张莉刚,潘思静,韦玉玲,等. 高产几丁质酶菌株的筛选鉴定、发酵条件优化及酶学性质分析 [J]. 食品工业科技,2026,47(17):223−232. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090236

ZHANG Ligang, PAN Sijing, WEI Yuling, et al. Screening and Identification of High Chitinase Producing Strains, Optimization of Fermentation Conditions and Analysis of Enzymatic Properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(17): 223−232. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090236

·生物工程·

高产几丁质酶菌株的筛选鉴定、发酵条件优化及酶学性质分析

张莉刚,潘思静,韦玉玲,李吉玲,潘东炜,张红岩,申乃坤*

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

摘　要:为提升甲壳类废弃物中几丁质的资源化利用价值,本研究从广西海虾养殖场底部淤泥中采集样品,经初筛、复筛获得高产几丁质酶菌株并进行鉴定,再进一步通过单因素及正交优化设计确定最佳发酵参数,最后对菌株所产几丁质酶的酶学性质及酶解产物进行研究。结果表明:从几丁质固体平板上初筛获得 9 株透明圈较大菌株,进一步复筛获得 1 株高产几丁质酶(297.24±10.77 U/L)的菌株 GXUN-J3,鉴定为链霉菌属(*Streptomyces* sp.);条件优化获得该菌产几丁质酶的最佳工艺为:几丁质 6%(w/v),大豆粉浓度 0.25%(w/v),初始 pH7.0,发酵温度 25 ℃,装液量 40 mL/150 mL,接种量 5%(v/v),酶活可达 1026.72±18.69 U/L,是优化前的 3.51 倍;酶学性质结果表明,该菌株所产几丁质酶的最适反应温度为 50 ℃,最适反应 pH 为 5.0,金属离子中 Mg^{2+}和 Fe^{3+}对酶活有激活作用,而 Fe^{2+}、Mn^{2+}、Cu^{2+}则有显著抑制作用(P<0.05);化学试剂 EDTA、SDS、甲醇有显著抑制作用(P<0.05)。酶解几丁质产物经薄层层析(thin layer chromatography,TLC)鉴定为几丁二糖和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖,表明该酶具有外切几丁质酶特性。本研究建立了基于链霉菌 GXUN-J3 的几丁质酶与几丁寡糖制备工艺,为甲壳类废弃物的高值化利用提供了研究基础。

关键词:几丁质酶,链霉菌,条件优化,酶学性质,几丁寡糖

中图分类号:TS203.1　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1002−0306(2026)17−0223−10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090236

本文网刊:

Screening and Identification of High Chitinase Producing Strains, Optimization of Fermentation Conditions and Analysis of Enzymatic Properties

ZHANG Ligang, PAN Sijing, WEI Yuling, LI Jiling, PAN Dongwei, ZHANG Hongyan, SHEN Naikun*

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

Abstract: To enhance the value-added utilization of chitin derived from crustacean waste, this study collected samples from the bottom of a shrimp farm in Guangxi. High-yield chitinase-producing strains were isolated through preliminary and secondary screening, followed by taxonomic identification. The optimal fermentation conditions were determined using single-factor experiments combined with orthogonal designs. Subsequently, the enzymatic properties and hydrolysis products of the chitinase produced by the selected strain were characterized. Results showed that initial screening on chitin-containing agar plates yielded nine strains capable of forming clear zones, among which strain GXUN-J3 exhibited the highest chitinase activity (297.24±10.77 U/L) and was identified as belonging to the genus *Streptomyces* sp. Under optimized fermenta-

收稿日期: 2025−09−22

基金项目: 国家自然科学基金(32160017);广西重点研发计划(AB21196019);广西民族大学大学生创新创业训练计划(202310608017;S202510608309)。

作者简介: 张莉刚(2001−),男,硕士研究生,研究方向:微生物资源开发与利用,E-mail:17530418524@163.com。

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

tion conditions—6% (w/v) chitin, 0.25% (w/v) bean powder, an initial pH of 7.0, a fermentation temperature of 25 ℃, a liquid volume of 40 mL per 150 mL flask, and an inoculum size of 5% (v/v)—the chitinase activity reached 1026.72± 18.69 U/L, representing a remarkable increase of 3.51-fold compared to the original process. Enzyme characterization revealed optimal activity at 50 ℃ and pH5.0. Among the metal ions tested, Mg^{2+} and Fe^{3+} significantly enhanced enzyme activity, whereas Fe^{2+}, Mn^{2+}, and Cu^{2+} exhibited significant inhibitory effects (P<0.05). Additionally, the chemical agents of EDTA, SDS, and methanol markedly suppressed enzymatic activity (P<0.05). Thin-layer chromatography (TLC) analysis demonstrated that the hydrolysis products primarily consisted of chitin dimer and N-acetyl-D-glucosamine, suggesting that this enzyme functions as an exo-chitinase. This study successfully established a process for producing chitinase and preparing chitin oligosaccharide using *Streptomyces* strain GXUN-J3, offering a promising approach for high-value utilization of crustacean waste.

Key words: chitinase; *Streptomyces*; optimization of conditions; enzymatic properties; chitooligosaccharides

几丁质(chitin)又称甲壳素,是一种自然界含量丰富的天然高分子多糖,其结构类似于纤维素,由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖(N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc)通过 β-1,4 糖苷键连接形成,广泛存在于甲壳类动物外壳、昆虫外骨骼及真菌细胞壁中[1−2]。近年来,随着水产加工业的快速发展,每年可产生约 1×10^6 吨富含几丁质的甲壳类废弃物[3]。目前,少部分虾蟹壳经化学或生物法脱蛋白、脱矿后得到几丁质,几丁质再经化学法脱乙酰得到壳聚糖,进一步酶水解得到壳寡糖,广泛应用于农用、食品及医药等行业[4]。但多数甲壳类废弃物被直接丢弃或简单粉碎利用,造成了严重的环境污染和资源浪费[5]。而几丁寡糖保留了几丁质天然乙酰基结构,相较于壳寡糖,其生物学效应和应用前景更为显著[6]。已有研究证实,几丁寡糖具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节及植物防御诱导等功能[7−10]。因此,开发甲壳类生物质定向转化几丁寡糖技术,对实现海洋废弃物高值化利用具有重要战略意义。

传统工业制备几丁寡糖主要依赖强酸(如氢氟酸、硝酸)或强氧化剂(如过氧化氢)的化学法处理,该过程不仅能耗高、产物结构难以调控(常形成多聚体混合物),且伴随环境污染物及低分子量副产物的生成[11]。而酶法催化凭借其环境兼容性、底物专一性和催化精准性等优势,已成为绿色制备几丁寡糖的新兴策略。通过酶促反应定向裂解 β-1,4 糖苷键,可精准制备具有明确聚合度的几丁寡糖,这对开发高生物活性且水溶性优良的几丁质衍生物具有重要应用价值。

几丁质酶是特异性水解几丁质糖苷键以生成几丁寡糖或单糖的酶类统称,在细菌、真菌、病毒、昆虫、植物及动物等多种生物体内广泛存在,依据作用位点差异,几丁质酶可分为内切酶与外切酶两类[12]。内切几丁质酶随机切割几丁质长链内部位点,生成几丁寡糖;外切几丁质酶包含几丁二糖外切酶和 β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶,前者作用于几丁质长链非还原端,切割产生 N-乙酰-D-氨基葡萄糖二聚体 $(GlcNAc)_2$,后者则将内切几丁质酶生成的寡糖分解为 GlcNAc,进而代谢供能。虽有报道显示部分几丁质酶可单独将几丁质水解为 GlcNAc,但此类酶数量较少。绝大多数几丁质酶仅具单一活性,几丁质完全降解为 GlcNAc 需两种以上几丁质酶协同作用[13]。近年来,诸多产几丁质酶菌株被报道,如弧菌属(*Vibrio* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)等[14]。Du 等[15]研究表明,类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.)所产几丁质酶的最适 pH 为 4.5、最适温度为 50 ℃,酶解产物为 GlcNAc 和 $(GlcNAc)_2$;Guo 等[16]报道橙色微杆菌(*Micromonospora aurantiaca*)所产几丁质酶在 pH5.0、温度 55 ℃ 时活性最佳,水解产物为 GlcNAc 和 $(GlcNAc)_2$;Asmani 等[17]则发现高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis* KA15)产生的几丁质酶最适 pH 为 5.5、最适温度为 85 ℃,最终水解产物是 $(GlcNAc)_2$-$(GlcNAc)_5$ 的混合物。尽管几丁质生物转化技术已取得显著进展,但现存菌株大多存在酶活性低、稳定性差以及转化效率较低等问题,这极大地限制了其工业化应用[18]。筛选与开发高效降解几丁质的菌株,对于实现甲壳类废弃物资源的高值化利用以及推动绿色生物制造而言意义重大。

本研究旨在筛选出高产几丁质酶的菌株,并进行鉴定及产酶条件优化,进一步对菌株产酶性质及产物进行分析,为生物法或酶法降解制备几丁寡糖提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

将采集自广西北海南美白对虾底泥样品装入无菌样品袋后,于 4 ℃ 条件下带回实验室进行产几丁质酶菌株分离;粉末几丁质、酵母提取物、Chelex-100 上海源叶生物科技有限公司;N-乙酰-D-氨基葡萄糖(优级纯) 上海阿拉丁生化科技有限公司;其他均为国产分析纯。

1%(m/v)胶体几丁质的制备:称取 10 g 粉末几丁质,加 176 mL 浓盐酸搅拌均匀,4 ℃ 静置 24 h,8000 r/min 离心 5 min,取沉淀用去离子水反复洗至中性,最后用去离子水定容至 1000 mL,4 ℃ 保存备用。

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,NaCl 10.0,pH 自然;ISP2 培养基(g/L):麦芽糖 10.0,葡萄糖 4.0,酵母提取物 4.0,pH 自然;胶体几丁

质固体培养基(g/L)：胶体几丁质 4.0，$(NH_4)_2SO_4$ 2.0，K_2HPO_4 0.7，KH_2PO_4 0.3，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5，$FeSO_4·7H_2O$ 0.01，琼脂 20.0，pH 自然；产几丁质酶基础发酵培养基(g/L)：粉末几丁质 10.0，$(NH_4)_2SO_4$ 2.0，K_2HPO_4 0.7，KH_2PO_4 0.3，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5，$FeSO_4·7H_2O$ 0.01，pH 自然。

BSG-250 恒温培养箱　上海博讯医疗生物仪器股份有限公司；H1850 台式高速离心机　湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；Epoch 酶标仪　美国伯腾公司；MQD-S3NR 振荡培养箱　上海旻泉仪器有限公司；Master PCR 仪　德国艾本德公司。

1.2　实验方法

1.2.1　菌株的筛选

1.2.1.1　初筛　取采集样品 10 g 与 40 mL 无菌水混合，置于 35 ℃、200 r/min 振荡 30 min，稀释涂布至 LB 培养基，35 ℃ 培养 72 h 后挑选单菌落接至胶体几丁质固体培养基，于 30 ℃ 条件下培养 3~7 d 后测量透明圈直径(D)和菌落直径(d)，计算圈径比值(D/d)，根据 D/d 值大小初步筛选出产几丁质酶能力较强的菌株。

1.2.1.2　复筛　将产透明圈的菌株接种至基础发酵培养基，于 30 ℃、200 r/min 条件下振荡培养 72 h 后，测定菌株产几丁质酶活，复筛获得高产几丁质酶的菌株。

几丁质酶活测定：取 1 mL 发酵液，以 12000 r/min 离心 5 min 后，取 400 μL 上清液与 400 μL 浓度为 1% 的胶体几丁质充分混合，置于 50 ℃ 恒温水浴 15 min，反应完成后，迅速将其转移至沸水浴中处理 10 min；水冷后，以 12000 r/min 离心 5 min，取 200 μL 上清液，加入 300 μL DNS 试剂，再进行 8 min 的沸水浴处理。水冷后，取 200 μL 溶液在 540 nm 波长处测定吸光值，以煮沸灭活的发酵液作为空白对照。酶活力单位(U)定义为：在上述反应条件下，每分钟催化产生 1 μmol N-乙酰-D-氨基葡萄糖所需的酶量。同时，以 N-乙酰-D-氨基葡萄糖绘制标准曲线。

1.2.2　菌株的鉴定

1.2.2.1　形态学鉴定　将菌株接种于 ISP2 固体培养基，置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 96 h 后进行革兰氏染色，利用光学显微镜进行观察；通过斜面插片法在三区划线后的 ISP2 固体培养基中进行插片，35 ℃，培养 48 h，将盖玻片取出，用新鲜的 2.5% 戊二醛固定 90 min，分别用 30%、50%、70%、100% 无水乙醇脱色 15 min，放入干燥器内干燥，喷铂，于扫描电子显微镜下观察。

1.2.2.2　生理生化鉴定　基于形态学鉴定结果，实验菌株的系统分类学分析通过形态培养特征及生理生化特性测定完成，具体方法参照《链霉菌鉴定手册》及相关文献[19]。

1.2.2.3　分子生物学鉴定　将 ISP2 培养基中的单菌落转移至含 35 μL Chelex-100 的 300 μL 微量离心管中，经涡旋振荡 30 s 后，于金属浴中 99 ℃ 加热 40 min，之后 12000 r/min 离心 5 min 收集上清液，以 16S rRNA 通用引物(27F 和 1541R)作为扩增引物，以上述上清液作为 PCR 模版参照梁颖等[20] 的方法进行 PCR 扩增。反应程序：98 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 变性 1 min，55 ℃ 退火 1 min，72 ℃ 延伸 90 s，35 个循环；72 ℃ 终延伸 10 min，4 ℃ 保存。将 PCR 扩增产物送测，测序结果进行多序列比对后构建系统发育树。

1.2.3　单因素实验　产几丁质酶工艺优化在 150 mL 三角瓶中进行，在装液量 30 mL/150 mL，接种量 1%(v/v)，发酵初始 pH7.0，发酵温度 28 ℃，转速 200 r/min 条件下，研究不同因素对菌株 GXUN-J3 产几丁质酶的影响。最适碳源及浓度：以基础发酵培养基为对照，分别利用 1%(w/v)的不同碳源(葡萄糖、木薯淀粉、麦芽糖、果糖、乳糖)替代基础发酵培养基中的几丁质成分，其它因素不变，根据酶活结果确定最适碳源，再进行碳源浓度优化(1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%，w/v)；最适氮源及浓度：以基础发酵培养基为对照，分别加入 0.2%(w/v)的不同氮源(牛肉粉、胰蛋白胨、大豆粉、硝酸铵、氯化铵、硫酸铵)，其它因素不变，根据酶活结果确定最适氮源后再进行浓度优化(0、0.05%、0.1%、0.15%、0.20%、0.25%、0.3%，w/v)；最适培养温度：基础发酵培养基接种后分别置于 25、28、31、34 和 37 ℃ 培养，其它因素不变，根据酶活结果确定最适发酵温度；最适发酵初始 pH：分别调整基础发酵培养基的初始 pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0，其他发酵因素不变，根据酶活结果确定最适发酵初始 pH；最适装液量：分别调整基础发酵培养基的装液量为 30、40、50、60、70、80 mL/150 mL，其它因素不变，根据酶活结果确定最适装液量；最适接种量：将接种量分别调整为 1%、2%、3%、4%、5%(v/v)接种至基础发酵发酵培养基，其它因素不变，根据酶活结果确定最适接种量。

1.2.4　正交试验　根据单因素结果选取对几丁质酶活影响显著的 4 个因素(碳源浓度、氮源浓度、发酵温度、接种量)开展四因素三水平正交试验，正交表设计见表 1。以几丁质酶活力作为优化指标，探究菌株 GXUN-J3 发酵产几丁质酶的最佳工艺条件，并对获得最优条件进行验证。

表 1　正交试验因素水平设计

Table 1　Factor and level designed of orthogonal test

因素	水平		
	1	2	3
A：粉末几丁质浓度(%，w/v)	6.0	7.0	8.0
B：大豆粉浓度(%，w/v)	0.20	0.25	0.30
C：温度(℃)	25	28	31
D：接种量(%，v/v)	3	4	5

1.2.5 菌株 GXUN-J3 产几丁质酶粗酶液酶学性质分析

1.2.5.1 几丁质酶粗酶液的制备 取菌株 GXUN-J3 发酵液，于 4 ℃，12000 r/min 离心 10 min，收集上清。向上清中缓慢加入硫酸铵粉末并持续搅拌，使其硫酸铵饱和度达到 50%，于 4 ℃ 静置过夜。次日，于 4 ℃，10000 r/min 离心 30 min，所得沉淀为几丁质酶粗产物。用 pH7.0 的磷酸盐缓冲液溶解沉淀，得到粗酶液，4 ℃ 保存备用[20]。

1.2.5.2 温度对酶活性及稳定性的影响 将反应体系分别置于 30、40、50、60、70 ℃ 的温度条件下反应 15 min，测定不同温度下几丁质酶活力大小，确定最佳反应温度。同时，将粗酶液在上述温度梯度下恒温孵育 2 h，测定酶活力，以最高酶活力为 100%，计算不同温度下的相对酶活，观察其温度稳定性。

1.2.5.3 pH 对酶活性及稳定性的影响 取 pH4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的柠檬酸-磷酸缓冲液，与粗酶液按 1∶1 的体积比混合，在最适温度下测定几丁质酶活力，确定最适反应 pH。将粗酶液置于上述 pH 缓冲液中，在最适温度下恒温孵育 2 h，测定酶活力，以最高酶活力为 100%，计算不同 pH 条件下的相对酶活，观察其 pH 稳定性。

1.2.5.4 金属离子及生化试剂对酶活性的影响 将粗酶液分别置于终浓度为 5 mg/mL 和 10 mg/mL 的 Fe^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{3+}、K^{+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Cu^{2+}、Na^{+}金属离子溶液中孵育 2 h，测定几丁质酶活力，以未加金属离子时的酶活为 100%，计算添加不同金属离子后的相对酶活。

将粗酶液分别置于终浓度为 5 和 10 mg/mL 的乙二胺四乙酸（ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA）、十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS）、二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）、聚山梨酯 80（polysorbate 80，Tween 80）、甲醇、乙醇、丙酮、异丙醇生化试剂溶液中孵育 2 h，测定几丁质酶活力，以未加生化试剂时的酶活为 100%，计算添加不同生化试剂后的相对酶活。

1.2.5.5 酶的底物特异性 将粗酶液分别与浓度为 10 mg/mL 的胶体几丁质、粉末几丁质、片状几丁质、粉末壳聚糖、虾壳粉等底物反应，测定几丁质酶活力，以最高底物酶活 100%，计算其他底物的相对酶活，观察其底物特异性。

将粗酶液分别与 1%、2%、3%、4%、5%、6%（w/v）的胶体几丁质反应，测定几丁质酶活力，以最高底物浓度酶活为 100%，计算其他底物浓度的相对酶活，观察其底物浓度对酶活的影响。

1.2.5.6 薄层层析法（thin layer chromatography，TLC）测定酶解产物 以 10 g/L 胶体几丁质为底物，按 1∶1（v/v）与粗酶液混合，在 50 ℃ 分别反应 0、0.5、1、2、4、6、12、24 h。反应后沸水浴 10 min，再以 12000 r/min 离心 10 min，取上清在硅胶板上点样。以几丁寡糖为标样，将硅胶板放入层析缸，加入展层剂（冰乙酸∶正丁醇∶水∶氨水=13∶26∶13∶2，v/v）缓慢展开。当层析液距硅胶板上边缘 1 cm 时，结束层析。取出硅胶板，50 ℃ 烘干 10 min，均匀喷涂显色剂（二苯胺∶丙酮∶苯胺∶磷酸=1∶50∶1∶5），110 ℃ 烘干 10 min 显色。通过酶解产物与标样几丁寡糖在硅胶板上的分离位置比对，判断该几丁质酶为内切型或外切型。

1.3 数据处理

所有实验均设置三个生物学重复，实验结果以“平均值±标准差”表示。数据经 Microsoft Excel 2019 进行处理，随后采用 IBM SPSS Statistics 21.0 进行显著性分析和正交方差分析，用 GraphPad Prism 8 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 产几丁质酶菌株的筛选、鉴定

从采集的海虾养殖场底部淤泥中共筛选到 9 株可在胶体几丁质固体平板上产明显透明圈的菌株，菌

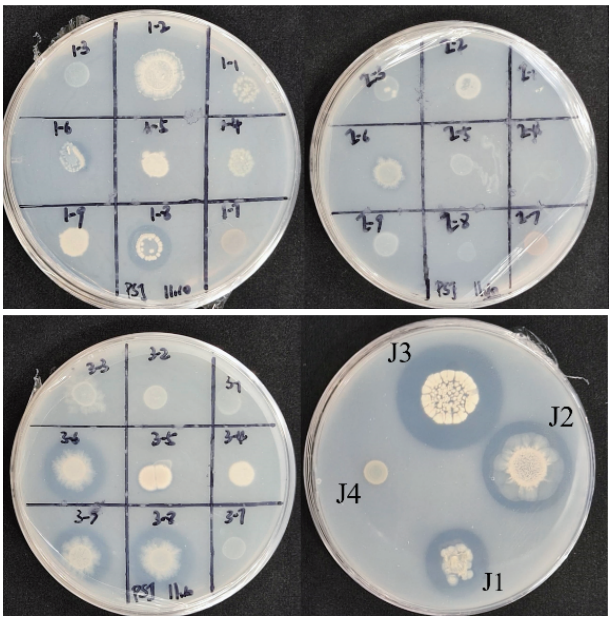


图 1 胶体几丁质固体平板初筛结果

Fig.1 Primary screening results of chitin solid plates in colloidal form

表 2 复筛菌株的几丁质酶活性测定

Table 2 Determination of chitinase activity in rescreened strains

菌株	圈径比（D/d）	酶活（U/L）
GXUN-J3	1.84±0.17^{a}	297.24±10.77^{a}
GXUN-3-9	1.55±0.09^{bc}	222.02±10.01^{b}
GXUN-J2	1.31±0.12^{d}	121.43±8.76^{c}
GXUN-3-8	1.51±0.11^{bc}	118.71±4.94^{c}
GXUN-3-6	1.47±0.14^{c}	99.68±4.43^{d}
GXUN-1-8	1.62±0.19^{b}	93.34±0.82^{d}
GXUN-J1	1.81±0.16^{a}	57.09±5.01^{e}
GXUN-2-6	1.09±0.14^{e}	34.43±2.60^{f}

注：同列不同字母表示差异显著$P<0.05$。

株 GXUN-J3 的 D/d 最大为 1.84±0.17（图 1、表 2），将其接种到几丁质发酵培养基中进行摇瓶复筛。以 N-乙酰-D-氨基葡萄糖标准品绘制标准曲线，y=2.4088x-0.1477，R^2=0.9971。菌株在几丁质基础发酵培养基中复筛结果如表 2 所示，菌株 GXUN-J3 展现出显著（P<0.05）高于其他菌株的几丁质酶活性（297.24±10.77 U/L），故将其确定为后续研究的菌株。

将菌株 GXUN-J3 在 ISP2 平板上进行划线接种，于 28 ℃ 培养 2 周。培养后，菌落呈现粉红色，表面干燥、不透明，隆起且紧密附着于培养基，难以挑取（图 2A），该菌株革兰氏染色呈阳性（图 2B），在测试培养基上分泌金黄色色素，形成具有广泛分支的基质菌丝体和气生菌丝。气生菌丝进一步分化为表面光滑的圆柱形孢子，排列成直孢子链（图 2C）。

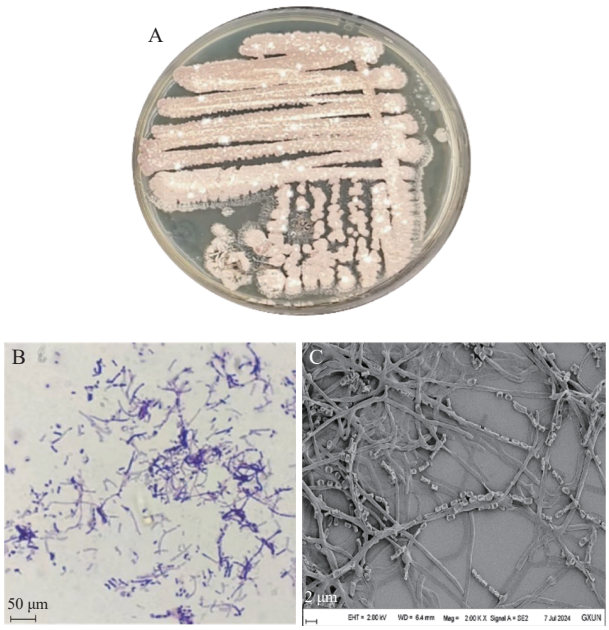


图 2　菌株 GXUN-J3 的形态学鉴定

Fig.2　Morphological identification of strain GXUN-J3

注：A：菌落形态图（ISP2 培养基）；B：革兰氏染色图（400×）；C：扫描电镜图（2000×）。

生理生化特性鉴定结果（表 3）显示，其生长温度范围为 20~40 ℃，可耐受的 pH 范围为 5.0~8.0，能在 0~4%（w/v）NaCl 的环境中生长；过氧化氢酶、纤维素水解酶、酪蛋白水解酶、明胶液化及硫化氢试验呈阳性，而 VP、MR、硝酸盐产气和淀粉水解酶试验呈阴性。该菌株能够以麦芽糖、葡萄糖、果糖、棉子糖、甘油和甘露糖作为唯一碳源进行生长，但无法利用蔗糖、木糖、海藻糖、甘醇、肌醇和半乳糖等碳源。

16S rRNA 序列比对表明，其与杨浦链霉菌（*Streptomyces yangpuensis* fd2-tb）的相似度高达 99%；进一步构建系统发育树结果显示菌株 GXUN-J3 与 *S. yangpuensis* fd2-tb 亲缘关系最为接近（图 3）。综合形态学、生理生化及 16S rRNA 序列分析结果，可将菌株 GXUN-J3 鉴定为链霉菌属（*Streptomyces* sp.）。

表 3　菌株生理生化特征分析

Table 3　Biochemical and physiological profiling of bacterial strains

项目名称	结果	碳源	结果
革兰氏染色	+	麦芽糖	++++
过氧化氢酶	+	葡萄糖	++++
淀粉水解酶	–	果糖	+++
纤维素水解酶	+	蔗糖	–
酪蛋白水解酶	+	棉子糖	++
明胶液化试验	+	木糖	–
VP、MR	–	甘油	+++
硫化氢试验	+	甘露糖	+++
硝酸盐产气	–	海藻糖	–
温度耐受性	20~40 ℃	甘醇	–
NaCl耐受性	0~4%	肌醇	–
pH耐受性	5.0~8.0	半乳糖	–

注：“–”结果为阴性；“+”结果为阳性；“++”结果为生长状态较差；“+++”结果为生长状态一般；“++++”结果为生长状态良好。

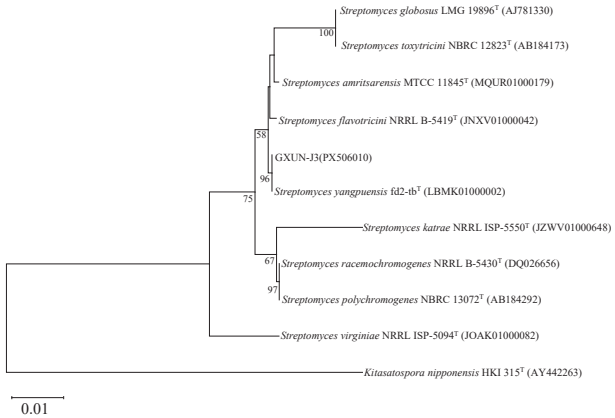


图 3　基于菌株 GXUN-J3 的 16S rRNA 序列构建的系统发育树

Fig.3　Phylogenetic tree constructed based on the 16S rRNA sequence of strain GXUN-J3

几丁质酶在几丁寡糖工业化生产中应用潜力巨大。当前，利用微生物产几丁质酶水解几丁质来生产几丁寡糖，是一种高效且环保的方法，已有研究表明几丁质酶已在多种生物体中被发现，如寡养单胞菌属（*Stenotrophomonas* sp.）[21]、嗜麦芽窄食单胞菌（*Stenotrophomonas maltophilia*）[22] 和淀粉酶链霉菌（*Streptomyces diastaticus*）[23] 等。本研究中，筛选获得的高产几丁质酶的菌株 GXUN-J3，其几丁质酶活性显著高于已报道的大部分菌株，显示出较强的产酶能力，在工业生产几丁寡糖上有较好的应用潜力。

2.2　单因素实验

碳源优化结果表明（图 4A），与其他碳源相比，粉末几丁质为碳源时，酶活力最高，这可能是由于几丁质酶作为一种诱导酶在几丁质的诱导下才能大量表达[5]；进一步浓度优化结果表明，当粉末几丁质添加量为 7%（w/v）时，菌株产酶活力最高，可达 947.77 U/L（图 4B）。最适氮源及浓度优化结果表明（图 4C、图 4D），该菌株产酶的最适氮源为 0.25%（w/v）大豆

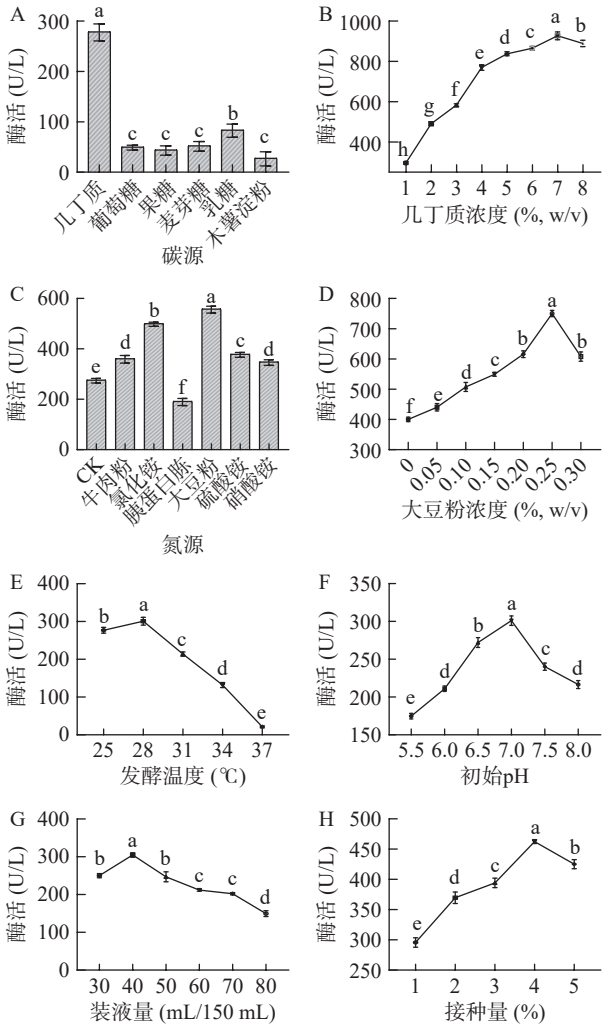


图 4 培养基组分与培养条件对链霉菌菌株几丁质酶合成的优化分析

Fig.4 Optimization of culture medium composition and fermentation parameters for chitinase biosynthesis in *Streptomyces* strains

注: A: 碳源; B: 几丁质浓度; C: 氮源; D: 大豆粉浓度; E: 培养温度; F: 培养基初始 pH; G: 装液量; H: 接种量; 不同字母代表组间存在差异显著(P<0.05), 图 5 同。

粉, 有研究表明与其它氮源相比, 大豆粉更容易被利用, 推测可能是因为大豆粉不仅能提供必要的氮元素, 还提供了很多必需的生长因子[21]。发酵温度优化结果如图 4E 所示, 当发酵温度低于 28 ℃ 时, 随着温度较高, 酶活迅速升高, 28 ℃ 时达到最大为 300.78 U/L; 但当温度高于 28 ℃ 时, 酶活随温度升高而迅速降低。因此, 菌株 GXUN-J3 发酵产酶的最适温度为 28 ℃, 这与大部分链霉菌的报道一致, 链霉菌发酵产酶的最适温度在 25~30 ℃[23]。当发酵初始 pH 低于 7.0 时, 随着 pH 升高, 菌株 GXUN-J3 产几丁质酶活性迅速升高, 初始 pH 为 7.0 时达到最大为 301.02 U/L; 但当 pH 高于 7.0 时, 酶活随 pH 升高而迅速降低, 推测可能是过高或过低的 pH 会影响菌株的生长进而导致酶活的降低。因此, 确定菌株 GXUN-J3 发酵产酶的最适初始 pH 为 7.0(图 4F)。装液量优化结果表明, 当装液量为 30~40 mL/150 mL 时, 酶活随装液量增加而升高; 但装液量高于 40 mL/150 mL 时, 酶活随装液量升高而显著下降(P<0.05), 可能是装液量太高时, 培养基中溶氧供应不足, 导致菌体生长受到影响, 从而导致产酶效率大幅下降[14]。因此, 确定菌株 GXUN-J3 产酶的最适装液量为 40 mL/150 mL(图 4G)。当接种量为 1%~4%(v/v)时, 菌株 GXUN-J3 产几丁质酶活力随接种量增加而升高; 但当接种量高于 4%(v/v)时, 酶活会迅速下降, 可能是由于过高的接种量会急剧消耗培养基中的氧气和营养物质, 从而导致菌株的酶活力降低[17]。因此, 确定菌株 GXUN-J3 发酵产几丁质酶的最适接种量为 4%(v/v)(图 4H)。

2.3 正交试验

根据单因素优化结果可知, 碳源浓度、氮源浓度、发酵温度、接种量、初始 pH 和装液量均对几丁质酶活具有显著影响(P<0.05), 但初始 pH 和装液量对酶活有负效应。因此, 本研究选取对酶活具有正效应的 4 个因素(碳源浓度、氮源浓度、发酵温度、接种量)开展四因素三水平正交试验。结果如表 4 所示, 通过极差分析(R 值)与方差分析(表 5)确定各因素主效应, 确定最优参数组合为: 6%(w/v)的粉末几丁质(A_1)、0.25%(w/v)的大豆粉(B_2)、培养温度 25 ℃

表 4 正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	酶活力(U/L)
1	1	1	1	1	767.00±20.01
2	1	2	3	2	680.58±34.27
3	1	3	2	3	828.81±45.98
4	2	1	3	3	485.53±33.97
5	2	2	2	1	686.58±45.20
6	2	3	1	2	658.97±10.08
7	3	1	2	2	617.56±23.41
8	3	2	1	3	795.21±16.16
9	3	3	3	1	645.17±16.22
K_1	2276.39	1870.08	2221.17	2098.74	
K_2	1831.07	2162.36	2132.95	1957.11	
K_3	2057.93	2132.95	1811.27	2109.55	
R	148.44	97.43	136.64	50.81	
主次顺序	A>C>B>D				
最佳组合	A_1	B_2	C_1	D_3	

表 5 正交试验方差分析结果

Table 5 Variance analysis result of orthogonal test

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
修正模型	258528.305[a]	8	32316.03814	36.081284	<0.001
截距	12670698.45	1	12670698.45	14147.002	<0.001
几丁质浓度	99164.58107	2	49582.29053	55.359282	<0.001
大豆粉浓度	51796.47601	2	25898.238	28.915725	<0.001
温度	93095.44132	2	46547.72066	51.971145	<0.001
接种量	14471.80675	2	7235.903375	8.0789817	0.003
误差	16121.61846	18	895.6454702		
总计	12945348.37	27			
修正后总计	274649.9236	26			

注: [a] 决定系数 R^2=0.941, 调整决定系数 R^2_{adj}=0.912。

(C_1)及 5%(v/v)的接种量(D_3), 对正交试验获得最佳条件进行验证实验, 测得酶活为 1026.72±18.69 U/L, 较初始条件(297.24±10.77 U/L)提升 2.51 倍。

产几丁质酶的菌株在实际应用中常面临酶活低、稳定性差等难题。以几丁质酶活力为关键指标, 通过优化发酵工艺来提高菌株产酶的活性, 有望显著提升几丁质废弃物的生物转化效率, 为资源化利用提供技术支持。张瑶心等[24]对无色杆菌属(*Achromobacter* sp.)ZWW8 进行研究, 经单因素条件优化后, 其胞外上清酶活力达 33.9 U/L, 为优化前的 8 倍。严佳佳[25]针对弧菌属(*Vibro* sp.)Y-8 中的两个几丁质酶 Chi1 和 Chi2 开展研究, 经发酵工艺优化后, Chi1 酶活力从 70 U/L 提升至 135 U/L, 为优化前的 1.92 倍; Chi2 酶活力从 73 U/L 提升至 123 U/L, 为优化前的 1.73 倍。本研究对 GXUN-J3 的发酵条件进行单因素、正交试验优化后, 酶活可达 1026 U/L, 较优化前提高 2.51 倍。为 GXUN-J3 菌株产几丁质酶的进一步开发利用提供了数据支持, 也为酶法降解虾壳废弃物生产几丁寡糖的深入探究提供了实验依据。

2.4　菌株 GXUN-J3 产几丁质粗酶液的酶学性质

2.4.1　最适反应温度和温度稳定性　如图 5A 所示, 当反应温度在 30~50 ℃ 时, 几丁质酶活随温度升高而逐渐增大, 50 ℃ 时达到最大; 但当温度高于 50 ℃, 酶活随反应温度升高而迅速降低。在低温条件下(<30 ℃), 酶与底物分子间运动速率的降低可能导致催化效率下降; 而高温环境(>50 ℃)下引起了酶分子高级结构的改变, 从而导致酶变性失活, 酶活降低。热稳定性分析结果(图 5B)显示, 该酶在 30~50 ℃ 孵育 2 h 后仍保持 85% 以上的活性, 当处理温度超过 50 ℃ 时, 酶活性下降至初始值的 50% 以下, 几丁质酶的热稳定性与其结构密切相关, 其一级结构和二级结构并不会因高温环境而产生变化, 但高温条件下三级结构和四级结构会遭到破坏, 最终导致几丁质酶活力的丧失[26]。

已有研究表明, 多数几丁质酶的最适反应温度范围为 40~60 ℃, 如苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) Bt028 菌株产几丁质酶最适温度 60 ℃[27]。本研究中 GXUN-J3 菌株产几丁质酶的

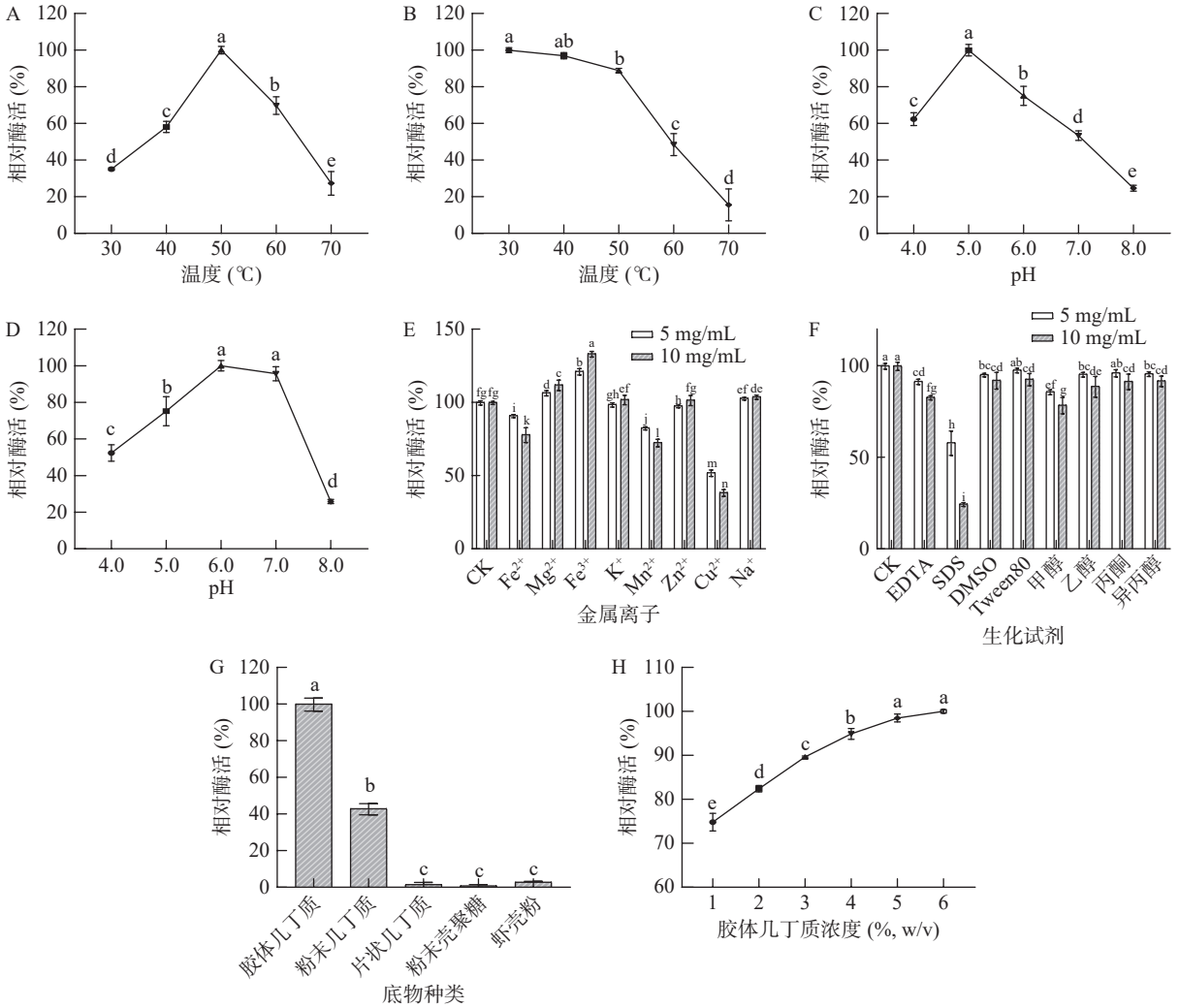


图 5　不同条件对酶活性及稳定性的影响

Fig.5　Effects of different conditions on enzyme activity and stability

注: A: 温度; B: 温度稳定性; C: pH; D: pH 稳定性; E: 金属离子; F: 生化试剂; G: 底物种类; H: 底物浓度。

最适温度为 50 ℃, 且在 30~50 ℃ 孵育 2 h 后仍具有较高的活性。此温度响应特性与鱼源假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*)C923 菌株所产酶类似, 后者在低于 45 ℃ 时稳定性显著优于高温条件[28]。

2.4.2 最适反应 pH 和 pH 稳定性 pH 对酶活性影响结果如图 5C 所示, 该酶在 pH 为 4.0~8.0 时, 都对几丁质具有一定的降解活性, 但当 pH 为 5.0, 酶活性最高, 因此, 该粗酶液最适 pH 为 5.0; pH 稳定性实验表明(图 5D), 在 pH6.0~7.0 缓冲体系中孵育 2 h 后, 相对酶活维持在 90% 以上, 显示出该酶在 pH6.0~7.0 范围内具有良好的 pH 稳定性, 但当 pH<6.0 和> 7.0 时, 相对酶活显著下降(P<0.05), 酶的稳定性较差, 可能是因为 pH 偏高或者偏低时会影响酶分子活性部位上有关基团的解离状态, 导致酶分子高级结构的构象变化, 最终引起催化功能的失活[29]。与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)B120 菌株产酶的最适 pH8.0 不同[30], 本研究分离的几丁质酶在 pH5.0 时活性最高, 且在 pH6.0~7.0 范围内维持较高稳定性。该特性表明该酶更适宜在中性偏酸环境中催化底物反应, 进一步印证了不同菌株产酶的最适 pH 存在显著差异。

2.4.3 金属离子对几丁质酶活力的影响 图 5E 显示不同金属离子对几丁质酶活性的影响, 在 5 mg/mL 和 10 mg/mL 浓度下, 大部分金属离子均能干扰几丁质酶的活性。具体而言, Mg^{2+}和 Fe^{3+}能显著提高酶活力(P<0.05), 相比于低浓度的 Mg^{2+}和 Fe^{3+}来说, 高浓度的 Mg^{2+}和 Fe^{3+}对该酶活的影响更加显著, 相对酶活力分别可达 112.12%、133.30%, 其中 Fe^{3+}的激活作用与 *B. thuringiensis* Bt028 菌株产酶特性具有一致性[27], 金属离子可能通过与酶蛋白形成稳定复合物或者参与活性中心构象调控酶活性, 在激活效应中, 金属离子可作为辅因子稳定活性中心结构, 同时通过结合变构位点增强酶-底物亲和力[31]。5 mg/mL 和 10 mg/mL 的 Fe^{2+}、Mn^{2+}、Cu^{2+}能显著抑制酶活力(P<0.05), 其中 10 mg/mL 的 Cu^{2+}则对酶活性的抑制尤为严重, 相对酶活力降低到原来的 38.62%, 这与陈苏南等[32] 的报道一致, Cu^{2+}是大多数几丁质酶的抑制剂, 其原因可能是金属螯合作用可能改变酶的三级结构, 降低催化位点的底物识别效率。

2.4.4 生化试剂对几丁质酶活力的影响 不同生化试剂对几丁质酶活性的影响如图 5F 所示, DMSO、Tween80、乙醇、丙酮、异丙醇对几丁质酶有一定的抑制效果, 而 EDTA、SDS、甲醇的抑制效果更加显著(P<0.05); 在 5 mg/mL 和 10 mg/mL 浓度的 EDTA 影响下, 相对酶活力降低为原来的 91.54%、82.84%, 表明该酶可能属于金属依赖性酶类, 其螯合作用导致必需金属离子的流失, 这与 Guo 等[33] 报道的 EDTA 对几丁质酶的抑制作用相似; 10 mg/mL 的 SDS 和甲醇对该几丁质酶的抑制效果分别可达 75.43% 和 21.48%, SDS 作为离子型表面活性剂能与蛋白质结合使蛋白质变性而沉淀, 甲醇则可能通过破坏酶蛋白的氢键网络, 诱导局部结构域变性失活[34], 生化试剂对该酶活的具体作用机制有待进一步深入研究。这些调控效应提示在工业化应用中需充分考虑环境因子对酶活性的影响。

2.4.5 底物特异性和最适底物浓度对几丁质酶活力的影响 如图 5G 所示, 几丁质酶对胶体几丁质显示出高度底物特异性, 其酶活力较粉末几丁质提升 1.3 倍, 而片状几丁质、粉末壳聚糖和虾壳粉的酶活力仅为胶体几丁质底物的 1.58%、0.82% 和 2.79%, 这与 Xie 等[35] 报道的几丁质酶 Chi23 相似, 由于天然几丁质致密的晶体结构, 绝大多数几丁质酶对天然几丁质都表现出有限的几丁质酶活力, 胶体底物的高催化效率推测源于粉末几丁质通过酸性预处理工艺破坏 β-1,4 糖苷键的三维晶体结构, 形成具有更高比表面积的无定形胶体形态, 更易于酶分子识别并结合其底物结合位点, 对片状几丁质和虾壳粉酶活较低的原因可能是片状几丁质的高结晶度及虾壳粉的复杂基质阻碍酶-底物结合, 对粉末壳聚糖几乎没有活性可能是基于外切酶的特异性催化机制, 该酶对壳聚糖底物缺乏有效催化能力[36]。由图 5H 可知, 在 1%~5% 浓度梯度范围内, 酶促反应初速度与底物浓度呈典型双曲线关系, 浓度超过 5% 后, 反应速率趋于稳定, 符合米氏动力学的底物饱和特征。

2.5 菌株 GXUN-J3 产几丁质粗酶液的酶解产物测定

薄层色谱分析显示(图 6), 菌株 GXUN-J3 分泌的几丁质酶对胶体几丁质底物呈现典型外切酶作用模式, 随反应时间延长(0~120 min), 水解产物中寡糖组分呈持续积累趋势, 其中几丁二糖的生成量在 120 min 内显著增加并达到平台期, 同时有少量 N-乙酰-D-氨基葡萄糖的存在, 酶学特性分析表明, 该酶系通过 β-1,4 糖苷键的外切模式催化底物降解, 终产物构成符合外切几丁质酶的典型特征。

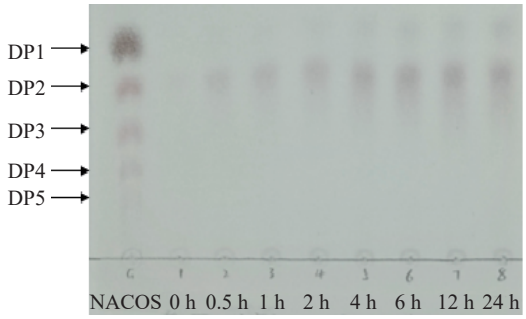


图 6 基于薄层色谱分析的几丁质酶酶解产物表征

Fig.6 Characterization of chitinase-catalyzed hydrolysates by thin-layer chromatographic analysis

注: NACOS: 几丁寡糖混合标准品; DP1: N-乙酰-D-氨基葡萄糖; DP2: 几丁二糖; DP3: 几丁三糖; DP4: 几丁四糖; DP5: 几丁五糖。

微生物几丁质酶根据其作用方式不同, 可分为内切几丁质酶和外切几丁质酶; 内切酶通过随机切割 β-1,4 糖苷键, 将几丁质分子降解为低分子量 N-乙酰氨

基葡萄糖寡聚物。外切酶根据催化特性差异分为两类：I 型外切酶从非还原端连续水解产生$(GlcNAc)_2$，II 型外切酶则特异性水解寡聚物生成 GlcNAc 单体[37]。现有研究表明微生物来源的几丁质酶以外切型为主，谢啟发等[38]报道厦门加莱菌（*Gallaecimonas xiamenensis*）分泌的几丁质酶可特异性水解胶体几丁质生成$(GlcNAc)_2$和 GlcNAc，He 等[39]研究发现轮虫弧菌（*Vibrio rotiferianus* Chi1557）几丁质酶对胶体几丁质具有外切酶活性，主要产物为$(GlcNAc)_2$，本研究中 GXUN-J3 菌株所产几丁质酶同样呈现典型外切酶特性，与文献报道的微生物几丁质酶作用模式一致，外切型几丁质酶作为几丁质降解体系的核心组分，在农业病虫害生物防治、功能性寡糖生物制备及甲壳类废弃物资源化利用等领域展现出重要应用潜力，本研究结果为 GXUN-J3 菌株的工业化产酶工艺优化及甲壳类生物质废弃物的高值化利用提供了理论支撑。

3　结论

本研究成功从广西海虾养殖场淤泥中筛选出一株高产几丁质酶的链霉菌 GXUN-J3，通过单因素及正交试验优化其发酵条件，最优条件下几丁质酶酶活可达 1026.72 U/L，是优化前酶活的 3.51 倍。酶学性质分析表明，该菌株所产几丁质酶的最适反应条件为 50 ℃、pH5.0，且具有典型外切酶特性，可高效水解几丁质生成几丁二糖与 N-乙酰-D-氨基葡萄糖；金属离子中Mg^{2+}与Fe^{3+}对酶活有激活作用，而化学试剂 EDTA、SDS 及部分金属离子则显著抑制酶活性。本研究不仅为几丁质酶的高效制备提供了优良菌株和工艺参数，也为甲壳类废弃物的资源化利用奠定了理论基础，在农业、食品及医药等领域的几丁寡糖绿色制造中具有潜在应用价值。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

［1］ AHMET K, HERMANN E. Patentology of chitinous biomaterials. Part I: Chitin[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 282: 119102.

［2］ ISLEM Y, MARGUERITE R. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications[J]. Marine Drugs, 2015, 13(3): 1133−1174.

［3］ 张爽. 2016–2020 年海水养殖发展分析[J]. 河北渔业, 2022(4): 34−37. ［ZHANG S. Analysis of mariculture development from 2016 to 2020[J]. Hebei Fisheries, 2022(4): 34−37.］

［4］ 邓俊劲. 新型蛋白酶及几丁质酶的开发及其在虾加工废弃物中的应用[D]. 广州：华南理工大学, 2020. ［DENG J J. Development of novel protease and chitinase and their application in shrimp processing waste[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.］

［5］ GAO M Y, TANG H Q, ZHU H G. Advances in extraction, utilization, and development of chitin/chitosan and its derivatives from shrimp shell waste[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23(5): e70008.

［6］ DENG J J, MAO H H, FANG W, et al. Enzymatic conversion and recovery of protein, chitin, and astaxanthin from shrimp shell waste[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 271: 122655.

［7］ AN-SHU C, TADAO T, HIROKAZU O, et al. Pharmacokinetics of chitobiose and chitotriose administered intravenously or orally to rats[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2005, 28(3): 545−548.

［8］ XIONG C N, WU H G, WEI P, et al. Potent angiogenic inhibition effects of deacetylated chitohexaose separated from chitooligosaccharides and its mechanism of action *in vitro*[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(15): 1975−1983.

［9］ ARAYA R, JANTANA W, ROBERT C. R, et al. Structural and thermodynamic insights into chitooligosaccharide binding to human cartilage chitinase 3-like protein 2 (CHI3L2 or YKL-39)[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(5): 2617−2629.

［10］ KAGEYAMA C, KATO K, IYOZUMI H, et al. Photon emissions from rice cells elicited by N-acetylchitooligosaccharide are generated through phospholipid signaling in close association with the production of reactive oxygen species[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(11−12): 901−909.

［11］ ISLAM N, HOQUE M, TAHARAT S F. Recent advances in extraction of chitin and chitosan[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 39(1): 28.

［12］ 王琳, 陈雅如, 程湄婕, 等. 微生物几丁质酶研究进展及应用[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(12): 101−110. ［WANG L, CHEN Y R, CHENG M J, et al. Research progress and application of microbial chitinase[J]. China Biotechnology, 2022, 42(12): 101−110.］

［13］ 周玉玲, 蒋思婧, 贺妮莎, 等. 微生物几丁质酶研究进展及其在 N-乙酰氨基葡萄糖制备中的应用[J]. 微生物学报, 2021, 61(8): 2192−2204. ［ZHOU Y L, JIANG S J, HE N S, et al. Advances in microbial chitinases and their application in N-acetylglucosamine production[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(8): 2192−2204.］

［14］ 卢传琦. 海洋产几丁质酶菌株的筛选鉴定、基因组分析及几丁质酶酶学性质评价[D]. 武汉：武汉轻工大学, 2024. ［LU C Q. Screening, identification, genomic analysis of marine chitinase-producing strains and enzymatic characterization of chitinase[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2024.］

［15］ DU J H, DUAN S, MIAO J Y, et al. Purification and characterization of chitinase from *Paenibacillus* sp.[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2021, 68(1): 30−40.

［16］ 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.

［17］ ASMANI K L, BOUACEIM K, OUELHADJ A, et al. Biochemical and molecular characterization of an acido-thermostable endo-chitinase from *Bacillus altitudinis* KA15 for industrial degradation of chitinous waste[J]. Carbohydrate Research, 2020, 495: 108089.

［18］ 宋阳, 陈梦, 吴新财, 等. 产几丁质酶菌株 *Acinetobacter* sp. CZW011 的筛选鉴定与酶学性质研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(11): 1−8. ［SONG Y, CHEN M, WU X C, et al. Screening, identification and enzymatic properties of chitinase-producing strain *Acinetobacter* sp. CZW011[J]. China Food Additives, 2022, 33(11): 1−8.］

［19］ 蒋茜. 海洋放线菌 GY-4 的鉴定及其抗菌物质研究[D]. 南

京: 南京农业大学, 2011. [JIANG Q. Identification of marine actinomycete GY-4 and research on its antimicrobial substances[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.]
[20] 梁颖, 刘睿, 宋超东, 等. 高产壳聚糖酶菌株筛选鉴定、条件优化及酶学性质分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(20): 157−166. [LIANG Y, LIU R, SONG C D, et al. Screening and identification of high-yield chitosanase-producing strain, optimization of fermentation conditions and analysis of enzymatic properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(20): 157−166.]
[21] 赵倩, 丁志雯, 钱亮亮, 等. 海洋产几丁质酶菌株 *Stenotrophomonas nitritireducens* CZW003 的筛选、鉴定及酶学特性研究[J]. 中国调味品, 2023, 48(2): 15−19,25. [ZHAO Q, DING Z W, QIAN L L, et al. Screening, identification and enzymatic characteristics of marine chitinase-producing strain *Stenotrophomonas nitritireducens* CZW003[J]. China Condiment, 2023, 48(2): 15−19,25.]
[22] 祁红兵, 张敏怡. 海水中降解几丁质细菌的筛选鉴定及培养条件优化[J]. 安徽农业科学, 2024, 52(16): 1−5. [QI H B, ZHANG M Y. Screening and identification of chitin-degrading bacteria in seawater and optimization of culture conditions[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2024, 52(16): 1−5.]
[23] 李芹, 王立梅, 齐斌. 淀粉酶链霉菌几丁质酶克隆表达及催化功能分析[J]. 食品与机械, 2022, 38(5): 1−7. [LI Q, WANG L M, QI B. Cloning, expression and catalytic function analysis of chitinase from *Streptomyces diastaticus*[J]. Food & Machinery, 2022, 38(5): 1−7.]
[24] 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, 2021, 37(4): 96−106. [ZHANG Y X, WANG L J, ZHENG W, et al. Fermentation and enzymatic properties of chitinase-producing *Achromobacter* ZWW8[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(4): 96−106.]
[25] 严佳佳. 产几丁质酶细菌鉴定及其肉葡萄球菌表达研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2023. [YAN J J. Identification of a chitinase-producing bacterium and its heterologous expression in staphylococcus carnosus[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2023.]
[26] QI Z M, LEI B, XIONG M, et al. High-level production of chitinase by multi-strategy combination optimization in *Bacillus licheniformis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 40(6): 181.
[27] 徐勤茜, 朱国威, 赵梓伶, 等. 酸橙内生菌 *Bacillus thuringiensis* Bt028 几丁质酶的分离纯化及其酶学性质[J]. 食品工业科技, 2022, 43(11): 159−166. [XU Q Q, ZHU G W, ZHAO Z L, et al. Purification and enzymatic properties of chitinase from endophytic *Bacillus thuringiensis* Bt028 of citrus aurantium[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(11): 159−166.]
[28] 薛家威, 温崇庆, 王玲, 等. 杀鱼假交替单胞菌 C923 几丁质酶基因 *PpchiC* 的克隆表达与酶学性质[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 91−106. [XUE J W, WEN C Q, WANG L, et al. Cloning, expression and enzymatic properties of chitinase gene *PpchiC* from *Pseudoalteromonas piscicida* C923[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 91−106.]
[29] YASSER A, FAIZA A, FAIZA N. Partial purification and characterization of chitinase produced by *Bacillus licheniformis* B307[J]. Heliyon, 2020, 6(5): e03858.
[30] 连文浩, 林娟, 王国增, 等. 产几丁质酶微生物的筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(3): 82−89. [LIAN W H, LIN J, WANG G Z, et al. Screening, identification and enzymatic properties of chitinase-producing microorganisms[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(3): 82−89.]
[31] MINGUET-LOBATO M, MINGUET-LOBATO M CERVANTES F V, et al. Chitinous material bioconversion by three new chitinases from the yeast *Mestchnikowia pulcherrima*[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): 31.
[32] 陈苏南, 冷凯良, 闫鸣艳, 等. 海洋菌株 *Aeromonas* sp. YS-54 来源几丁质酶的制备与性质研究[J]. 食品工业科技, 2024, 45(16): 182−190. [CHEN S N, LENG K L, YAN M Y, et al. Preparation and characterization of chitinase from marine strain *Aeromonas* sp. YS-54[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(16): 182−190.]
[33] GUO X X, XU P, ZONG M H, et al. 2017. Purification and characterization of alkaline chitinase from *Paenibacillus pasadenensis* CS0611[J]. Chinese Journal of Catalysis, 38(4): 665−672.
[34] MAHAJAN G, THADIYAN V, BISHT T, et al. Microbially derived chitinases: Multifunctional enzymes for biocontrol, bioremediation, and sustainable industrial applications[J]. Environmental Sustainability and Biotechnology: Opportunities and Challenges, 2025: 165−199.
[35] 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.
[36] XIE X H, FU X, YAN X Y, et al. A broad-specificity chitinase from *Penicillium oxalicum* k10 exhibits antifungal activity and biodegradation properties of chitin[J]. Marine Drugs, 2021, 19(7): 356.
[37] 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. Research progress, application and prospect of microbial chitinase[J]. Biotic Resources, 2020, 42(5): 494−504.]
[38] 谢啟发, 薛小旭, 黄志发, 等. 海洋产几丁质酶厦门加西利亚单胞菌 Chi34 的筛选、鉴定及酶学性质分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 116−123. [XIE Q F, XUE X X, HUANG Z F, et al. Screening, identification and enzymatic properties of marine chitinase-producing *Gallaecimonas xiamenensis* Chi34[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(12): 116−123.]
[39] HE X X, YU M, WU Y H, et al. Two highly similar chitinases from marine *Vibrio* species have different enzymatic properties[J]. Marine Drugs, 2020, 18(3): 139.