 孵育后样品的相对酶活力。

2）温度对重组几丁质酶活力及稳定性的影响：在最适 pH 条件下，探究温度（30~90 ℃）对重组几丁质酶活力的影响。以检测得到的最高酶活力为 100%，计算不同温度下的相对酶活力，确定该重组几丁质酶的最适温度。为评估重组几丁质酶的热稳定性，将酶液分别置于 30~90 ℃保温 1 h，冷却至室温后，在最适反应条件下测定残余酶活力。以未进行热处理的原始酶活力为空白对照（设定为 100%），计算不同温度处理后样品的相对酶活力。

3）底物特异性及动力学参数测定：在最适反应条件下，分别以 1 g/dL 的胶体几丁质、甲壳素、虾壳几丁质、蟹壳几丁质、片状几丁质、胶体壳聚糖和羧甲基纤维素钠为底物，测定重组几丁质酶对不同底物的催化活力，分析其底物特异性。同时，以胶体几丁质（10~70 mg/mL）为底物，在最适反应条件下测定各底物质量浓度下的初始反应速率。采用 Lineweaver-Burk 双倒数法对试验数据进行拟合分析，计算重组几丁质酶的米氏常数（K_m）与最大反应速率（V_{max}）[24]。

4）钠离子浓度对重组几丁质酶活力的影响：在最适反应条件下，向反应体系中分别添加不同终浓度（0.5~4.0 mol/L）的 NaCl 溶液，探究钠离子浓度对重组几丁质酶活力的影响。以未添加 NaCl 的反应体系酶活力为空白对照（设定为 100%），计算不同钠离子浓度下样品的相对酶活力。

5）金属离子与化学试剂对重组几丁质酶活力的影响：在重组几丁质酶最适反应体系中，分别加入终浓度为 1.0、5.0 mmol/L 的 Zn^{2+}、Mn^{2+}、Ba^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、K^{+}、Co^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}等金属离子，以及终浓度为 0.5、1.0 mmol/L 的乙醇、异丙醇、二甲基亚砜（DMSO）、吐温-80、EDTA、DTT、十二烷基硫酸钠（SDS）、甲醇等化学试剂，测定各组重组几丁质酶活力[25]。以未添加任何金属离子与化学试剂的酶反应体系为空白对照（设定为 100%），计算各处理条件下的相对酶活力。

6）水解产物分析：以 *N*-乙酰氨基葡萄糖及不同聚合度的几丁寡糖为标准品，对重组几丁质酶水解胶体几丁质的产物进行鉴定分析。将重组几丁质酶液与胶体几丁质等体积混合后，置于 50 ℃水浴锅中分别反应 15 min、2 h、6 h、12 h、24 h。反应结束后，沸水浴 10 min 以终止酶促反应。待体系冷却至室温后，于 12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液。采用配备示差折光检测器的 HPLC 检测重组几丁质酶降解胶体几丁质生成的产物。色谱条件为：流动相为体积分数 70% 的乙腈，流量 0.5 mL/min，色谱柱温度 45 ℃。

1.3.7 重组几丁质酶抗真菌活性测定

参照文献[26]中的琼脂孔扩散法，以烟草疫

霉和新月弯孢霉为指示菌株，测定重组几丁质酶的抑菌活性。将活化后的菌丝块接种至马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基中央，在菌丝块四周对称位置打孔，分别向孔内加入适量重组几丁质酶液，以无菌水为对照组。所有平板均于28 ℃培养3~7 d，定期观察并记录菌丝生长状态。

2 结果与讨论

2.1 几丁质酶的生物信息学结果

基于*Bacillus paralicheniformis*全基因组DNA序列信息，获得几丁质酶的氨基酸序列（NCBI登录号：WP_394798542.1）。序列比对结果显示，该基因序列编码的氨基酸序列与*Bacillus licheniformis*几丁质酶（NCBI登录号：WP_016886405.1）的相似度高达96.47%。ProtParam在线工具预测结果显示，*chi6380*基因核苷酸序列长度为1 794 bp，可编码630个氨基酸残基。理化性质研究表明，该蛋白质的理论相对分子质量为69 580，等电点为5.43。通过SignalP 6.0在线服务器进行信号肽识别，证实Chi6380为典型的分泌型蛋白质，其切割位点位于第30位与第31位氨基酸残基之间。

InterProScan结构域分析结果见图1（a），Chi6380为典型的分泌型GH18家族几丁质酶，整体呈现多模块化的排列模式。该蛋白质的N端包含一段引导蛋白质分泌的信号肽序列，随后是核心的GH18催化活性中心，肽链下游依次排布纤连蛋白第III型结构域（Fn3），C末端则为几丁质结合模块（chitin-binding module，CBM）。该多模块组合特征与已报道的多种几丁质酶高度一致。*Bacillus licheniformis*来源的Chi18B同样含有GH18催化域、Fn3、C端CBM结构。已有研究证明，C端的CBM区域在结合不溶性几丁质（如海洋壳体等）的过程中发挥关键作用[27]。*Bacillus* sp. J813来源的几丁质酶同样包含GH18催化域、Fn3、CBM家族5，对其CBM的芳香族残基进行突变后，不溶性几丁质的底物结合能力与水解活性均显著降低，说明CBM家族5在底物结合中具有重要功能[28]。此外，昆虫来源的OfChtII属于含多个CBM结构的GH18家族几丁质酶，相较于仅保留催化域的截短体，含完整CBM的全长构建体对不溶性几丁质底物的结合能力与催化活性更高，支持CBM提高结合能力并增强底物催化效率的功能假设[29]。通过BLAST程序比对及ESpript 3.0可视化分析，Chi6380的氨基酸序列与多种细菌来源的几丁质酶具有较高的序列相似度，其中催化核心区域序列高度保守，含有GH18家族几丁质酶特征性保守催化序列DXXDXDXE，见图1（b）。利用AlphaFold 3构建Chi6380的三维结构并标注二级结构，结果显示该保守区域主要由交替排列的β折叠和α螺旋构成，形成典型的$(\beta/\alpha)_8$ TIM桶状折叠，见图1（c）。

2.2 *chi6380*基因的PCR扩增与克隆结果

以*Bacillus paralicheniformis*基因组DNA为模板扩增*chi6380*基因，获得1 794 bp的目的片段，与预测基因大小一致，见图2（a）。重组质粒pET22b-*chi6380*经*Xho* I和*Nco* I双酶切处理后，琼脂糖凝胶电泳结果显示，酶切后释放的插入片段与线性化载体的条带大小均与理论预期相符，表明重组质粒pET22b-*chi6380*构建成功，见图2（b）。

2.3 重组几丁质酶Chi6380的诱导表达与纯化

重组质粒pET22b-*chi6380*的SDS-PAGE结果见图3。与转入空质粒pET-22b（+）的菌株相比，转入重组质粒pET22b-*chi6380*的菌株经诱导表达后的破碎细胞上清液在68 000处出现一条明显增强的蛋白质条带，且纯化后该位置出现单一清晰的蛋白质条带。该蛋白质的表观相对分子质量与理论相对分子质量（69 670）基本吻合，表明重组几丁质酶Chi6380在大肠杆菌中成功表达，且纯化产物纯度较高，可用于后续酶学性质研究。采用BCA试剂盒测定纯化后重组几丁质酶Chi6380的蛋白质质量浓度，以BSA为标准品绘制标准曲线，所得标准曲线方程为：y=0.000 9x−0.010 7，R^2=0.997 6。纯化前后重组几丁质酶的蛋白质质量浓度见表1。

2.4 重组几丁质酶Chi6380的酶学性质研究

2.4.1 Chi6380的最适反应pH与pH稳定性

pH是影响酶催化性能的因素之一，可直接调控酶活性位点氨基酸残基的质子化状态，进而改变酶与底物的结合方式。重组几丁质酶Chi6380在pH 4.0~6.0下的相对酶活力在60%以上，其中pH 5.0时的酶活力最高；当pH>7.0时，相对酶活力降至40%以下，见图4（a）。结果表明，该酶为酸性偏好型几丁质酶。Chi6380在pH 5.0~8.0环境中预孵育后，仍可保留80%~95%的酶活力，而在碱性（pH≥9）条件下，酶活力显著降低，见图4（b）。推测强碱环境会破坏维持酶空间构象的氢键与盐桥网络，导致活性位点结构扭曲失活。该结果与其他

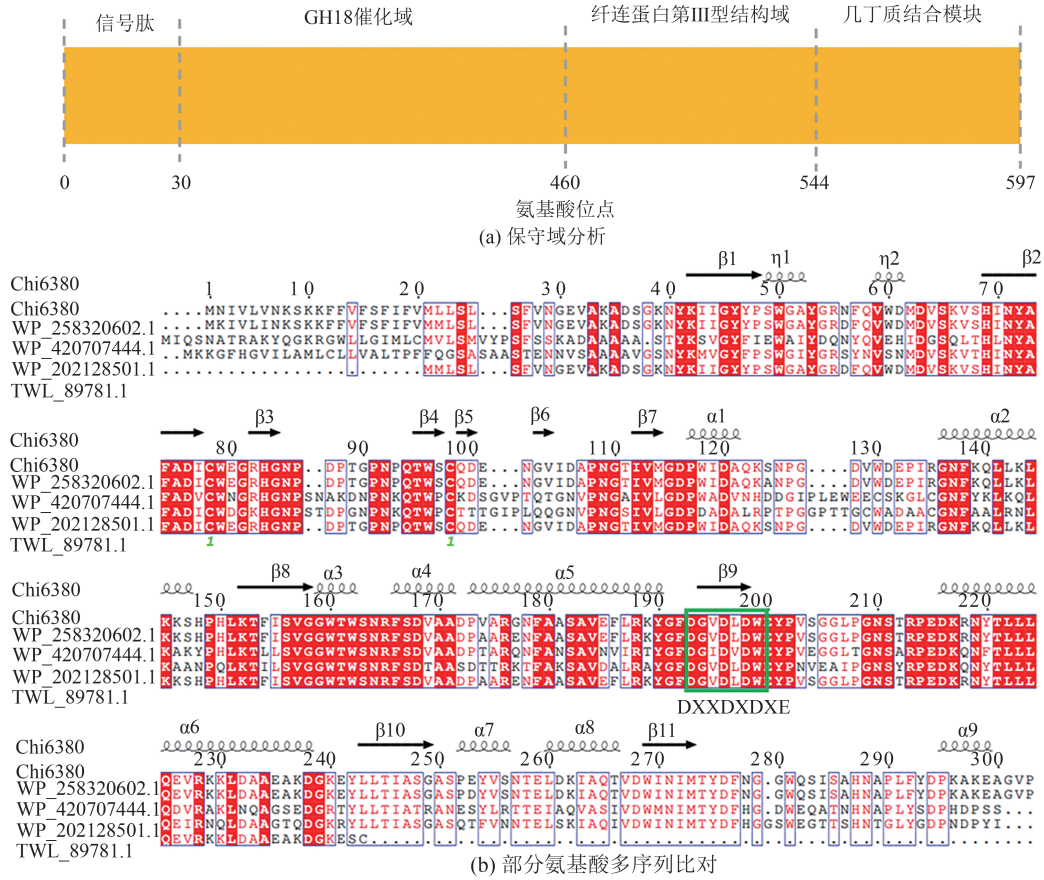


图 1　Chi6380 生物信息学结果

Fig. 1　Bioinformatic analysis results of Chi6380

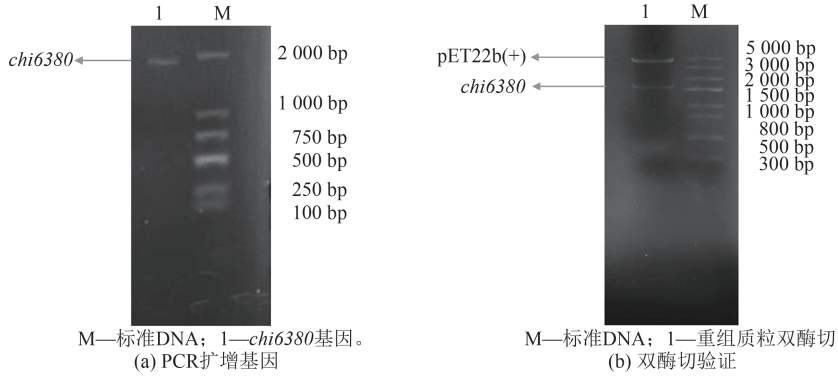
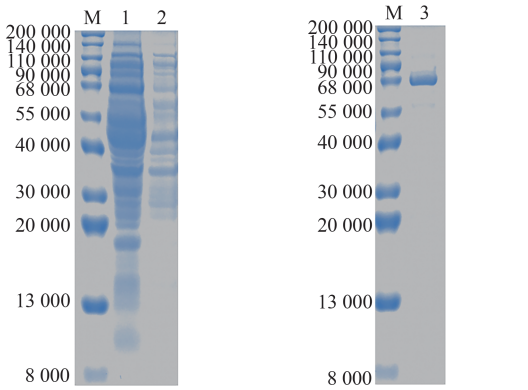


图 2　*chi6380* 基因 PCR 扩增产物和重组质粒双酶切验证

Fig. 2　PCR amplification products of *chi6380* and double enzyme digestion of the recombinant plasmid



(a) 菌体破碎细胞上清液　(b) 纯化后的蛋白质

M—标准蛋白质；1—pET22b-*chi6380*菌体破碎细胞上清液；2—*E. coli* BL21/pET22b(+)菌体破碎细胞上清液；3—镍柱纯化后的蛋白质。

图 3　Chi6380 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3　SDS-PAGE analysis of Chi6380

表 1　Chi6380 粗酶液的纯化与酶活力结果

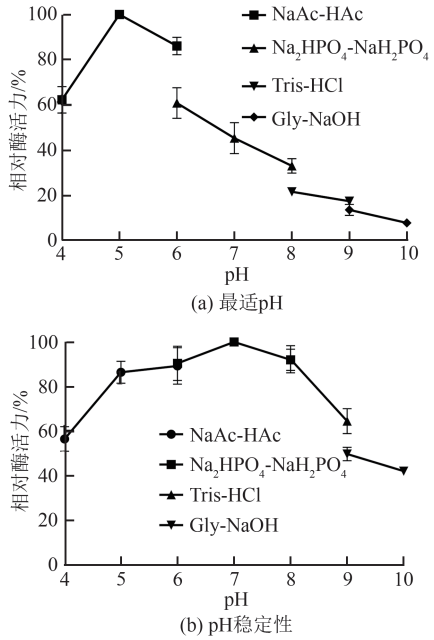
Table 1　Purification and enzyme activity of the crude enzyme solution of Chi6380

样品	总酶活力/U	总蛋白质质量/mg	比酶活/（U/mg）	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	6.073 4	83.270	0.072 9	1.00	100.0
纯化后	2.405 8	7.531	0.319 5	4.38	39.6

GH18 家族几丁质酶的研究报道一致。Thimoteo 等[30]报道的重组几丁质酶在 pH 3~11 条件下的酶活力较高，最适 pH 为 5~6。另有研究表明，重组几丁质酶在 pH 6.0~8.5 条件下预孵育后仍能保持 75% 以上的酶活力[31]。

2.4.2　Chi6380 的最适反应温度与温度稳定性

温度是决定酶催化效率与结构稳定性的关键因素。适量提高温度可加速底物分子运动、降低反应活化能，促进酶促反应进行；而良好的热稳定性是酶适应工业发酵、高温加工等实际生产场景的重要基础。Chi6380 的最适反应温度为 50 ℃，在 40~70 ℃内相对酶活力在 55% 以上，见图 5(a)。Chi6380 在 30~50 ℃孵育 1 h 后，相对酶活力仍高于 50%，见图 5(b)。已有研究表明，来源于细菌的几丁质酶通常能在 20~55 ℃保持较好的稳定性和催化活性。*Microbulbifer* sp. J1-2 来源的几丁质酶在 40 ℃孵育 2 h 后可保留 90% 以上酶活力；*Micromonospora aurantiaca* 来源的几丁质酶 MaChi3 在 50 ℃孵育 1 h 后可保持 70% 以上的酶活力[32]。在本研究中，重组几丁质酶 Chi6380 在 30~40 ℃孵育 1 h 后仍保持 80% 以上的酶活力，与其他研究结果相符。室温至中温条件广泛适用于生物防治制剂、土壤改良剂等应用场景，因此 Chi6380 的温度特性使其具有良好的实际应用价值。

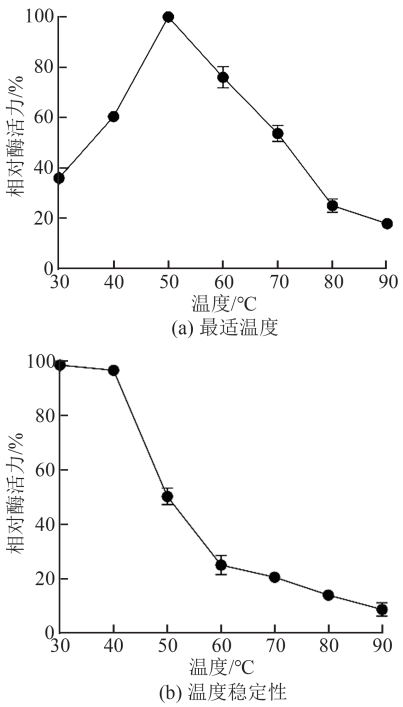


(a) 最适pH

(b) pH稳定性

图 4　pH 对 Chi6380 酶活力和稳定性的影响

Fig. 4　Effects of pH on the activity and stability of Chi6380



(a) 最适温度

(b) 温度稳定性

图 5　温度对 Chi6380 酶活力和稳定性的影响

Fig. 5　Effects of temperature on the activity and stability of Chi6380

2.4.3　Chi6380 的底物特异性、K_m 与 V_{max}

Chi6380 对胶体几丁质的水解活性最高，对甲壳素、片状几丁质、胶体壳聚糖均具有不同程度的降解

能力，而对羧甲基纤维素钠几乎无催化活性，见图6(a)。以不同质量浓度的胶体几丁质为底物，经GraphPad Prism软件拟合计算得到Chi6380的K_m和V_{max}分别为0.62 g/L和350.00 U/mg，见图6(b)。K_m较低表明Chi6380对胶体几丁质具有极高的底物亲和力，这是由于胶体几丁质经溶胀处理后比表面积增大，底物可及性提升，更易与酶活性位点结合。与天然晶体结构的几丁质相比，胶体几丁质的空间位阻明显降低，有利于酶-底物复合物的形成，从而提升了催化效率。结果表明，在基于Chi6380构建几丁质生物转化体系时，胶体几丁质为最优底物形式。

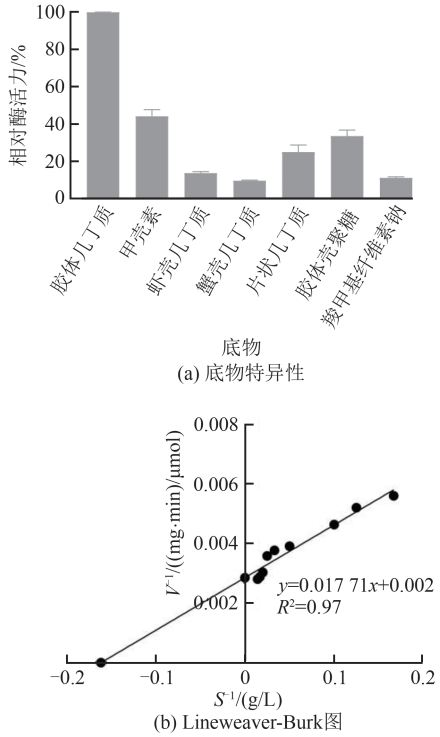


图6 Chi6380的底物特异性和Lineweaver-Burk图

Fig. 6 Substrate specificity and Lineweaver-Burk plot of Chi6380

2.4.4 钠离子浓度对Chi6380酶活力的影响

海洋微生物在长期高盐环境的进化过程中形成了独特的耐盐机制，因此耐盐性较强的几丁质酶在海洋生物质资源化利用、水产养殖废弃物处理、高盐土壤生物改良等领域具有显著优势，无需底物脱盐预处理步骤，可有效简化工艺流程、降低生产成本。钠离子浓度对Chi6380酶活力的影响见图7。当钠离子浓度为0.5~1.5 mol/L时，Chi6380的相对酶活力均在60%以上，表现出耐盐特性，与已报道的耐盐几丁质酶特性相符。推测该酶结构具备一定的钠离子耐受机制，如活性位点附近含有

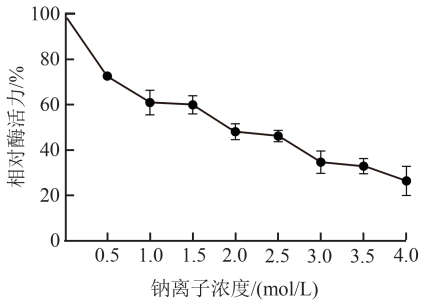


图7 钠离子浓度对Chi6380酶活力的影响

Fig. 7 Effect of sodium ion concentration on the activity of Chi6380

可与钠离子形成弱配位的极性氨基酸残基，或蛋白质表面携带酸性氨基酸以维持水化层结构稳定。当钠离子浓度>1.5 mol/L时，Chi6380相对酶活力降至50%以下，符合高盐抑制酶活力的规律。高浓度钠离子与氯离子可通过静电屏蔽、竞争性结合、构象干扰等方式作用于酶活性中心或底物结合位点，从而抑制底物结合或干扰催化过程，最终导致酶活力下降[33]。

2.4.5 金属离子和有机试剂对Chi6380酶活力的影响

金属离子可通过配位结合、竞争性抑制、氧化还原反应等方式改变酶构象，从而调控酶的催化效率；而表面活性剂、有机溶剂、还原剂等化学试剂则主要通过破坏蛋白质的疏水核心、断裂二硫键等方式来影响酶的结构稳定性。不同金属离子对Chi6380的酶活力存在不同程度的抑制作用，见图8(a)。低浓度Mn^{2+}、Fe^{3+}、Fe^{2+}、K^+处理后，Chi6380的相对酶活力均在60%以上；高浓度处理后相对酶活力均低于40%。Cu^{2+}、Zn^{2+}对Chi6380的抑制作用最显著，相对酶活力降至30%以下，与Cheba等[34]的研究结果一致。Zn^{2+}、Cu^{2+}等过渡金属离子对组氨酸侧链的咪唑基团具有较高的亲和力，这种配位作用可能干扰催化中心的电荷分布，从而影响酶的活性构象。

吐温-80、乙醇、DMSO、SDS、异丙醇、DTT对Chi6380的酶活力有较强的抑制作用，可使其相对酶活力降至20%以下，见图8(b)。Chi6380蛋白质的疏水核心由多个芳香族氨基酸组成，有机溶剂可破坏蛋白质分子间的疏水相互作用，导致酶的空间结构变形，进而降低了酶活力。EDTA对Chi6380酶活力的抑制作用较弱，处理后相对酶活力仍维持在50%以上，表明Chi6380并非严格的金属依赖性酶，其催化机制无需外源金属离子作为辅因子。该特性

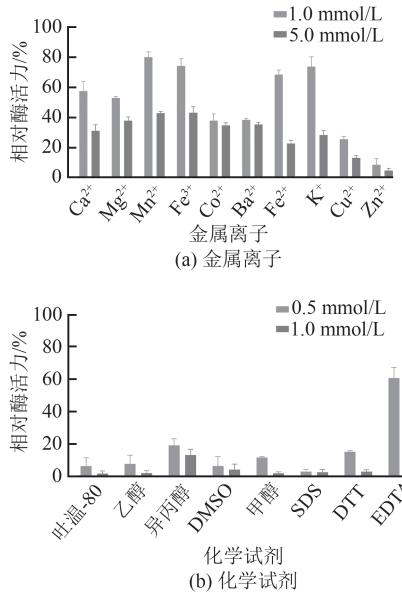


图 8　金属离子与化学试剂对 Chi6380 酶活力的影响

Fig. 8　Effects of metal ions and chemical reagents on the activity of Chi6380

具有显著的工业应用优势，可在无金属离子补充的反应体系中稳定催化，既简化了缓冲液配制工艺，又避免了重金属污染风险。

2.4.6　Chi6380 的水解产物分析

通过 HPLC 对 Chi6380 的水解产物进行分析，结果见图 9。Chi6380 在催化几丁质水解反应的前期主要生成几丁四糖和几丁六糖，未检测到明显的几丁二糖积累，表明该酶主要切割几丁质内部的 β-1，4 糖苷键，具备典型的内切几丁质酶活性。随着反应的进行，几丁二糖、几丁四糖与几丁六糖含量持续升高，表明 Chi6380 具有连续水解的双功能特性[35]。首次切割底物后，Chi6380 能继续沿着糖链滑动并不断切割，从而产生更低聚度的寡糖，这种过程性水解现象在其他几丁质酶中已有报道。研究表明，酶活性中心附近的芳香族氨基酸可形成疏水性底物引导通道，增强酶与底物的亲和力，介导酶沿底物链滑动，从而实现持续水解催化[36]。与传统几丁质酶相比，Chi6380 生成的几丁寡糖在结构上具有独特结构，不仅具有优异的抗氧化活性，还可作为天然稳定剂应用于食品加工领域，可有效提高食品的抗氧化能力，延长产品货架期。此外，高聚合度几丁寡糖稳定性较好，能够有效提升食品的质地、口感和外观，在食品品质提升和功能性食品配料开发方面具有广阔的应用前景。

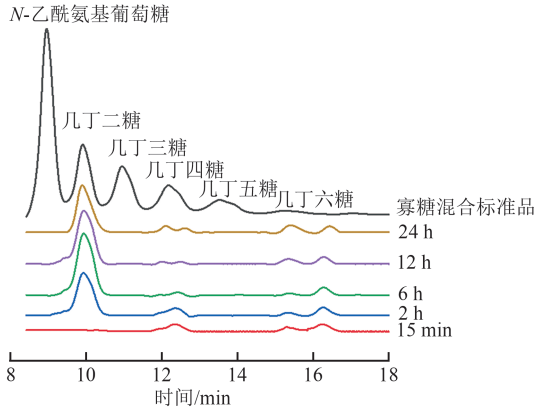
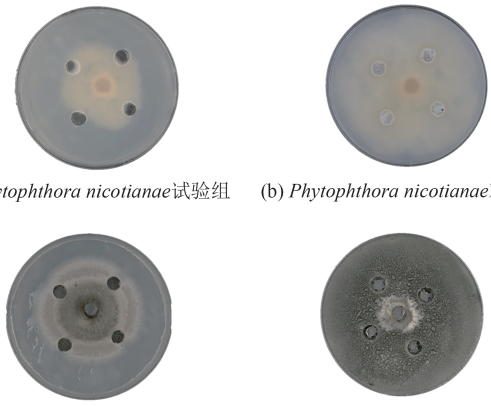


图 9　Chi6380 水解胶体几丁质产物的 HPLC 结果

Fig. 9　HPLC results of hydrolysis products from colloidal chitin by Chi6380

2.5　Chi6380 的抗真菌活性

Chi6380 对多种丝状真菌具有显著的抑菌活性，可明显抑制 *Phytophthora nicotianae* 和 *Curvularia lunata* 的菌丝生长，抑菌率分别为(46.40±0.21)%、(30.53±0.38)%。Chi6380 为双功能几丁质酶，能够降解真菌细胞壁中的 β-1，4-*N*-乙酰葡糖胺聚合物，从而破坏细胞壁结构完整性，造成菌体渗透压失衡，最终导致菌丝生长受阻[37]。该抑菌机制与已报道的微生物来源的几丁质酶抗真菌机理一致，即几丁质酶可通过降解真菌细胞壁结构，发挥广谱抑菌活性[38]。



(a) *Phytophthora nicotianae* 试验组　(b) *Phytophthora nicotianae* 对照组

(c) *Curvularia lunata* 试验组　(d) *Curvularia lunata* 对照组

图 10　几丁质酶的抗真菌活性

Fig. 10　Antifungal activity of chitinase

3　结论

作者从 *Bacillus paralicheniformis* 中成功克隆并表达了 GH18 家族几丁质酶 Chi6380。结果表明，Chi6380 具有典型的 C18 催化域-Fn3-CBM 多模块结构，这种复杂的结构域组成是其高底物亲

和力及高效降解能力的基础。该酶在pH 5.0、50 ℃条件下表现出优异的催化活性，能够适应食品加工中常见的弱酸及中温环境。相较于已报道的同家族酶，Chi6380水解产物主要为高聚合度的几丁寡糖。此外，Chi6380能有效破坏真菌细胞壁，为将其开发为绿色防腐剂或微生物拮抗剂提供了数据支撑。本研究虽明确了Chi6380的基本催化特性，但该酶过程性水解的分子机制、在复杂食品基质中的应用以及在复杂土壤环境中的实际防治效果仍有待深入研究。综上，Chi6380在甲壳类废弃物生物转化、食品保鲜、功能性食品开发及植物病害生物防治领域具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] Zhao Z Z，Li Y J，Du Z Y. Seafood waste-based materials for sustainable food packing：from waste to wealth[J]. Sustainability，2022，14(24)：16579.

[2] 全国水产技术推广总站，中国水产学会. 中国小龙虾产业发展报告(2025)[J]. 中国水产，2025(7)：10-16.
National Fisheries Technology Extension Center，China Society of Fisheries. China crayfish industry development report (2025)[J]. China Fisheries，2025(7)：10-16.(in Chinese)

[3] Izadi H，Asadi H，Bemani M. Chitin：a comparison between its main sources[J]. Frontiers in Materials，2025，12：1537067.

[4] Pandit A，Indurkar A，Deshpande C，et al. A systematic review of physical techniques for chitosan degradation[J]. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications，2021，2：100033.

[5] Kim Y，Park R D. Progress in bioextraction processes of chitin from crustacean biowastes[J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry，2015，58(4)：545-554.

[6] Yu X J，Jiang Z C，Xu X D，et al. Mechano-enzymatic degradation of the chitin from crustacea shells for efficient production of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc)[J]. Molecules，2022，27(15)：4720.

[7] Liu Y H，Qin Z，Wang C L，et al. *N*-acetyl-*D*-glucosamine-based oligosaccharides from chitin：enzymatic production，characterization and biological activities[J]. Carbohydrate Polymers，2023，315：121019.

[8] Liu W，Li X Q，Zhao Z L，et al. Effect of chitooligosaccharides on human gut microbiota and antiglycation[J]. Carbohydrate Polymers，2020，242：116413.

[9] Vela Gurovic M S，Staffolo M D，Montero M，et al. Chitooligosaccharides as novel ingredients of fermented foods[J]. Food & Function，2015，6(11)：3437-3443.

[10] Mittal A，Singh A，Buatong J，et al. Chitooligosaccharide and its derivatives：potential candidates as food additives and bioactive components[J]. Foods，2023，12(20)：3854.

[11] Chang N J，Lin Y T，Lin C C，et al. The repair of full-thickness articular cartilage defect using intra-articular administration of *N*-acetyl-*D*-glucosamine in the rabbit knee：randomized controlled trial[J]. BioMedical Engineering OnLine，2015，14(1)：105.

[12] Chang Y J，Wang Y G，Liu J S，et al. Glucosamine-loaded injectable hydrogel promotes autophagy and inhibits apoptosis after cartilage injury[J]. Heliyon，2023，9(9)：e19879.

[13] Hollenhorst P C，McIntosh L P，Graves B J. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors[J]. Annual Review of Biochemistry，2011，80：437-471.

[14] Krolicka M，Hinz S W A，Koetsier M J，et al. Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* C1，a thermostable enzyme for chitin and chitosan depolymerization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2018，66(7)：1658-1669.

[15] 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]. Frontiers in Microbiology，2019，10：2457.

[16] Ohnuma T，Umemoto N，Nagata T，et al. Crystal structure of a “loopless” GH19 chitinase in complex with chitin tetrasaccharide spanning the catalytic center[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics，2014，1844(4)：793-802.

[17] 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.

[18] Lin C S，Chen H C，Lin F P. Expression and characterization of the recombinant gene encoding chitinase from *Aeromonas caviae*[J]. Enzyme and Microbial Technology，1997，21(7)：472-478.

[19] Okay S，Alshehri W A. Overexpression of chitinase a gene from *Serratia marcescens* in *Bacillus subtilis* and characterization of enhanced chitinolytic activity[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology，2020，63：1-8.

[20] Xie J J，Zhang L G，Yang K X，et al. Enhanced chitinase production by *Bacillus paralicheniformis* GXMU-J23.1：optimization，genomic insights，and chitin degradation

mechanism[J]. Bioresource Technology，2025，418：131911

[21] Pan M Y，Li J H，Lv X Q，et al. Molecular engineering of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101 for enzymatic production of chitooligosaccharides[J]. Enzyme and Microbial Technology，2019，124：54-62.

[22] García-Fraga B，da Silva A F，López-Seijas J，et al. A novel family 19 chitinase from the marine-derived *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T：heterologous expression，characterization and antifungal activity[J]. Biochemical Engineering Journal，2015，93：84-93.

[23] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry，1976，72：248-254.

[24] 欧阳玉滢，林梅，王巧贞，等. 耐热微泡菌*Microbulbifer thermotolerans* YLW106几丁质酶的基因克隆表达及酶学性质分析[J]. 广西科学，2024，31(4)：731-741.
Ouyang Y Y，Lin M，Wang Q Z，et al. Gene cloning，expression and characterization of chitinase from *Microbulbifer thermotolerans* YLW106[J]. Guangxi Sciences，2024，31(4)：731-741.(in Chinese)

[25] 王逗，游锦若，申铉日，等. 橙黄小单孢菌(*Micromonospora aurantiaca*)几丁质酶基因的克隆、表达、鉴定及应用[J]. 南方水产科学，2023，19(5)：143-153.
Wang D，You J R，Shen X R，et al. Cloning，expression and application of a chitinase gene from *Micromono spora aurantiaca*[J]. South China Fisheries Science，2023，19(5)：143-153.(in Chinese)

[26] 赵节昌，王启源，宋珂昕，等. 抗真菌内切几丁质酶酶学性质及制备低聚壳寡糖功能分析[J]. 食品科学，2024，45(5)：49-58.
Zhao J C，Wang Q Y，Song K X，et al. Enzymatic properties of antifungal endochitinase and its function in the preparation of chitosan oligosaccharides[J]. Food Science，2024，45(5)：49-58.(in Chinese)

[27] Islam S M A，Cho K M，Hong S J，et al. Chitinase of *Bacillus licheniformis* from oyster shell as a probe to detect chitin in marine shells[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2010，86(1)：119-129.

[28] Uni F，Lee S，Yatsunami R，et al. Mutational analysis of a CBM family 5 chitin-binding domain of an alkaline chitinase from *Bacillus* sp. J813[J]. Bioscience，Biotechnology，and Biochemistry，2012，76(3)：530-535.

[29] Chen W，Qu M B，Zhou Y，et al. Structural analysis of group II chitinase (ChtII) catalysis completes the puzzle of chitin hydrolysis in insects[J]. Journal of Biological Chemistry，2018，293(8)：2652-2660.

[30] Thimoteo S S，Glogauer A，Faoro H，et al. A broad pH range and processive chitinase from a metagenome library[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research，2017，50：e5658.

[31] Liu Y Z，Xiong W K，Wang X H，et al. Biochemical analyses of a new GH18 chitinase from *Beauveria bassiana* KW1 and its synergy with a commercial protease on silkworm exuviae hydrolysis[J]. Applied and Environmental Microbiology，2025，91(10)：e0128525.

[32] Guo H Z，Wang D，Yang H T，et al. Heterologous expression and characterization of a pH-stable chitinase from *Micromonospora aurantiaca* with a potential application in chitin degradation[J]. Marine Drugs，2024，22(6)：287.

[33] Lee H J，Lee Y S，Choi Y L. Cloning，purification，and characterization of an organic solvent-tolerant chitinase，MtCh509，from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221[J]. Biotechnology for Biofuels，2018，11(1)：303.

[34] Cheba B A，Zaghloul T I，EL-Massry M H，et al. Effect of metal ions，chemical agents，and organic solvent on *Bacillus* sp. R2 chitinase activity[J]. Procedia Technology，2016，22：465-470.

[35] 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]. Microbial Cell Factories，2018，17(1)：47.

[36] Zakariassen H，Aam B B，Horn S J，et al. Aromatic residues in the catalytic center of chitinase a from *Serratia marcescens* affect processivity，enzyme activity，and biomass converting efficiency[J]. Journal of Biological Chemistry，2009，284(16)：10610-10617.

[37] Essghaier B，Zouaoui M，Najjari A，et al. Potentialities and characterization of an antifungal chitinase produced by a halotolerant *Bacillus licheniformis*[J]. Current Microbiology，2021，78(2)：513-521.

[38] Farag M A，Al-Nusarie S T，Farag M A，et al. Production，optimization，characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terrus*[J]. African Journal of Biotechnology，2014，13(14)：1567-1578.