2026, 66(10): 5237-5254
CSTR: 32112.14.j.AMS.20260245
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20260245

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Research Article 研究报告

耐受盐芽孢杆菌壳聚糖酶的表达、酶学性质及其产物功能分析

欧玲，张红岩，韦玉玲，王韬闵，黄莹，张佳艳，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

欧玲, 张红岩, 韦玉玲, 王韬闵, 黄莹, 张佳艳, 申乃坤. 耐受盐芽孢杆菌壳聚糖酶的表达、酶学性质及其产物功能分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(10): 5237-5254.

OU Ling, ZHANG Hongyan, WEI Yuling, WANG Taohong, HUANG Ying, ZHANG Jiayan, SHEN Naikun. Expression, enzymatic properties, and product functions of a chitosanase from *Bacillus halotolerans*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(10): 5237-5254.

摘　要：【目的】实现壳聚糖酶(chitosanase, Csn; EC 3.2.1.132)的高效表达与功能开发。【方法】从耐受盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*) GXK615 中克隆壳聚糖酶基因(*CsnBh*)，并在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中实现重组表达。【结果】通过镍离子亲和层析对重组酶 CsnBh 进行分离纯化，纯化后该酶比活力达到 400.47 U/mg，纯化倍数为 3.03。酶学性质研究表明，该酶对胶体壳聚糖表现出高度专一性，CsnBh 的最适反应温度和 pH 分别为 40 ℃和 6.0，且在 30−70 ℃及 pH 5.0−9.0 范围内稳定性良好；Mn^{2+}能显著提高其酶活，而 Cu^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}则完全抑制其活性。水解模式分析表明，该酶为内切型糖苷水解酶，水解终产物主要为壳三糖至壳五糖的壳寡糖(chitooligosaccharide, COS)；进一步研究发现，COS 对大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)均具有显著的抑制作用，并且有效提高烟草超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)等防御酶的活性。【结论】本研究为壳聚糖酶的高效表达及壳寡糖的绿色制备与应用提供了理论依据和候选酶源。

关键词：壳聚糖酶；耐受盐芽孢杆菌；异源表达；酶学性质；产物功能

资助项目：国家自然科学基金(32560023)；广西壮族自治区“尖峰”行动计划(桂科JF2504850012)；广西民族大学大学生创新创业训练计划(202310608017, S202510608309)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32560023), the Guangxi Zhuang Autonomous Region “Jianfeng” Action Plan (JF2504850012), and the Provincial College Student Innovation and Entrepreneurship Project of Guangxi Minzu University (202310608017, S202510608309).

*Corresponding author. E-mail: shennaik05@126.com

Received: 2026-03-25; Accepted: 2026-04-17; Published online: 2026-05-19

Expression, enzymatic properties, and product functions of a chitosanase from *Bacillus halotolerans*

OU Ling, ZHANG Hongyan, WEI Yuling, WANG Taohong, HUANG Ying, ZHANG Jiayan, SHEN Naikun*

Guangxi Key Laboratory for Polysaccharide Materials and Modification, School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi Minzu University, Nanning, Guangxi, China

Abstract: [Objective] To achieve efficient expression and comprehensive functional characterization of chitosanase (Csn, EC 3.2.1.132). **[Methods]** The chitosanase gene (*CsnBh*) was cloned from *Bacillus halotolerans* GXK615 and heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). **[Results]** Following purification *via* nickel-affinity chromatography, the recombinant CsnBh exhibited a specific activity of 400.47 U/mg, which represented 3.03-fold purification. Enzymatic characterization revealed that CsnBh demonstrated high specificity toward colloidal chitosan, with optimal activity observed at 40 ℃ and pH 6.0. The enzyme demonstrated remarkable thermal stability across a broad temperature range (30−70 ℃) and pH stability over pH 5.0−9.0. Among the metal ions tested, Mn^{2+} significantly enhanced enzymatic activity, whereas Cu^{2+}, Fe^{2+}, and Fe^{3+} completely inhibited the activity. Hydrolysis pattern analysis confirmed an endo-acting cleavage mechanism, with chitotriose to chitopentaose identified as the predominant oligosaccharide products. Further investigation showed that the chitooligosaccharide (COS) mixture generated by CsnBh-mediated hydrolysis exerted potent inhibitory effects against *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Phytophthora nicotianae*. Moreover, COS treatment significantly upregulated the activities of key plant defense-related enzymes, including superoxide dismutase, peroxidase, and phenylalanine ammonia-lyase, in tobacco leaves. **[Conclusion]** This study establishes both a robust theoretical foundation and a highly promising enzyme candidate for the efficient production of chitosanases and the green synthesis and application of bioactive COSs.

Keywords: chitosanase; *Bacillus halotolerans*; heterologous expression; enzymatic property; product function

壳聚糖又称脱乙酰甲壳素，在自然界中广泛存在，表现出碱性多糖类化合物的特征，其结构单元主要是由 *N*-乙酰氨基葡萄糖和 D-氨基葡萄糖通过 β-1,4 糖苷键连接而成，主要存在于虾、蟹等甲壳类动物的坚硬外壳中，同样也可见于昆虫的外骨骼以及部分真菌的细胞壁[1]。壳聚糖经降解后可获得聚合度(degree of polymerization, DP)介于 2−20 之间的壳寡糖，其分子量一般不超过 3 900 Da。与壳聚糖相比，壳寡糖分子量较小，水溶性较好，具有抗菌、抗氧化、诱导植物抗性等功能而广泛应用于农业、食品和医药等领域[2]。

壳聚糖酶来源广泛，在植物、病毒和微生物均有发现，但主要来源于微生物[3-4]。现有报道中壳聚糖酶的分子量通常集中在 20.00−75.00 kDa 范围内，且通常不具备亚基结构[5]。壳聚糖酶属于糖苷水解酶类，能够特异性水解壳聚糖间的糖苷键，根据氨基酸序列的相似性可分为 7 个

✉ actamicro@im.ac.cn, ☏ 010-64807516

糖苷水解酶家族(glycoside hydrolase family，GH家族)，分别为GH3、GH5、GH7、GH8、GH46、GH75和GH80家族，包括2类：从还原端对壳聚糖链中的β-1,4糖苷键进行随机切割，属于内切型壳聚糖酶，该类型酶能够产生不同聚合度的壳寡糖产物；另一类外切型壳聚糖酶则是从非还原端切割β-1,4糖苷键，最终产物为氨基葡萄糖单体[3]。

近年来已成功筛选到多株高产壳聚糖酶的菌株[6-8]，但野生型菌株产酶水平普遍较低，难以满足工业需求。从微生物中克隆壳聚糖酶基因并在异源宿主中进行重组表达是实现其高效生产的关键技术手段。例如，Wang等[9]将来源于莫哈韦芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*) SY1的壳聚糖酶CsnBm在毕赤酵母(*Pichia pastoris*) X33中实现了高水平表达，该重组菌株在高密度发酵条件下酶活性达到了542.70 U/mL。Zhang等[10]将来源于烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)的壳聚糖酶基因整合到酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)基因组中，成功实现了该真菌酶的稳定表达。目前芽孢杆菌属壳聚糖酶的异源表达研究较多，但表达的壳聚糖酶热稳定性大多较差，多数只能在50 ℃及以下保持较好的稳定性[11-14]，限制了壳聚糖酶的生产和应用。

壳寡糖在农业、食品和生物医药方面均有广泛应用，其制备方法主要有物理法、化学法[15-16]和酶解法，前2种方法面临环境污染问题，且寡糖类物质的获得率处于较低水平，副产物的生成量较多。相较而言，采用酶法进行壳寡糖的制备显现出明显优势：反应条件较为温和，对生态环境的不良影响较小，产物收率较高，已成为当前壳寡糖制备领域的主要方法。壳聚糖酶是酶法生产壳寡糖的关键酶[3]，鉴于壳寡糖在多个领域的重要应用价值，筛选高活性壳聚糖酶并提升其表达效率是酶法制备壳寡糖的研究热点。本实验室筛选出一株高产壳聚糖酶的耐受盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*) GXK615，但野生型菌株产酶水平较低，为提高该酶的产酶水平，本研究拟克隆耐受盐芽孢杆菌的壳聚糖酶基因，在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行异源表达，并进一步探究重组酶的酶学性质，同时分析酶解产物壳寡糖的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

耐受盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*) GXK615、烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)由本实验室筛选并保存；大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由本实验室提供；质粒pET-22b(+)由本实验保存，*E. coli* Top10和*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

壳聚糖(脱乙酰度90%)、壳寡糖、氨基葡萄糖盐酸盐，上海源叶生物科技有限公司；2×Superstar Plus PCR Mix、2×FidCycle高保真PCR Mix、快速质粒小提试剂盒、细菌基因组DNA提取试剂盒、DNA纯化回收试剂盒，天根生物科技(北京)有限公司；限制性内切酶*Nde* I和*Hin*d III、T4 DNA连接酶，北京全式金生物技术有限公司；镍亲和层析柱，宝日医生物技术(北京)有限公司。

T100 Thermal Cycle PCR仪、凝胶成像仪，上海伯乐生命医学产品有限公司；JY-SPCT电泳仪，北京君意东方电泳设备有限公司；Epoch酶标仪，BioTek公司；超声波细胞破碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 CsnBh的生物信息学分析

采用多种生物信息学工具对CsnBh的氨基酸序列进行分析。使用ESPrint3.0 (https://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php)进行多序列比对，明确其保守区域；通过SignalP 6.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/)预测其信号

肽切割位点；利用 ProtParam (https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam)预测 CsnBh 的理论分子量和等电点，借助 InterProScan (https://www.ebi.ac.uk/interpro/)注释其功能结构域；通过 AlphaFold 3 (http://alphafoldserver.com)预测 CsnBh 的三维结构。使用 MEGA 11 软件确定 CsnBh 在 GH46 家族中的位置，系统发育树采用邻接(neighbor-joining)法构建，Bootstrap 检验设置为 1 000 次。

1.3 耐受盐芽孢杆菌 GXK615 壳聚糖酶基因克隆及重组表达载体的构建

根据 NCBI 公布的 *B. halotolerans* 壳聚糖酶基因序列(GenBank 登录号为 NZ_CP029364.1)，结合表达载体 pET-22b(+)的多克隆位点特征，利用 SnapGene 软件设计特异性引物 CsnBh-F (5′-CCAAGCTTATTGATTACAAAATTACCGTATTCC-3′，下划线为 *Hin*d III酶切位点)和 CsnBh-R (5′-CCCATATGAAAATCAGTTTGAAGAAAAAAACG-3′，下划线为 *Nde* I酶切位点)。按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 *B. halotolerans* GXK615 的基因组 DNA，以 *B. halotolerans* GXK615 基因组为模板，通过聚合酶链式反应(PCR)扩增目的基因片段。PCR 反应体系(25.0 μL)：2×FidCycle Mix 12.5 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL，DNA 模板 1.0 μL，ddH_2O 9.5 μL。PCR 反应条件：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 1 min，57 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 1 min，35 个循环；72 ℃终延伸 10 min。将 PCR 产物用质量分数为 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

使用 DNA 纯化试剂盒对扩增得到的壳聚糖酶基因产物进行纯化，随后使用 *Nde* I和 *Hin*d III对其进行双酶切处理，并与经相同双酶切的 pET-22b(+)载体进行连接，构建重组表达载体。将连接产物转化至 *E. coli* Top10 感受态细胞，挑取转化子进行菌落 PCR 验证(T7-F: 5′-TAATACGACTCACTATAGG-3′；T7-TER: 5′-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3′)，并提取重组质粒，使用 *Nde* I和 *Hin*d III进行双酶切验证，将验证正确的质粒交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。

1.4 重组蛋白的表达与诱导条件优化

将经过测序验证的重组质粒 pET-22b(+)-*CsnBh* 转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞，获得重组菌株。将该菌株接种于 10 mL 含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37 ℃、200 r/min 培养 12−16 h 制备种子液。按体积分数为 1% 的接种量将种子液接种至 100 mL LB 液体培养基中，添加相同质量浓度的氨苄青霉素，37 ℃、200 r/min 培养至菌液 OD_{600} 为 0.6 左右时，添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)使其终浓度为 0.5 mmol/L，并将培养温度调整至 16 ℃，诱导表达 16 h，4 ℃、8 000 r/min 离心 10 min 后收集菌体，通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对表达产物进行检测。

采取单一变量法依次优化 IPTG 浓度、OD_{600}、诱导温度及诱导时间以提升目的蛋白的表达效率。其中，IPTG 浓度分别为 0、0.1、0.3、0.5、1.0、1.5 mmol/L；OD_{600} 分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0；诱导温度分别为 16、20、25、30、37 ℃；诱导时间分别为 4、8、12、16、20、24 h。

1.5 重组蛋白的纯化

将在最佳诱导条件下表达的菌体用预冷的细胞破壁缓冲液[1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 20 mL；4 mol/L NaCl 125 mL；无菌水定容至 1 L]重悬，在冰浴条件下进行超声破碎(功率 250 W，工作 5 s，间隔时间 10 s)，超声破碎 30 min 至菌液澄清，随后 4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min 并收集上清液，并通过镍柱亲和层析法纯化上清液中的 CsnBh，将镍柱洗脱后的蛋白溶液进一步使用超滤管(截留分子量 10.00 kDa)进行脱盐处理(以 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液置换 3 次)，去除洗脱缓冲液中的咪唑后用于后续酶学性质测定实验，将纯化后的 CsnBh 进行 SDS-PAGE 检测。

1.6 壳聚糖酶活力测定

采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定酶活。取 400 μL 稀释 250 倍的酶液与 400 μL 10 g/L 胶体壳聚糖混合，于 50 ℃反应 15 min，反应结束后取 200 μL 反应液与 300 μL DNS 溶液混合，沸水浴处理 10 min，随后立即置于流动冷水中将其冷却，12 000 r/min 离心 3 min 以除去未反应底物，取 200 μL 上清液测量 OD_{540} 吸光值。对照组设置为：经沸水浴灭活处理的酶液作为空白对照，其余操作步骤与上述一致。根据标曲公式(y=0.278 7x−0.118 1, R^2=0.994 1)计算生成的还原糖含量。壳聚糖酶酶活定义：在上述反应条件下 1 mL 酶液在 1 min 内反应生成 1 μmol 还原糖所需的酶量为 1 个酶活单位(U/mL)。

1.7 CsnBh 的酶学性质

1.7.1 底物特异性

为分析 CsnBh 的底物特异性，选取粉末壳聚糖、胶体壳聚糖、粉末几丁质、胶体几丁质、可溶性淀粉及羧甲基纤维素钠作为底物，其质量浓度均为 10 g/L。在 50 ℃条件下分别用酶液与不同底物反应 15 min 后测定酶活力。以最高酶活为 100%，计算不同底物下的相对酶活力。

1.7.2 最适温度和温度稳定性

在 30、40、50、60、70、80、90 ℃条件下分别测定酶活力。为评估温度稳定性，将酶液在上述各温度下分别保温处理 30 min 和 60 min 后在最适反应温度下测定剩余酶活。以未进行保温处理的酶液测得的酶活为 100%，计算不同温度处理后的相对酶活力。

1.7.3 最适 pH 和 pH 稳定性

分别配制 0.05 mol/L 的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.0、5.0、6.0)、PBS 缓冲液(pH 6.0、7.0、8.0)及 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0、9.0)。在最适反应温度下，测定 CsnBh 在上述 pH (4.0−9.0)范围内的酶活力。为评估 pH 稳定性，将酶液与不同 pH 缓冲液在室温下孵育 2 h 后，在最适条件下测定其剩余酶活。以未经孵育的酶液测得的酶活为 100%，计算不同 pH 条件下的相对酶活力。

1.7.4 金属离子对酶活力的影响

配制 0.2 mol/L 的 Na^+、Zn^{2+}、Mn^{2+}、Ba^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、K^+、Co^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}及 Fe^{3+}离子盐溶液。将各离子溶液分别加入酶液中，使其终浓度分别为 1.0 mmol/L 和 5.0 mmol/L，室温孵育 30 min 后测定剩余酶活力。以未添加金属离子测定的酶活为 100%，计算各金属离子条件下的相对酶活力。

1.7.5 化学试剂对酶活力的影响

分别配制 0.2 mol/L 十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)及 20% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、吐温-80(Tween-80)、异丙醇。将各溶液分别与酶液混合，使其终浓度分别为 1.0 mmol/L 和 5.0 mmol/L，室温孵育 30 min 后测定剩余酶活力。以未添加化学试剂测定的酶活为 100%，计算不同化学试剂条件下的相对酶活力。

1.7.6 壳聚糖酶的酶促动力学分析

配制不同质量浓度的胶体壳聚糖溶液(1、2、4、8、10、15、20、30、40、50 g/L)，将酶液与上述不同质量浓度的胶体壳聚糖溶液在最适条件下进行反应，反应 15 min。采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算得出壳聚糖酶的 V_{max} 和 K_m 值。

1.7.7 薄层层析(thin layer chromatography, TLC)分析

以 10 g/L 胶体壳聚糖为底物，在 50 ℃下用酶液处理底物 0、0.25、0.50、1.00、2.00、24.00 h。反应结束后沸水浴灭酶 30 min，随后 12 000 r/min 离心 3 min 以除去未反应底物。采用薄层层析法分析产物：用毛细管吸取反应液于硅胶板上点样，同时以 $GlcN_{2-6}$ 标准品及盐酸

氨基葡萄糖溶液作为对照。充分干燥后置于层析缸中用展层剂(异丙醇:氨水:水=12:6:0.8)充分展开。取出硅胶板充分干燥后均匀喷洒 0.5% 茚三酮乙醇溶液，于 110 ℃烘箱中加热 10 min 进行显色。通过对比酶解产物与标样壳寡糖及盐酸氨基葡萄糖在层析板上的位置，判断壳聚糖酶类型。

1.8 CsnBh 水解产物的抗菌及植物诱导抗性

1.8.1 壳寡糖溶液的制备

以 100 g/L 的胶体壳聚糖为底物，加入适量酶液于 40 ℃反应 30 min，反应结束后沸水浴灭活酶液 30 min，10 000 r/min 离心 5 min 以除去未反应的壳聚糖。旋蒸浓缩后将样品置于−80 ℃冷冻 24 h，最后通过冷冻干燥获得壳寡糖粉末。称取 0.2 g 壳寡糖粉末，用 1 mL 无菌水溶解后即得到 200 mg/mL 的壳寡糖母液，将母液分别稀释成不同质量浓度的壳寡糖溶液，使用 0.22 μm 水系膜过滤待用。

1.8.2 壳寡糖的抑菌活性

使用抑菌圈法评估 CsnBh 水解产生的壳寡糖对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和烟草疫霉的抑制效果。将活化好的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌用无菌水将 OD_{600} 稀释至 0.5，用于抑菌实验。抑菌实验采用打孔法：取 200 μL 菌株稀释液均匀涂布于 LB 平板上，使用无菌枪头在 LB 平板中打孔，分别加入不同质量浓度的壳寡糖溶液(50、100、200 mg/mL)，对照组为等量无菌水，倒置于 37 ℃恒温培养箱中培养 24 h，观察抑菌效果。

使用灭菌枪头在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板上距中心一定距离处对称打 4 个孔，用灭菌竹签挑出孔内的琼脂块，向每个孔中加入 200 μL 不同质量浓度的壳寡糖溶液(5、10、20 mg/mL)，对照组为等量无菌水，随后将菌饼菌丝面朝下，接种到平板中央，倒置于 28 ℃培养箱中培养，直至无菌水对照组的菌丝长至孔边缘，观察不同浓度 COS 对烟草疫霉的生长抑制作用。

1.8.3 壳寡糖对烟草的诱导抗性

待烟草长至 5−8 片完全展开的真叶时进行实验。试验设置 5 个处理，分别为：CK，叶面喷施清水；T1−T5，叶面分别喷施质量浓度为 100、150、200、250、300 mg/L 的壳寡糖溶液。喷施量以叶片正反面均匀附着细密雾滴，但未形成大液滴流下为止，每个浓度设置 3 个重复。在喷施 24 h 后准确称取 1 g 叶片用于防御酶酶活的测定。

粗酶液的提取参照文献[17]。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)粗酶液的制取方法如下：称取 1 g 经壳寡糖处理过的烟草叶片置于预冷的研钵中，加入适量聚乙烯聚吡咯烷酮(polyvinylpolypyrrolidone, PVPP)和石英砂，将样品置于冰浴条件下，用预冷的 PBS 缓冲液(pH 7.8)进行研磨，将匀浆转入预冷的离心管中，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，并用同体系缓冲液定容至 10 mL，得到粗酶液。

苯丙氨酸解氨酶(PAL)粗酶液的制备：用预冷的硼酸缓冲液(pH 8.8)代替 PBS 缓冲液，其余方法同上。

SOD 活性的测定：在离心管中加入不同物质并混匀，总体积为 3 mL (表 1)，将反应体系置于 25 ℃、4 000 lx 光照下反应 20 min，随后用黑布遮挡终止反应。以避光对照组为空白进行调零，于 OD_{560} 测定吸光度，计算 SOD 活性。

POD 活性的测定：实验方法参考文献[18]，略有改动。在比色皿中加入 0.5 mL 待测粗酶液和 3.0 mL 愈创木酚(25.0 mmol/L)，随后立即加入 200 μL H_2O_2 (0.5 mol/L)启动反应，15 s 时记录 OD_{470} 的吸光值作为起始值，随后每隔 1 min 记录 1 次，连续记录 6 min，以每分钟吸光度上升 0.01 为 1 个 POD 活性单位(U)。

PAL 活性的测定：实验方法参考《植物生理学实验指导》[19]。

表1 SOD活性测定体系

Table 1 Reaction system for SOD activity assay

Reagent name	Reagent concentration/(mol/L)	Volume/mL
PBS (pH 7.8)	0.05	1.7
MET	0.13	0.3
NBT	0.75	0.3
EDTA-Na_2	1.00×10^{-4}	0.3
VB_2	2.00×10^{-5}	0.3
Enzyme	−	0.1

−: No data; MET: Methionine; NBT: Nitrotetrazolium blue chloride; VB2: Riboflavin.

1.9 数据处理

所有样品均设置 3 个生物学重复，实验结果取平均值进行统计分析。数据采用 Excel 2019 进行处理，图形绘制使用 GraphPad Prism 8 完成。

2 结果与讨论

2.1 CsnBh 的生物信息学分析

壳聚糖酶的一个重要微生物来源就是芽孢杆菌属(*Bacillus*)。通过 SignalP 6.0 预测 CsnBh 的信号肽序列，显示其 1−36 位氨基酸为信号肽序列。序列比对分析表明，CsnBh 与 *Bacillus* sp. SIMBA 031、中村芽孢杆菌(*Bacillus nakamurai*)、深褐芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源的壳聚糖酶相似度较高，均在 80% 以上(图 1B)。将序列提交至 ProtParam 进行分析，CsnBh 基因全长 837 bp，编码 278 个氨基酸，理论分子量为 31.33 kDa，理论等电点为 5.72。通过 InterProScan 工具分析(图 1A)，CsnBh 为典型的 GH46 糖苷水解酶，结构域包括 N 端信号肽以及核心催化结构域(第 42−265 位氨基酸，覆盖蛋白大部分)，其活性位点为第 48−88 位氨基酸，这是 GH46 家族的活性位点特征序列。通过 AlphaFold 3 预测蛋白的三维结构(图 1C)，CsnBh 呈现 GH46 家族壳聚糖酶典型特征，其由 1 个 α 螺旋连接较小的 N 端结构域和较大的 C 端催化结构域，整体呈不对称哑铃状。

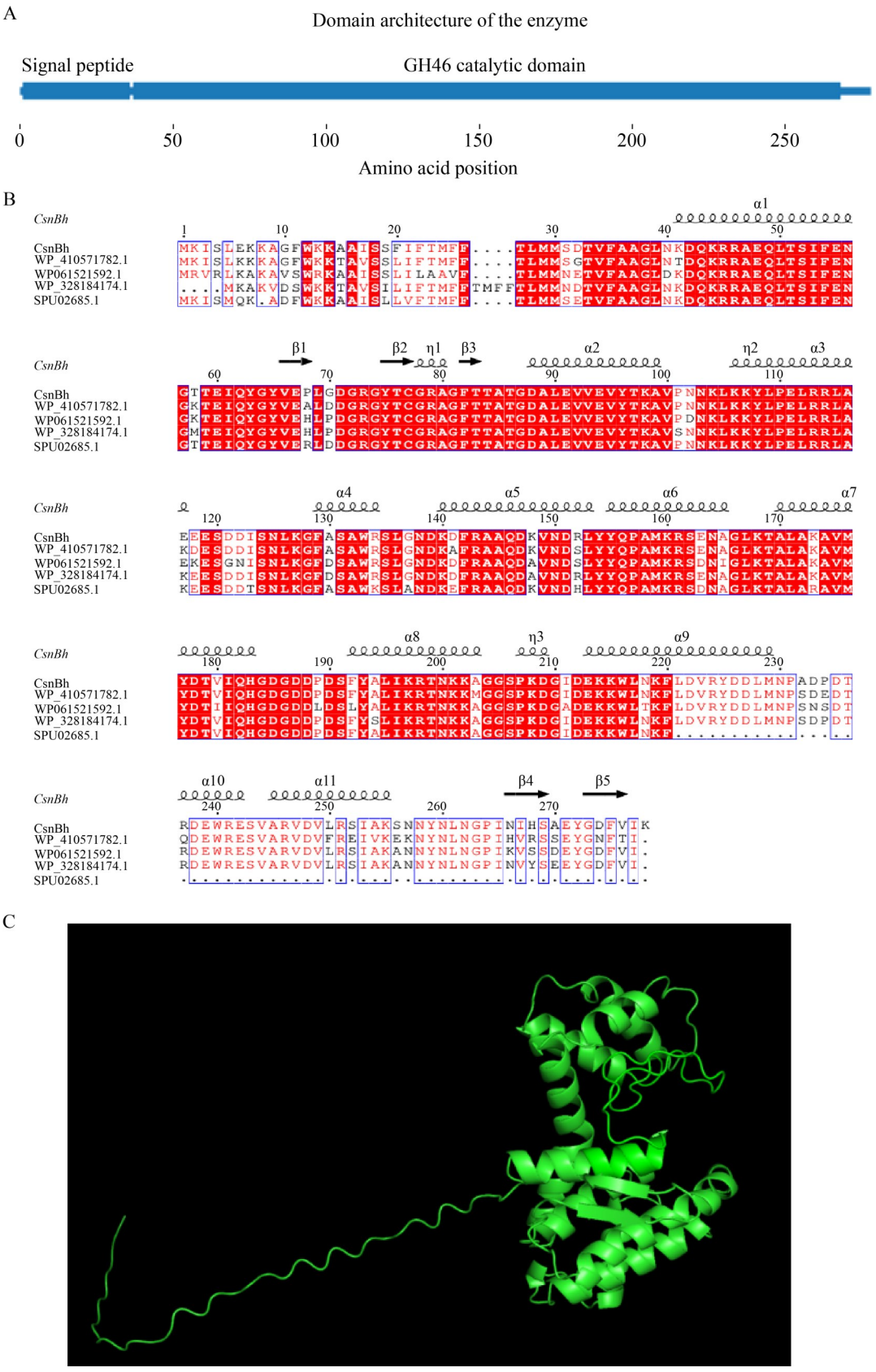
为了直观展示 CsnBh 在 GH46 家族中的进化位置，选取来自不同细菌类群的 GH46 家族壳聚糖酶代表性序列，以 GH8 家族壳聚糖酶(GenBank 登录号为 Q9ALZ1.1)为外类群，构建了系统发育树。如图 1D 所示，该系统发育树清晰地分化出多个不同的聚类分支。CsnBh 与其他来源于芽孢杆菌属的壳聚糖酶紧密地聚在一个独立的大分支中，表明它们在进化上高度保守，具有极近的亲缘关系。具体而言，CsnBh 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)以及 *Bacillus* sp. DAU101 的壳聚糖酶亲缘关系最为密切，它们共同构成了一个子分支。系统发育树的结果不仅直观地确立了 CsnBh 在发育树中的位置，也进一步证实了 CsnBh 属于典型的 GH46 家族壳聚糖酶。

2.2 壳聚糖酶基因的克隆及重组表达载体 pET-22b(+)-*CsnBh* 的构建

如图 2A 所示，以 *B. halotolerans* 基因组 DNA 为模板，CsnBh-F、CsnBh-R 为引物，扩增出一条约 800 bp 的 DNA 片段，与预期大小相符。随后将该片段连接到表达载体 pET-22b(+)上获得重组质粒 pET-22b(+)-*CsnBh*，采用 *Nde* I和 *Hin*d III双酶切验证(图 2B)。双酶切重组质粒电泳结果显示 2 个清晰条带，约 800 bp 处的条带与 *CsnBh* 大小相符；另一条大于 5 000 bp 的条带对应线性 pET-22b(+)质粒的大小，结合测序结果，证实重组质粒构建成功。

2.3 重组蛋白的表达与诱导条件优化

将构建成功的重组质粒 pET-22b(+)-*CsnBh* 转化到 *E. coli* BL21(DE3)中，获得重组菌株。经 IPTG 诱导后，重组菌表现出壳聚糖酶活性(436.42±7.30) U/mL，而对照菌未检测到酶活。SDS-PAGE 分析结果(图 3，泳道 1−3)显示，诱导后的重组菌在 31.00 kDa 附近出现了一条明显的蛋白条带，而空质粒及未诱导重组菌未出现该条带，表明 CsnBh 已成功在大肠杆菌中异源表达。


A
Domain architecture of the enzyme
Signal peptide
GH46 catalytic domain
0
50
100
150
200
250
Amino acid position
B
CsnBh
WP_410571782.1
WP061521592.1
WP_328184174.1
SPU02685.1
C

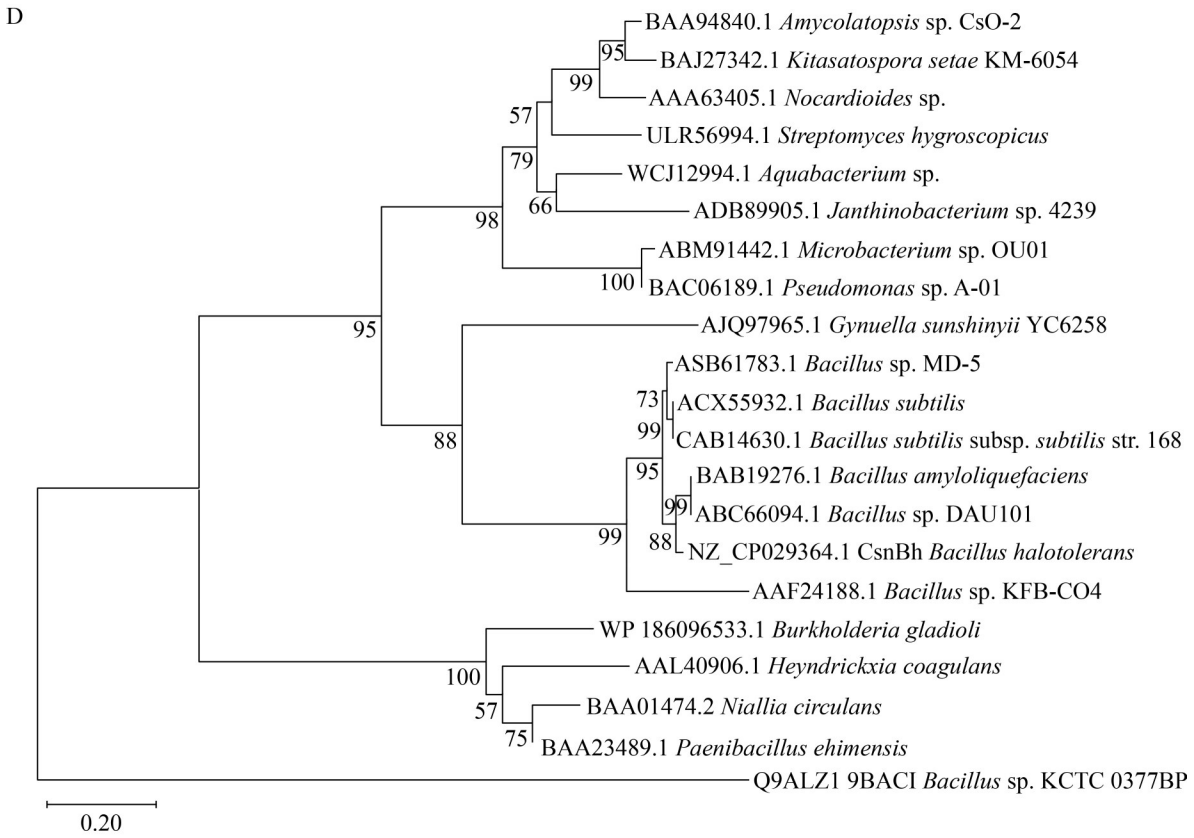


图1 CsnBh的生物信息学分析

Figure 1 Sequence analysis of CsnBh. A: Domain analysis; B: Amino acid multiple sequence alignment; C: Protein structure prediction of CsnBh; D: Phylogenetic tree.

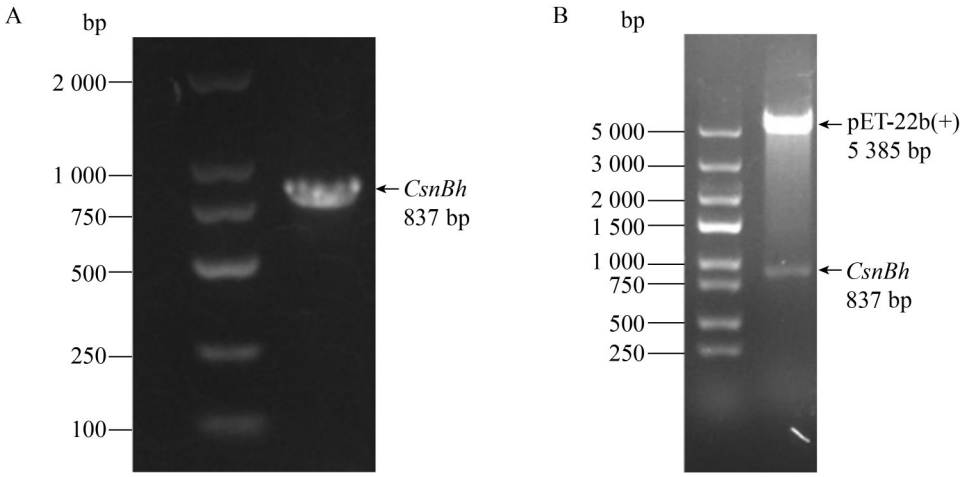


图2 耐受盐芽孢杆菌壳聚糖酶*CsnBh*基因克隆及重组质粒双酶切琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 2 Cloning of the chitosanase gene *CsnBh* from *Bacillus halotolerans* and agarose gel electrophoresis results of recombinant plasmid double digestion. A: Gene cloning of *Bacillus halotolerans* chitosanase gene *CsnBh*; B: Double restriction enzyme digestion of recombinant plasmid.

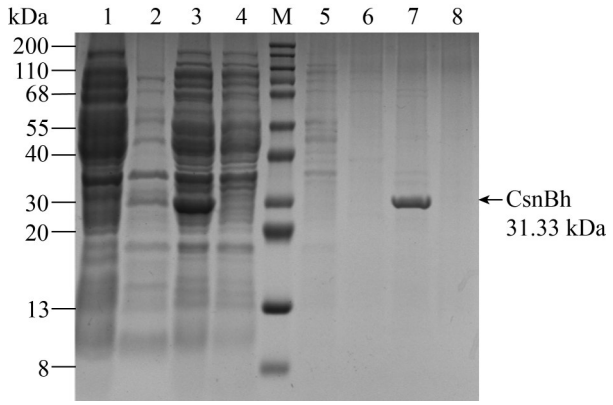


图3 CsnBh纯化过程SDS-PAGE分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of the purification process of CsnBh. Lane M: Protein molecular weight marker; Lane 1: Supernatant of induced pET-22b(+) empty plasmid; Lane 2: Supernatant of uninduced recombinant plasmid; Lane 3: Supernatant of induced recombinant plasmid; Lane 4: Flow-through; Lane 5−8: Eluates with different concentrations of imidazole (10, 25, 250, 500 mmol/L).

为提高壳聚糖酶在大肠杆菌中的表达量及酶活力，对诱导条件(IPTG 浓度、添加 IPTG 时的菌液密度 OD_{600}、诱导温度及诱导时间)进行了优化。如图 4 所示，当 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 时酶活力最高(484.15±4.65) U/mL；OD_{600} 在 0.0−0.8 范围内，CsnBh 酶活随 OD_{600} 的增加而升高，当 OD_{600}=0.8 时，酶活达到最高(1 018.11±11.84) U/mL，当 OD_{600}=1.0 时，CsnBh 酶活力迅速下降，相对酶活仅为 40.0% 左右，原因可能与高密度培养下的营养限制或代谢副产物积累有关[20]；随着诱导温度(16−37 ℃)的提高，CsnBh 活力呈现先升高后降低的趋势，诱导温度为 25 ℃时酶活力最高(1 229.98±11.30) U/mL，但诱导温度为 37 ℃时酶活急剧下降，相对酶活仅为 1.5% 左右，推测是高温诱导形成了包涵体[21]；在诱导时间 4−24 h 范围内，诱导 12 h 时酶活力最高(1 278.42±78.76) U/mL，延长诱导时间酶活呈下降趋势。因此，CsnBh 的最佳诱导条件为：当 OD_{600} 为 0.8 时加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG，25 ℃诱导 12 h，该条件下的酶活较初始酶活(436.42±7.30) U/mL 提高了 2.93 倍。

本研究通过单一变量法确定了最优表达条件，但需指出的是，由于未采用响应面法等统计学实验设计，可能忽略了诱导温度与 IPTG 浓度之间的潜在交互作用。未来的工艺放大研究可进一步通过多因子正交试验优化以获得最大产率。

2.4 重组蛋白的纯化

利用镍柱对 CsnBh 进行分离纯化，结果如表 2 所示。目标蛋白 CsnBh 的酶活力回收率为 39.01%，酶的比活力由 132.25 U/mg 提升至 400.47 U/mg，纯化倍数为 3.03。将纯化后的 CsnBh 进行 SDS-PAGE 分析，结果如图 3 所示，经镍柱亲和层析得到一条清晰且单一的条带，蛋白分子量约为 31.00 kDa，与理论分子量相一致。

2.5 CsnBh 的酶学性质

2.5.1 底物特异性分析

对壳聚糖底物的专一性是壳聚糖酶的重要特征。为研究 CsnBh 对不同底物的水解活性，选择壳聚糖及其结构类似物进行底物特异性分析。如图 5 所示，CsnBh 对胶体壳聚糖表现出显著的催化活性，而对粉末壳聚糖、粉末几丁质、胶体几丁质、羧甲基纤维素钠及可溶性淀粉的催化效率极低，相对酶活仅为 0.3% 左右。综上所述，尽管所选底物在结构单元上与壳聚糖具有一定相似性，但 CsnBh 仅对胶体壳聚糖表现出较高的催化能力，这与现有报道相一致[22-23]。

2.5.2 最适温度和温度稳定性

如图 6A 所示，CsnBh 的最适反应温度为 40 ℃，在 30−50 ℃范围内均能保持较高酶活力(>80%)，在高于 60 ℃时酶活性大幅度降低。将 CsnBh 在不同温度下保温 30 min 和 60 min 后测定其剩余酶活，由图 6B 可知，CsnBh 在

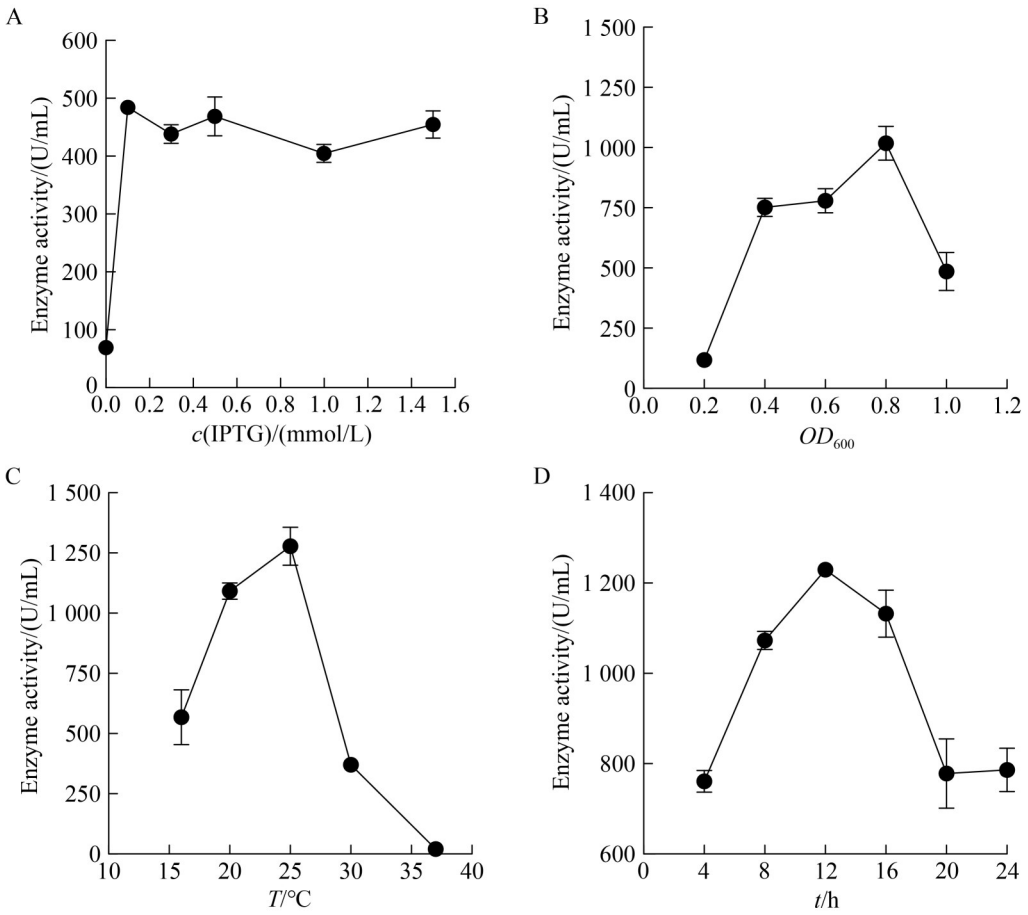


图4 CsnBh诱导条件优化

Figure 4 Optimization of induction conditions for CsnBh. A: Optimization of IPTG concentration; B: Optimization of OD_{600}; C: Optimization of induction temperature; D: Optimization of induction time.

表2 CsnBh粗酶液的纯化和酶活力测定

Table 2 Purification and enzyme activity assay of the CsnBh crude enzyme solution

Purification	Total activity/U	Total protein/mg	Specific activity/(U/mg)	Purification fold	Yield/%
Crude enzyme	8 993.02	68.00	132.25	1.00	100.00
Ni-NTA affinity chromatography	3 508.07	3.61	400.47	3.03	39.01

30−70 ℃处理 1 h 可以保留 80% 以上的酶活性，稳定性较高。当温度超过 70 ℃时，酶活性下降较为明显，90 ℃处理 1 h 后仅保留了 4% 左右的酶活，说明该酶在高温时发生了变性。其最适温度与大多芽孢杆菌属来源的壳聚糖相一致(40−60 ℃)，但其温度稳定性优于大多数芽孢杆菌属来源的壳聚糖酶，多数壳聚糖酶只能在 50 ℃及以下保持稳定[10-14]，而 CsnBh 在 70 ℃仍能保持较好的稳定性。

2.5.3 最适 pH 和 pH 稳定性

如图 7 所示，CsnBh 的最适反应 pH 为 6.0，表明 CsnBh 在弱酸性环境中可以发挥较好的催化作用。现有报道中，壳聚糖酶的最适 pH 一般为 4.0−6.5[24-25]。CsnBh 表现出较好的 pH 稳定性，在 pH 5.0−9.0 时具有良好的稳定性，在上述不同 pH 缓冲液中室温放置 2 h 后剩余酶活力

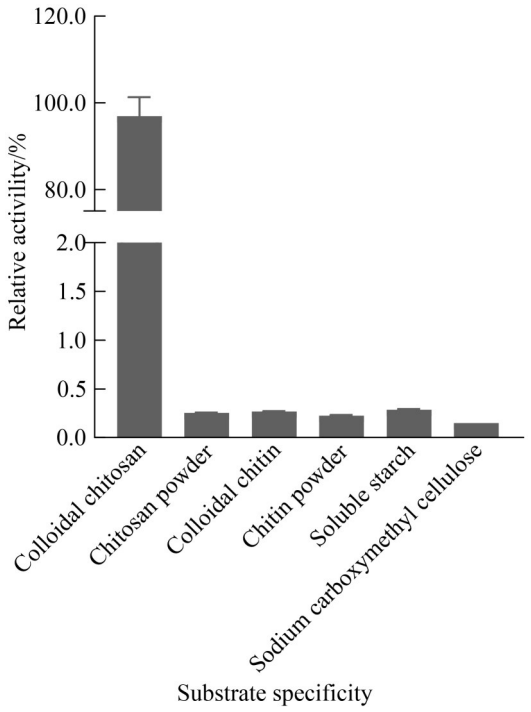


图5 CsnBh对不同底物的水解活性

Figure 5 Hydrolytic activity of CsnBh on different substrates.

均大于 90%。多数壳聚糖酶在酸性条件下较为稳定，当 pH 大于 7.0 时酶活力会出现明显下降[21,24-25]，CsnBh 在较宽的 pH 范围内表现出良好的稳定性。

2.5.4 金属离子对酶活力的影响

金属离子对酶的催化活力具有不同程度的影响，不同金属离子对 CsnBh 的影响结果如图 8 所示。当离子浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L 时 Mn^{2+}能显著提高 CsnBh 的活性，尤其是当 Mn^{2+}浓度为 5 mmol/L 时能够将酶活性提高 2.32 倍，推测 Mn^{2+}可能作为酶的辅助因子结合在活性中心或附近，稳定蛋白酶催化所需的三维构象。Mn^{2+}对大多数壳聚糖酶都表现出激活作用[26-28]，与本研究一致。金属离子 Na^{+}、Zn^{2+}、Ba^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、K^{+}、Co^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}对 CsnBh 具有不同程度的抑制作用，其中 Cu^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}抑制作用最为显著，当离子浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L 时酶活性被完全抑制，这 3 种离子均具有氧化还原活性，酶活性中心或结构上必需的半胱氨酸残基上的巯基可能被它们氧化，形成分子内或分子间二硫键，导致酶构象发生不可逆的改变而失活。

2.5.5 化学试剂对酶活力的影响

如图 9 所示，CsnBh 在不同化学试剂中酶活力差异明显。其中，DTT 能略微提高 CsnBh 的活性，当 DTT 浓度为 1 mmol/L 时酶活性并未明显提高，当 DTT 浓度为 5 mmol/L 时，酶活性提高至 126%，与曹世宁[29]的研究结果相一致。

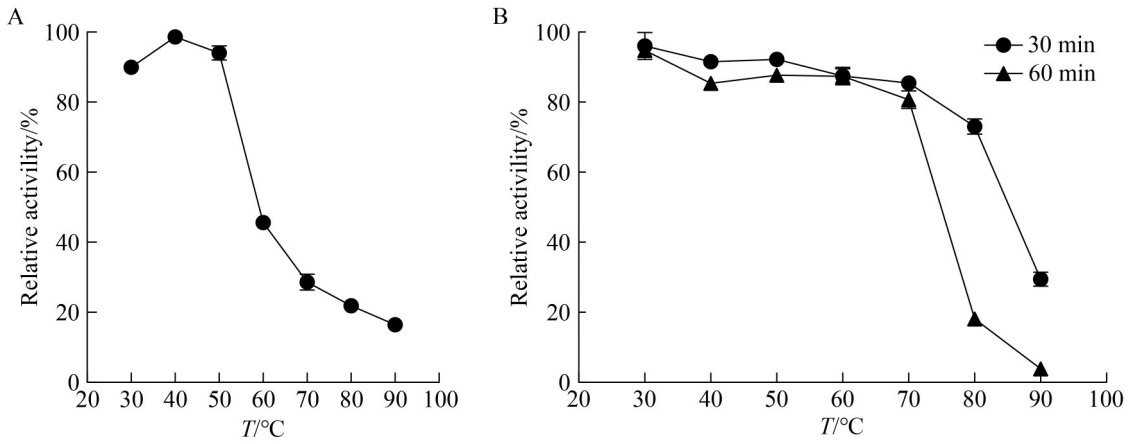


图6 温度对酶活性的影响

Figure 6 Effect of temperature on enzyme activity. A: Effect of temperature on enzyme activity; B: Effect of temperature on enzyme stability.

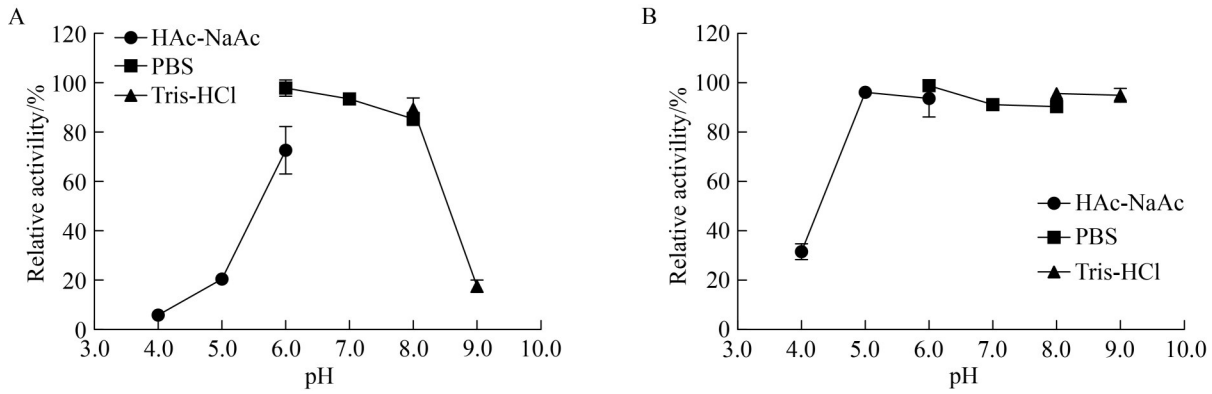


图7 pH对酶活性的影响

Figure 7 Effect of pH on enzyme activity. A: Effect of pH on enzyme activity; B: Effect of pH on enzyme stability.

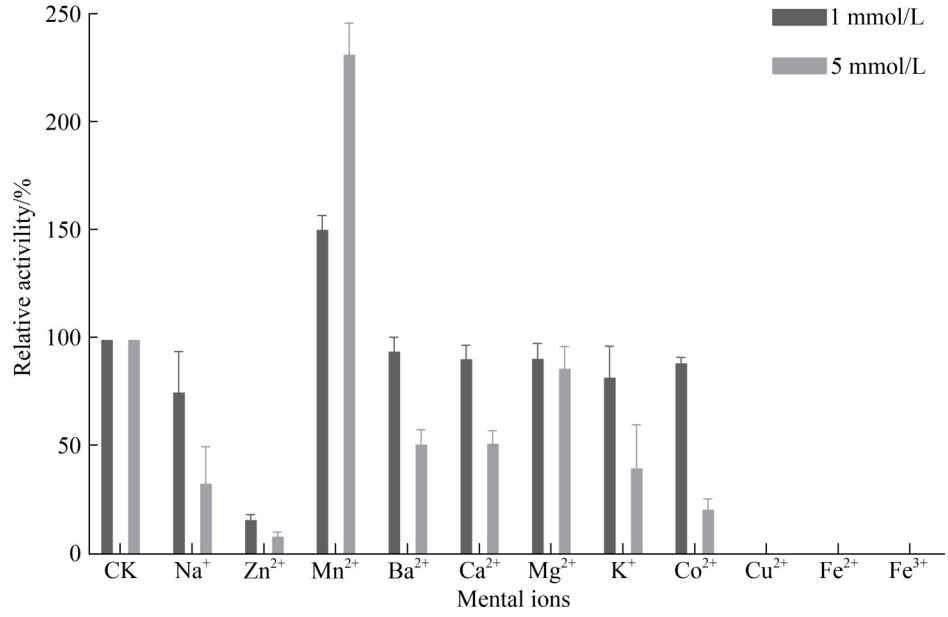


图8 金属离子对酶活性的影响

Figure 8 Effect of metal ions on enzyme activity.

DTT 为强还原剂，能使巯基处于还原状态，其促进作用表明该酶可能含有对活性重要的半胱氨酸残基。然而，也有研究表明这类强还原剂对壳聚糖酶有明显的抑制作用[28]。CTAB、Tween-80、PMSF、SDS 显著抑制酶活性，在浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L 时处理组的剩余酶活性均在 50% 以下。CTAB 和 SDS 均是强变性剂，通过疏水作用与蛋白酶的疏水核心结合，从而破坏酶的高级结构，引起酶快速而强烈的失活。PMSF 是丝氨酸蛋白酶抑制剂，其对 CsnBh 的强烈抑制表明该酶很可能属于丝氨酸水解酶家族。

2.5.6 酶的酶促动力学参数测定

根据 CsnBh 催化胶体壳聚糖水解反应的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线(图 10)，得到直线回归方程 y=0.010 850 0x+0.000 422 1，其最大反

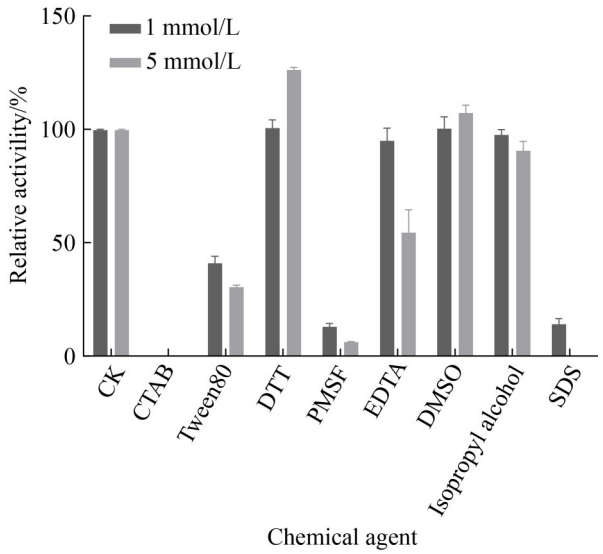


图9　化学试剂对酶活性的影响

Figure 9　Effect of chemical reagents on enzyme activity.

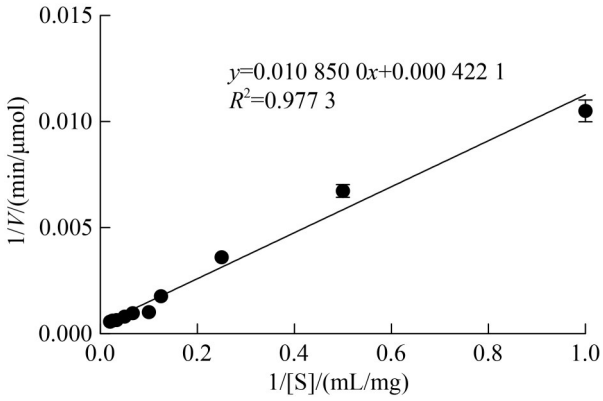


图10　CsnBh催化动力学Lineweaver-Burk双倒数图

Figure 10　Lineweaver-Burk double reciprocal diagram of CsnBh catalytic kinetics.

应速率 V_{max}=2 369 μmol/(mL·min)，表明 CsnBh 对胶体壳聚糖具有较高的催化效率。其对胶体壳聚糖的米氏常数 K_m 值为 25.71 mg/mL。

2.5.7　TLC 分析

通过 TLC 分析 CsnBh 的水解产物并确定酶的种类。结果如图 11 所示，所有水解阶段均未检测到单糖组分，表明 CsnBh 属于内切型糖苷酶。在水解初始阶段，产物主要为聚合度 3−6 的壳寡糖；随着反应时间延长，底物水解程度加深，壳三糖和壳四糖含量显著增加。水解最终阶段(24 h)的产物主要为壳三糖至壳五糖，确定了 CsnBh 为内切糖苷酶，这与 Zhou 等[30]、Chen 等[24]的研究结果一致，其催化特性显示该酶有利于生成具有较高活性的壳寡糖。研究表明，壳寡糖的生物活性与其聚合度密切相关，其中 DP 3−6 被认为是诱导植物抗性、抗菌及发挥抗肿瘤功能的优势区间[31]。本研究获得的壳聚糖酶能够直接获得这一高活性组分(40 ℃，反应 0.50 h)，这与以往报道的产物分布偏向低聚合度(DP 2−4)的壳聚糖酶形成了鲜明对比[32]。

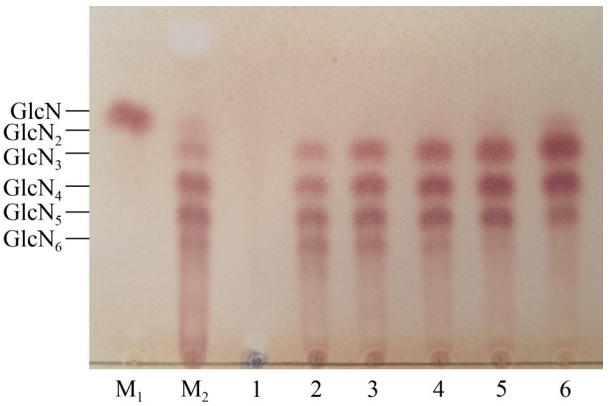


图11　CsnBh水解产物的TLC分析

Figure 11　TLC analysis of hydrolysis products from CsnBh. M1: Glucosamine hydrochloride standard; M2: Chitooligosaccharide (DP 2−6) standard; 1−6: Hydrolysis products with hydrolysis time of 0, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, and 24.00 h, respectively.

2.6　CsnBh 水解产物的抑菌及植物诱导抗性

2.6.1　壳寡糖的抑菌活性

壳寡糖的质量浓度是影响抑菌性能的一个重要因素，如图 12A 及图 12B 所示，壳寡糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果呈浓度依赖性，随着壳寡糖质量浓度升高，抑菌圈直径逐渐增大，表明其抑菌作用越来越显著。

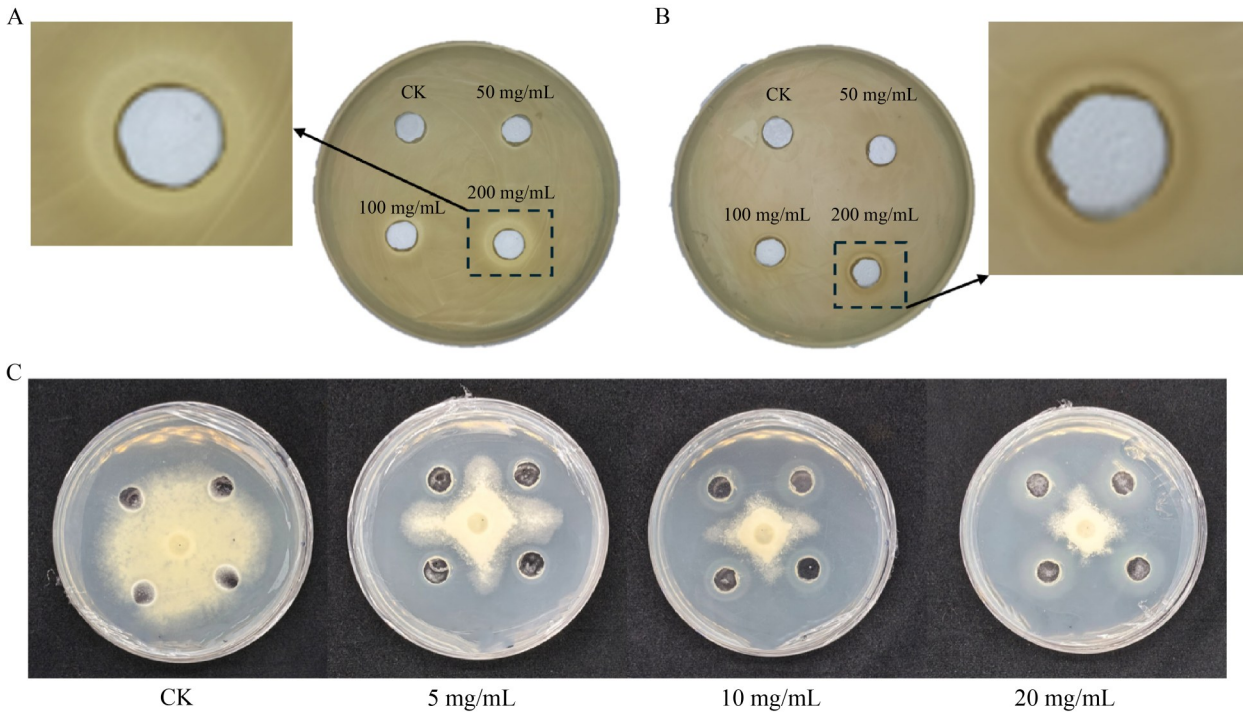


图12 CsnBh水解产物的抑菌效应

Figure 12 Bacteriostatic activity of CsnBh hydrolysis products. A: *Escherichia coli*; B: *Staphylococcus aureus*; C: *Phytophthora nicotianae*.

在 50 mg/mL 时，壳寡糖溶液对 2 种细菌的抑制效果较弱；当质量浓度提高至 100 mg/mL 和 200 mg/mL 时，壳寡糖明显抑制了 2 种细菌的生长。这种抑菌活性可能是由于壳寡糖能够破坏微生物细胞膜的渗透平衡并干扰其代谢。这与 Tong 等[33]的研究结果大致相同，但后者发现当 COS 质量浓度为 50 mg/mL 时对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌就表现出较好的抑制效果，推测是不同壳聚糖酶水解产生的 COS 脱乙酰度和聚合度存在差异所致。

如图 12C 所示，壳寡糖对烟草疫霉菌丝生长具有直接抑制作用，并且抑制活性随着浓度的增加(0−20 mg/mL)而增强。当壳寡糖质量浓度为 5 mg/mL 时，烟草疫霉的菌丝生长受到了明显抑制，质量浓度升高时壳寡糖对菌丝生长的抑制作用进一步加强。这种抑制活性可能是由于壳寡糖影响了烟草疫霉的菌丝形态，游动孢子囊的形成与释放，游动孢子的游动和萌发[34]。

2.6.2 壳寡糖的植物诱导抗性

SOD 是重要的氧自由基清除剂，如图 13A 所示，经壳寡糖溶液处理过的烟草叶片中的 SOD 酶活性呈现先上升后下降的趋势，在壳寡糖质量浓度为 200 mg/L 时 SOD 酶活性最高，为 (2.97±0.07) U/(g·min)。

POD 能够消除植物体内的 H_2O_2，是植物防御系统的核心酶之一。如图 13B 所示，壳寡糖溶液处理后的烟草叶片中的 POD 活性总体上呈现先上升后下降的趋势，在壳寡糖质量浓度为 250 mg/L 时 POD 活性最高，为(3 890.00±19.08) U/(g·min)。

PAL 主要参与木质素的合成，也是调节植物信号传导物质水杨酸(SA)的关键酶。如图 13C 所示，壳寡糖处理后的烟草叶片中的 PAL 活性呈先上升后降低最终趋于稳定的趋势，在壳寡糖质量浓度为 200 mg/L 时 PAL 活性最高，为 (27.00±0.40) U/(g·min)。

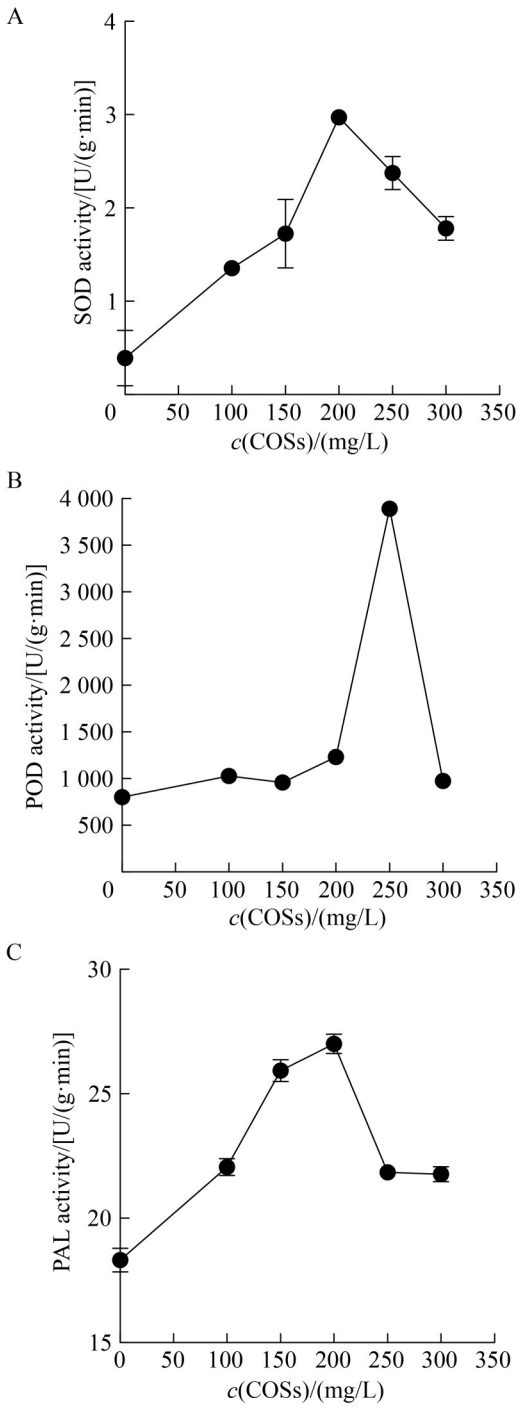


图13 CsnBh水解产物处理后烟草叶片中防御酶酶活变化

Figure 13 Changes in defense enzyme activities in tobacco leaves after CsnBh hydrolysis products treatment. A: SOD activity; B: POD activity; C: PAL activity.

综上所述，壳寡糖溶液可以诱导烟草 SOD、POD 和 PAL 活性的增加，但各防御酶酶活达到峰值所需的壳寡糖质量浓度与饶超奇[35]的研究有所不同，推测可能是壳寡糖聚合度不同以及喷洒时壳寡糖溶液的量不同导致效果有所差异。

3 结论

本研究成功克隆并异源表达了来源于 *B. halotolerans* 的壳聚糖酶基因 *CsnBh*，并在大肠杆菌中实现了高水平可溶性表达。酶学性质分析显示，CsnBh 对胶体壳聚糖具有高度专一性；CsnBh 在 40 ℃时活性最高，且在 30−70 ℃的较宽温度范围内保持稳定；CsnBh 的最适 pH 为 6.0，且在 pH 5.0−9.0 范围内极为稳定，是一种酸碱耐受性良好的中性酶；金属离子效应中，Mn^{2+}对酶活具有显著激活作用而 Cu^{2+}、Fe^{2+} 等离子强烈抑制酶活性；TLC 分析实验表明 CsnBh 为内切型糖苷酶，产物以低聚合度壳寡糖(DP 3−5)为主，这些寡糖正是具有高生物活性的关键组分。本研究不仅对酶本身进行了表征，还将其催化功能与应用潜力相关联。CsnBh 制备的壳寡糖展现出广谱的抑菌活性，能有效抑制革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌及植物病原真菌的生长。更重要的是，壳寡糖能够成功诱导烟草系统抗性，显著提升 SOD、POD、PAL 等关键防御酶的活性，这为开发环境友好型生物农药或植物诱抗剂奠定了坚实基础。

作者贡献声明

欧玲：实验操作，数据分析整理及论文写作；张红岩：项目管理，提供资源；韦玉玲：协助实验操作，数据分析整合；王韬闵、黄莹、张佳艳：协助实验操作；申乃坤：实验设计、实验指导，文章指导及修改，项目管理，提供资源。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

[1] Zitouni M, Fortin M, Scheerle RK, Letzel T, Matteau D, Rodrigue S, Brzezinski R. Biochemical and molecular characterization of a thermostable chitosanase produced by the strain *Paenibacillus* sp. 1794 newly isolated from compost[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(13): 5801-5813.

[2] Liaqat F, Eltem R. Chitooligosaccharides and their biological activities: a comprehensive review[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 184: 243-259.

[3] Thadathil N, Velappan SP. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: a review[J]. Food Chemistry, 2014, 150: 392-399.

[4] 龚香艺, 吴静, 邬敏辰. 真菌壳聚糖酶研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(17): 308-311.
Gong XY, Wu J, Wu MC. Research progress of fungal chitosanase[J]. Food Science, 2012, 33(17): 308-311 (in Chinese).

[5] Kaczmarek MB, Struszczyk-Swita K, Li XK, Szczęsna-Antczak M, Daroch M. Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, 7: 243.

[6] 虞凤慧, 徐泽平, 谢海涛. 一株产壳聚糖酶芽孢杆菌的分离及鉴定[J]. 中国酿造, 2015, 34(1): 65-67.
Yu FH, Xu ZP, Xie HT. Isolation and identification of chitosanase-producing strain *Bacillus cereus*[J]. China Brewing, 2015, 34(1): 65-67 (in Chinese).

[7] 冯志彬, 薛钰, 陈国忠, 张娟, 罗乐, 程仕伟. 1株产壳聚糖酶细菌的分离、鉴定和发酵条件优化[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 171-176.
Feng ZB, Xue Y, Chen GZ, Zhang J, Luo L, Cheng SW. Isolation, identification of *Bacillus mojavensis* amyP216 and optimization of its fermentation conditions for enhanced chitosanase production[J]. Food Science, 2016, 37(19): 171-176 (in Chinese).

[8] 梁颖, 刘睿, 宋超东, 谢俊杰, 殷豆豆, 许霞, 杨登峰, 张红岩, 申乃坤. 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 CD, Xie JJ, Yin DD, Xu X, Yang DF, Zhang HY, Shen NK. Screening, identification and conditions optimization of high chitosanase producing strains, and analysis of its enzymatic properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(20): 157-166 (in Chinese).

[9] Wang JR, Li XM, Chen H, Lin BL, Zhao LZ. Heterologous expression and characterization of a high-efficiency chitosanase from *Bacillus mojavensis* SY1 suitable for production of chitosan oligosaccharides[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 781138.

[10] Zhang QS, Cao H. Expression of chitosanase from *Aspergillus fumigatus* chitosanase in *Saccharomyces cerevisiae* by CRISPR-Cas9 tools[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2024, 11(1): 20.

[11] 杜文娟, 阿瓦古丽·图尔荪, 董志琴, 马惠娟, 马正海. 萎缩芽孢杆菌酸碱耐受性壳聚糖酶的表达及酶学性质分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 352-362.
Du WJ, Tursun Awagul, Dong ZQ, Ma HJ, Ma ZH. Expression and enzymatic characterization of a chitosanase with tolerance to a wide range of pH from *Bacillus atrophaeus*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 352-362 (in Chinese).

[12] 严寅珲, 鲁晶娣, 黄锦翔, 丰丕雪, 凌瑶, 易弋. 中村芽胞杆菌壳聚糖酶在大肠杆菌中重组表达及酶学性质[J]. 中国食品学报, 2022, 22(9): 74-81.
Yan YH, Lu JD, Huang JX, Feng PX, Ling Y, Yi Y. Recombinant expression and enzymatic characterization of *Bacillus nakamurai* chitosanase in *Escherichia coli*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(9): 74-81 (in Chinese).

[13] Zhou ZP, Zhao SZ, Wang SQ, Li XM, Su L, Ma YH, Li J, Song JN. Extracellular overexpression of chitosanase from *Bacillus* sp. TS in *Escherichia coli*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 175(7): 3271-3286.

[14] 王建荣, 王永华, 祝木金, 王平, 陈微, 余思, 钟斌. 耐盐芽孢杆菌R1高效壳聚糖酶异源表达及特性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(9): 10-19.
Wang JR, Wang YH, Zhu MJ, Wang P, Chen W, Yu S, Zhong B. Heterologous expression and characterization analysis of a high-efficiency chitosanase from *Bacillus halotolerans* R1[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(9): 10-19 (in Chinese).

[15] Mourya VK, Inamdar NN, Choudhari YM. Chitooligosaccharides: synthesis, characterization and applications[J]. Polymer Science Series A, 2011, 53(7): 583-612.

[16] Cabrera JC, van Cutsem P. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan[J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 25(2): 165-172.

[17] 王鹏. 马铃薯黑痣病菌拮抗细菌的筛选及其生防机制研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2022.
Wang P. Screening of antagonistic bacteria against potato black scurf and study on its biocontrol mechanism[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2022 (in Chinese).

[18] 王丽, 王万兴, 索海翠, 胡新喜, 秦玉芝, 曾璐, 李小波, 熊兴耀. 马铃薯块茎酶促褐变及与相关生理指标的关系[J]. 园艺学报, 2019, 46(8): 1519-1530.
Wang L, Wang WX, Suo HC, Hu XX, Qin YZ, Zeng L, Li XB, Xiong XY. The relationship between enzymatic browning and relevant physiological index of potato tubers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(8): 1519-1530 (in Chinese).

[19] 李小方, 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 5版. 北京: 高等教育出版社, 2016.

[20] Pinhal S, Ropers D, Geiselmann J, de Jong H. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(13): e00147-19.

[21] Hidalgo-Vázquez E, Hernández-Pérez J, Antunes-Ricardo M, Sánchez-Trasviña C, Barocio ME, Avila Rodríguez MI, Benavides J. Heterologous expression and functional characterization of recombinant arenin to assess its

anticancer and wound-healing potential[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2025, 12(1): 143.

[22] Dai YW, Zhao HR, Wei JC, Chen YX, Lin XP, Zhang SF, Ji CF. Enzymatic properties of chitosanase from *Bacillus velezensis* YB1534 and antibacterial activity of its oligosaccharide products[J]. Foods, 2026, 15(3): 575.

[23] Wang JR, Wang P, Zhu MJ, Chen W, Yu S, Zhong B. Overexpression and biochemical properties of a GH46 chitosanase from marine *Streptomyces hygroscopicus* R1 suitable for chitosan oligosaccharides preparation[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 12: 816845.

[24] Chen XE, Xia WS, Yu XB. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus* sp. CJ22-326[J]. Food Research International, 2005, 38(3): 315-322.

[25] Liang TW, Chen YY, Pan PS, Wang SL. Purification of chitinase/chitosanase from *Bacillus cereus* and discovery of an enzyme inhibitor[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 63: 8-14.

[26] Zhang JP, Cao HL, Li SG, Zhao Y, Wang WX, Xu QS, Du YG, Yin H. Characterization of a new family 75 chitosanase from *Aspergillus* sp. W-2[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 362-369.

[27] 段静, 刘广鑫, 董晏君, 周洋, 李锦铨, 刘小玲, 周萌, 梁日深, 赵丽娟, 林蠡. 解淀粉芽孢杆菌HZ-1510壳聚糖酶基因的克隆、重组表达及其活性[J]. 水产学报, 2017, 41(10): 1552-1561.
Duan J, Liu GX, Dong YJ, Zhou Y, Li JQ, Liu XL, Zhou M, Liang RS, Zhao LJ, Lin L. Cloning, expression and activity analysis of chitosanase from *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-1510[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(10): 1552-1561 (in Chinese).

[28] Guo J, Wang Y, Gao WJ, Wang XR, Gao X, Man ZW, Cai ZQ, Qing Q. Gene cloning, functional expression, and characterization of a novel GH46 chitosanase from *Streptomyces avermitilis* (SaCsn46A)[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(2): 813-826.

[29] 曹世宁. 草酸青霉壳聚糖酶的酶学性质研究、分子克隆及食品级表达[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
Cao SN. Study on enzymatic properties, molecular cloning and food-grade expression of chitosanase from *Penicillium oxalicum*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022 (in Chinese).

[30] Zhou JL, Liu XB, Yuan F, Deng B, Yu XB. Biocatalysis of heterogenously-expressed chitosanase for the preparation of desirable chitosan oligosaccharides applied against phytopathogenic fungi[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020, 8(12): 4781-4791.

[31] Li N, Lu YT, Sheng X, Cao Y, Liu W, Zhou Z, Jiang L. Recent progress in enzymatic preparation of chitooligosaccharides with a single degree of polymerization and their potential applications in the food sector[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2024, 196(10): 6802-6816.

[32] Su HP, Zhao HJ, Jia ZR, Guo CR, Sun JN, Mao XZ. Biochemical characterization of a GH46 chitosanase provides insights into the novel digestion specificity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(4): 2038-2048.

[33] Tong LG, Li YY, Qin QJ, Yu Y, Duan L, Wang X, Jiang YQ, Liao GY, Zhang YW, Wu C, Wang B, Fang WX. Enhancing activity and stability of a GH8 chitosanase through conserved N-terminal and peripheral residue mutations for bioactive chitooligosaccharide production[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 315: 144643.

[34] 翟新羽, 黄太萍, 冯国荣, 陈意, 刘洋, 靳晶豪, 陈孝仁. 壳寡糖抑制辣椒疫霉的生长发育和侵染[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(15): 106-111.
Zhai XY, Huang TP, Feng GR, Chen Y, Liu Y, Jin JH, Chen XR. Inhibition of growth, development and host infection of *Phytophthora capsici* by chito-oligosaccharides[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(15): 106-111 (in Chinese).

[35] 饶超奇. 壳寡糖与水杨酸对蛟河晒烟诱导抗性及品质的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2020.
Rao CQ. Effects of chitosan oligosaccharide and salicylic acid on induced resistance and quality of Jiaohe dark-cured tobacco[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2020 (in Chinese).