

研究报告

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

薛家威, 温崇庆, 王玲, 宁为民, 戴思婷, 薛明*

广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088

薛家威, 温崇庆, 王玲, 宁为民, 戴思婷, 薛明. 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 Jiawei, WEN Chongqing, WANG Ling, NING Weimin, DAI Siting, XUE Ming. Cloning expression and enzymatic properties of chitinase gene *PpchiC* from *Pseudoalteromonas piscicida* C923[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 91-106.

摘要:【背景】某些假交替单胞菌可分泌几丁质酶, 在降解利用几丁质为水产动物提供营养、免疫、抗病等方面有着重要潜力。【目的】克隆杀鱼假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*) C923 的一个几丁质酶基因, 实现其在大肠杆菌中的异源表达, 并对重组几丁质酶的酶学性质进行研究。

【方法】从菌株 C923 测序的基因组中注释到一个几丁质酶家族基因 *PpchiC*, 设计引物克隆该基因后进行生物信息学分析; 构建载体进行异源表达并从温度、时间与诱导剂浓度进行表达优化; 对表达蛋白进行最适温度与 pH 等酶学性质研究, 同时比较了重组菌破碎后上清与沉淀及纯化的酶蛋白对几丁质的降解效应。【结果】基因 *PpchiC* 长 1 350 bp, 编码 450 个氨基酸, *PpchiC* 蛋白理论分子量为 48.76 kDa, 等电点为 4.78, 不稳定系数为 29.08。结构域分析发现该蛋白含有一个类型 III 几丁质结合域和一个糖苷水解酶 18 家族(glycosyl hydrolase 18, GH18)的催化域; *PpchiC* 蛋白含有 GH18 家族几丁质酶的保守催化基序 DxxDxDxE、YxR 和[E/D]xx[V/I]。16 °C、0.25 mmol/L IPTG、诱导 12 h 为其最优化表达条件, *PpchiC* 在 50 °C、pH 8.0 时表现出最大酶活性; 以胶体几丁质为底物时, *PpchiC* 的 K_m 值为 2.58 mg/mL、 V_{max} 值为 5.04 mg/(mL·min)。降解结果表明, 菌体的沉淀与上清及从上清中纯化的酶蛋白均有着较好的几丁质降解效应。【结论】杀鱼假交替单胞菌 C923 基因 *PpchiC* 编码 GH18 家族的几丁质酶, 能被大肠杆菌高效表达且降解几丁质效应明显, 这为 *PpchiC* 及菌株 C923 的应用提供了参考依据。

关键词: 杀鱼假交替单胞菌; 几丁质酶; 酶学性质

资助项目: 国家自然科学基金(32072995); 广东海洋大学创新强校专项资金项目(230419095); 廉江市养虾集团有限公司委托项目(008)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072995), the Special Fund for Innovation and Strengthening of Guangdong Ocean University (230419095), and the Project Entrusted by Lianjiang Shrimp Breeding Group Limited Company (008).

*Corresponding author. E-mail: xuemtc@163.com

Received: 2022-04-29; Accepted: 2022-09-12; Published online: 2022-10-12

Cloning expression and enzymatic properties of chitinase gene *PpchiC* from *Pseudoalteromonas piscicida* C923

XUE Jiawei, WEN Chongqing, WANG Ling, NING Weimin, DAI Siting, XUE Ming*

College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China

Abstract: [Background] Some members of the genus *Pseudoalteromonas* can secrete a variety of chitinases, which play important roles in degrading chitin to provide nutrition, immunity, and disease prevention for aquatic animals. [Objective] To clone a chitinase gene of *Pseudoalteromonas piscicida* C923 and realize its heterologous expression in *Escherichia coli*, thereby exploring the enzymatic properties of the recombinant chitinase. [Methods] A potential gene *PpchiC*, identified and annotated as chitinase based on the analysis of the genome sequence of strain C923, was cloned by designing primers and subsequently subjected to bioinformatic analysis. Then an expression vector was constructed to conduct heterologous expression, and the expression was optimized from the temperature, time, and concentration of the inducer. The optimum temperature, pH of the expressed protein, and other enzymatic properties were studied. Finally, the degradation of chitin by the supernatant and precipitation of recombinant *E. coli* cells and the purified enzyme protein were compared. [Results] *PpchiC* was 1 350 bp in length and encoded 450 amino acids. The theoretical molecular mass of protein *PpchiC* was 48.76 kDa, and its isoelectric point and instability coefficient were 4.78 and 29.08, respectively. Structural analysis revealed that *PpchiC* contained a type III chitin-binding domain, a catalytic domain of glycosyl hydrolase 18 (GH18), and conserved motifs DxxDxDxE, YxR, and [E/D]xx[V/I]. The optimized expression conditions were 16 °C of temperature, induction time of 12 h, and IPTG concentration of 0.25 mmol/L. *PpchiC* showed maximum enzymatic activity at 50 °C and pH 8.0. When colloidal chitin was used as the substrate, the kinetic parameters K_m and V_{max} were 2.58 mg/mL and 5.04 mg/(mL·min), respectively. The results of degradation showed that the supernatant and precipitation of recombinant *E. coli* cells and the purified enzyme protein from the supernatant all exhibited excellent chitin degradation effects. [Conclusion] The gene *PpchiC* from *P. piscicida* C923 encodes a GH18 family chitinase, which can be highly expressed in *E. coli* with obvious chitin degradation effects. This study provides references for the application of *PpchiC* and C923 strain.

Keywords: *Pseudoalteromonas piscicida*; chitinase; enzymatic properties

几丁质, 又称甲壳素、壳多糖, 是由N-乙酰-葡萄糖胺(N-acetylglucosamine, GlcNAc)通过 β -1,4-糖苷键连接而成的多聚体[(GlcNAc) $_n$], 在自然界中是含量仅次于纤维素的第二大可再生资源^[1]。几丁质作为重要营养素, 理论上可为对虾提供养分并满足其频繁蜕壳活动对甲壳质

迅速再生的需要。然而, 关于几丁质对对虾功效的研究结果存在较大分歧, 这可能与对虾自身较低的几丁质利用效率有关^[2-6], 因此, 提高对虾对几丁质的消化吸收是亟待解决的问题。几丁质酶(EC3.2.1.14)是专门降解几丁质及其衍生物的酶系^[1], 广泛存在于微生物尤其细菌

中, 可将几丁质水解形成不同形态的乙酰氨基葡萄糖低聚物或单体。基于氨基酸序列保守性, 人们将细菌几丁质酶主要归为糖苷水解酶 (glycosyl hydrolase, GH) 第 18、19、23 和 48 等家族^[7]。多数细菌相同的几丁质酶家族具有相似结构域, 如信号肽、功能催化域、几丁质结合域等, 并且存在明显的基因扩增和多结构组合现象, 而不同的几丁质酶家族可以协同作用以高效降解几丁质^[8-9]。

假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 在分类上隶属于变形菌门 γ -变形菌纲交替单胞菌目假交替单胞菌科, 是一类主要营附着或浮游生活的海洋特有细菌。该属有些种能够分泌抗生素、胞外多糖、淀粉酶和几丁质酶等胞外产物^[10]。Paulsen 等^[11]基于比较基因组学分析, 发现产色素的假交替单胞菌菌株具有较强的几丁质降解功能, 能够优先利用几丁质作为底物并产生新颖的次级代谢产物, 其基因组上分布着保守的几丁质降解基因簇及 GH19 家族几丁质酶基因。Yu 等^[12]报道金丽假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas flavipulchra*) JG1 菌株基因组蕴含着强大的几丁质降解潜能, 有助于增强其抗菌活性并提高生存竞争优势。Makhdoumi 等^[13]报道从黑海分离的一株假交替单胞菌 DC14 产生的几丁质酶有着广泛的温度与 pH 耐受性, 而且在 40 °C 与 pH 9.0 时达最大值。Wang 等^[14]报道从假交替单胞菌 DL-6 克隆的几丁质酶有着广泛的底物特异性, 对 α 与 β 型几丁质、壳聚糖、羟甲基纤维素均能有效降解, 而且对低温与高盐有着较好的耐受性。García-Fraga 等^[15]用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 对长衫假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas tunicata*) 几丁质酶 PtChi19p 进行异源表达, 发现重组菌密度、诱导剂浓度、诱导时间和诱导温度等因素都能影响重组几丁质酶的表达。因此, 不同假交替单胞

菌来源的几丁质酶在活性特征、底物特异性和应用潜能等方面不尽相同。

肠道是对虾重要的消化吸收场所, 其菌群在宿主的生长发育、营养吸收和免疫抗病方面发挥巨大作用^[16]。Tzuc 等^[17]研究表明, 分离自凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 肠道的假交替单胞菌株均具有降解几丁质、脂质和蛋白质等主要营养成分的功能, 其分泌的消化酶可弥补对虾内源酶分泌的不足, 提高对虾摄食效率。Gao 等^[18]通过宏基因组测序分析发现, 在 1-2 月龄凡纳滨对虾肠道菌群的弧菌属 (*Vibrio*) 与假交替单胞菌属中注释到高度富集的几丁质酶基因与其相应的代谢通路, 表明对虾肠道菌群中蕴含着丰富的几丁质降解潜能。本文对源自对虾肠道的杀鱼假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas piscicida*) 菌株 C923 基因组中可能具有几丁质降解功能的基因 *PpchiC* 进行了克隆表达和酶学性质研究, 并检测了表达菌的粗酶液和重组纯化酶蛋白对几丁质的降解效果, 以期对菌株 C923 及其几丁质酶在对虾养殖等领域的应用提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和培养基

杀鱼假交替单胞菌 C923 是由本实验室从凡纳滨对虾肠道分离保存并进行了基因组测序的一株对虾益生菌^[19]; 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 为实验室保存菌株。2216E 培养基、LB 液体培养基及 LA 培养基参考宁为民^[19]方法制备。

1.1.2 主要试剂和仪器

甲壳素, 上海源叶生物科技有限公司; 限制性核酸内切酶、T4 连接酶, 大连宝生物工程有限公司; 质粒提取试剂盒, 北京全式金生

物技术有限公司；凝胶回收试剂盒，赛默飞世尔科技(中国)有限公司；氨苄西林(Amp⁺)、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)，生工生物工程(上海)股份有限公司；蛋白电泳凝胶试剂盒，中晖赫彩生物科技有限公司；His 鼠单抗、山羊抗小鼠 IgG、His-tag Purification Resin、BCA 测定蛋白浓度试剂盒，上海碧云天生物技术有限公司。

凝胶成像分析系统，上海勤翔科学仪器公司；蛋白电泳仪，Bio-Rad 公司；全自动化学发光图像分析系统，上海天能科技公司；一体化蛋白免疫印迹系统，赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *PpchiC* 基因片段的扩增

挑取 C923 单菌落接种于 2216E 液体培养基中，30 °C、160 r/min 培养至对数后期(OD_{600} 值约为 0.6)，10 000 r/min 离心 10 min，收集菌体后按 DNA 提取试剂盒操作说明提取 DNA。根据基因组注释到几丁质酶基因序列^[19]，设计引物 *PpchiC*-F (5'-AGGCCATGGCTGATATCGGATCCGCGGTTGACTGTAGCAAC-3')和 *PpchiC*-R (5'-GTGCTCGAGTTCGCGCCGCAAGCTTCTGACATTGATAGCTTGG-3')。以 C923 基因组 DNA 为模板，使用高保真酶扩增目的片段。PCR 反应体系(50 μ L)：2 \times PCR Buffer for KOD FX Neo (含 2.5 mmol/L MgCl₂) 25 μ L，dNTPs (2 mmol/L) 10 μ L，正、反向引物(10 μ mol/L)各 2 μ L，模板 DNA (100 ng/ μ L) 1 μ L，KOD FX Neo 2 μ L，ddH₂O 8 μ L。PCR 反应条件：98 °C 5 min；98 °C 10 s，55 °C 30 s，68 °C 90 s，共 35 个循环；68 °C 5 min。PCR 产物进行 1.8% 琼脂糖凝胶电泳，在紫外灯下观察并迅速切下目的条带。用凝胶回收试剂盒按操作说明回收目的片段，将扩增产物委托公司进行测序。

1.2.2 *PpchiC* 基因及其表达蛋白的生物信息学分析

通过 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)和 ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org>)推导 *PpchiC* 蛋白的氨基酸序列、分析开放阅读框(open reading frame, ORF)、计算分子量值(M_w)和预测理论等电点(pI)；利用 SWISS-MODEL (<http://www.swissmodel.expasy.org/>)对 *PpchiC* 基因进行二级结构预测及三级结构建模；采用 ESPript 3.0 (<https://espript.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>)进行氨基酸同源比对及蛋白二级、三级结构分析；利用保守结构域数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)和 Tbttools 软件 (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools/releases>)预测保守结构域；使用 Clustal 2.0 及 MEGA 11.0 软件，以邻接法(neighbor-joining method)构建 *PpchiC* 氨基酸序列系统进化树。

1.2.3 原核表达载体的构建

将扩增得到的目的基因与载体 pET-32a 进行体外同源重组，采用热激法转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞，对阳性克隆进行测序并对质粒进行酶切验证。从测序正确的克隆子中提取质粒，37 °C 条件下 BamH I 和 Hind III 双酶切 30 min，回收并纯化酶切产物。用 T4 连接酶将回收产物与载体连接，将构建好的质粒转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中。

1.2.4 重组蛋白的诱导表达及条件优化

将重组大肠杆菌接种于两瓶 LA 液体培养基中，37 °C、160 r/min 培养 2–4 h 至菌液 OD_{600} 值达到 0.5。一瓶作为实验组加入终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG；另一瓶作为对照组不加诱导剂，20 °C 继续培养 8 h。诱导结束后，吸取适量菌液 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体，磷酸缓冲液(PBS)漂洗菌体，加入 100 μ L PBS 缓冲液和 20 μ L 6 \times 蛋白载样缓冲液混匀，沸水浴处理 10 min，取样进行 SDS-PAGE 检测。

采取单一变量法优化诱导表达条件。分别比较 *Ppchic* 重组蛋白在不同温度(37、28、16 °C)、不同诱导时间(0、2、4、6、8、10、12 h)及不同 IPTG 浓度(0.00、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 mmol/L)条件下的表达情况, 探索重组蛋白的最优表达条件。

1.2.5 重组蛋白可溶性分析

取优化条件下培养的重组菌菌液 10 mL, 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 PBS 漂洗菌体后制成菌悬液, 再对菌悬液进行超声波细胞破碎(超声工作 5 s, 停 8 s, 功率为 50%, 破碎 30 min)至澄清。破碎液于 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min, 取 100 μ L 上清液加入 20 μ L 6 \times 蛋白载样缓冲液混匀作为上清样品, 其余上清液冷冻保存; 沉淀用 8 mol/L 尿素处理 8 h 后 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min, 其上清液进行 SDS-PAGE 检测, 拍照记录结果。

1.2.6 重组蛋白纯化及蛋白免疫印迹鉴定

将 1.2.5 的细菌破碎上清液与蛋白纯化填料充分孵育后, 重力作用收集流穿液(flow-through, FT)。去除杂蛋白: 每次加入 1 mL 20 mmol/L 咪唑溶液, 收集滤液, 洗 5 次(W1-W5)。洗脱目的蛋白: 每次加入 1 mL 250 mmol/L 咪唑溶液, 收集滤液, 共 8 次(E1-E8)。收集滤液并进行 SDS-PAGE 检测。凝胶采用半干法转膜到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 4 °C 用封闭液(5%脱脂奶粉, 95% TBST)封闭 15 min, TBST 缓冲液漂洗。一抗稀释液(His 鼠单抗)室温孵育 2 h, 二抗稀释液(山羊抗鼠 IgG)室温孵育 1 h, 用 ECL 显色液并通过全自动化学发光图像分析系统显色。

1.2.7 可溶性酶蛋白浓度及几丁质酶活性的测定

将空载体菌液(不含表达载体)、重组菌液(含表达载体)分别经超声波破碎后离心(超声及离心条件同 1.2.5), 其上清液作为上清粗酶液。

对沉淀进行包涵体蛋白复性: 连续用洗涤缓冲液洗去细胞杂质, 变性缓冲液处理 12 h 后收集上清; 按透析法, 用复性缓冲液进行梯度透析复性, 透析时间为 12 h, 实验均在 4 °C 进行, 复性后的蛋白作为沉淀粗酶液。重组菌上清粗酶液经 His-tag 层析柱纯化后, 作为 *Ppchic* 纯化酶液。

采用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定酶液的蛋白浓度, 配制 0-0.5 mg/mL 牛血清蛋白标准品制作蛋白标准曲线, 根据待测样品在 562 nm 处的吸光值与标准曲线回归方程, 计算粗酶液及纯酶液的蛋白浓度。几丁质酶活性的测定方法参考郑家敏等^[20]并做修改: 取 100 μ L 粗酶液/纯酶液(对照组酶液沸水浴 15 min 灭活)与 900 μ L 胶体几丁质混合, 50 °C 孵育 1 h 后加入 500 μ L 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS), 沸水浴 10 min 显色, 冷却后 6 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于 OD_{540} 测定吸光值。以 0-1.0 mg/mL 的 N-乙酰氨基葡萄糖制作还原糖标准曲线, 将每分钟水解胶体几丁质产生 1 μ mol N-乙酰氨基葡萄糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位, 根据吸光值与标准曲线回归方程计算比酶活。

1.2.8 酶蛋白降解几丁质效应检测

设置只含几丁质(对照组)、空载体菌体破碎后的沉淀与上清(对照组)、表达菌体破碎后的沉淀与上清(处理组), 以及纯化的 *Ppchic* 酶蛋白(处理组)共 6 组。采用 BCA 法测定各组总蛋白浓度, 平衡各组浓度均为 110 μ g/mL 后取 0.5 mL 与 2 mL 1.25% 胶体几丁质混合, 只含几丁质的对照组以 2 mL 1.25% 胶体几丁质与 0.5 mL PBS 缓冲液混合。20 °C、150 r/min 孵育 96 h, 记录各组几丁质的降解效果。

1.2.9 重组酶的酶学性质研究

最适温度及热稳定性: 参考 1.2.7 方法,

分别测定不同孵育温度(4、10、20、25、30、35、40、45、50、55、65、75 °C)时 PpchiC 的几丁质酶活性, 将测得的最高酶活定义为 100% 计算相对酶活力, 确定最适反应温度, 并以相对酶活为纵坐标、温度为横坐标作图。重组酶在不同温度(20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、75 °C)保温 2 h, 以未处理的酶活力为 100% 计算不同温度下几丁质酶的残余酶活百分比, 分析酶的热稳定性。

最适 pH 及 pH 稳定性: 参考 1.2.7 方法, 在 pH 3.5–10.0 的不同缓冲体系下测定 PpchiC 几丁质酶活性, 将测得的最高酶活定义为 100% 计算相对酶活力, 确定最适反应 pH, 并以相对酶活为纵坐标、pH 为横坐标作图。重组酶分别置于不同 pH 的缓冲液中, 35 °C 保温 2 h, 以未处理的酶活力为 100% 计算不同 pH 下几丁质酶的残余酶活百分比, 分析酶的 pH 稳定性。

酶动力学参数测定: 在最适反应温度和 pH 条件下, PpchiC 分别与不同浓度(0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 mg/mL)胶体几丁质孵育 1 h, 测定酶促反应初始速度, 利用米氏方程非线性拟合计算米氏常数 K_m 值和酶促最大反应速率 V_{max} 值。

2 结果与分析

2.1 PpchiC 基因及其表达蛋白的生物信息学分析结果

根据杀鱼假交替单胞菌 C923 基因组序列获得一条长度为 1 680 bp 的 PpchiC 基因片段, 去除 PpchiC 基因的信号肽序列, 设计引物克隆到的 ORF 区长度为 1 350 bp, 编码 450 个氨基酸。利用 ExPASy 网站对 PpchiC 蛋白进行分析, 显示其原子总数为 6 716, 分子式为 $C_{2159}H_{3275}N_{589}O_{682}S_{11}$, 分子量为 48.76 kDa, 理

论等电点为 4.78, 不稳定系数为 29.08。在酵母和大肠杆菌中表达的半衰期分别大于 20 h 和 10 h, 在哺乳动物网状红细胞中体外培养表达的半衰期为 4.4 h。PpchiC 基因序列已提交 NCBI GenBank, 获得登录号为 OM994958。

系统发育分析表明, PpchiC (UQJ88294) 与假交替单胞菌 OF7H-1 的几丁质酶(WP_239360592) 聚为一支, 相似度达 99.10%, 高度同源。通过保守结构域数据库预测, PpchiC 在氨基酸残基第 9–51 位含有一个类型 III 几丁质结合域(chitin binding domain III, ChtBD3), 在氨基酸残基第 165–435 位含有一个 GH18 家族催化结构域, 这 2 个功能域在多肽链的位置、大小与其他假交替单胞菌的几丁质酶较相似(图 1)。将 PpchiC 氨基酸序列提交至 SWISS-MODEL 程序, 以 GMQE 评分最高的哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) 几丁质酶 A (3arr.1.A) 作为同源蛋白模板, 获得三级结构(图 2); PpchiC 与同一分支的假交替单胞菌属几丁质酶氨基酸序列进行比对, 总体相似性为 97.62%; 在二级结构预测中 α -螺旋(α -helix)占 28.00%, 无规则卷曲(random coil)占 47.33%, 延伸链(extended strand)占 19.11%, β 折叠(β -sheet)占 5.56%。PpchiC 含有 GH18 家族几丁质酶的保守催化基序 DxxDxDxE、YxR 和 [E/D]xx[V/I], 是保证酶催化活性的重要功能结构域(图 2)。

2.2 重组蛋白的诱导表达及条件优化结果

对测序正确的阳性克隆诱导培养, 获得全菌蛋白进行 SDS-PAGE 检测, 结果如图 3A 所示: 只有插入 PpchiC 基因的菌株在 68 kDa 的位置出现条带, 作为对照组的空载体则无此条带。His 标签融合蛋白的大小为 18.79 kDa, 而 PpchiC 预测的蛋白分子量为 48.76 kDa。因此, 融合蛋白理论大小为 67.55 kDa, 实验结果与预测一致, 表明重组蛋白成功表达。

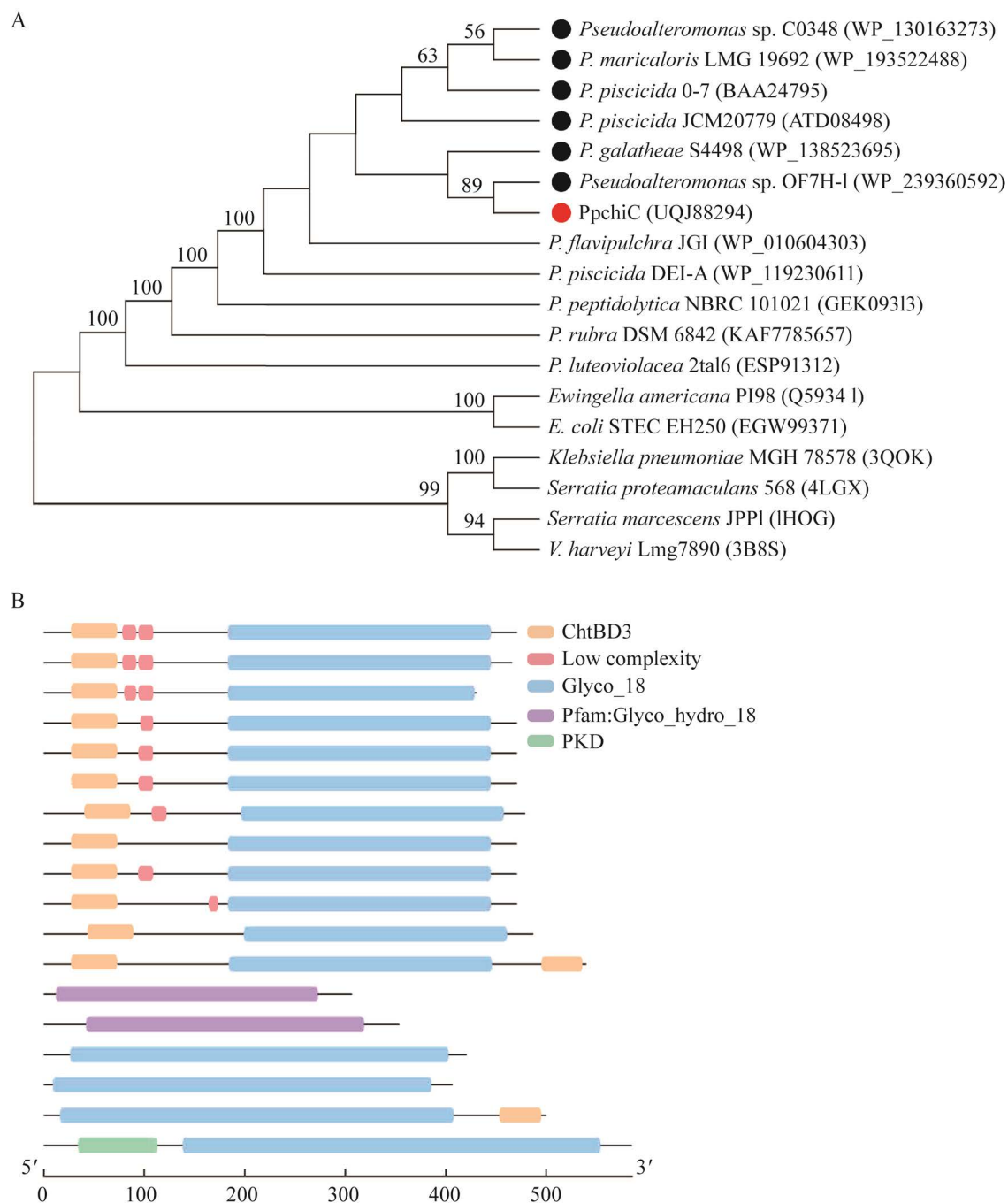


图 1 杀鱼假交替单胞菌 C923 酶蛋白 PpchiC 氨基酸序列的系统发育(A)及结构域(B)分析 Bootstrap 次数为 1 000; 括号所示为序列在 NCBI 的登录号; 红色和黑色圆圈标注的序列将用于多序列比对
Figure 1 Phylogenetic (A) and structural domain (B) analysis of amino acid sequence for the PpchiC of *Pseudoalteromonas piscicida* C923. Bootstrap analysis was performed with 1 000 replicates; the sequences accession number in NCBI were shown in parentheses; the sequences marked with red and black circles will be used for multiple sequence alignment.

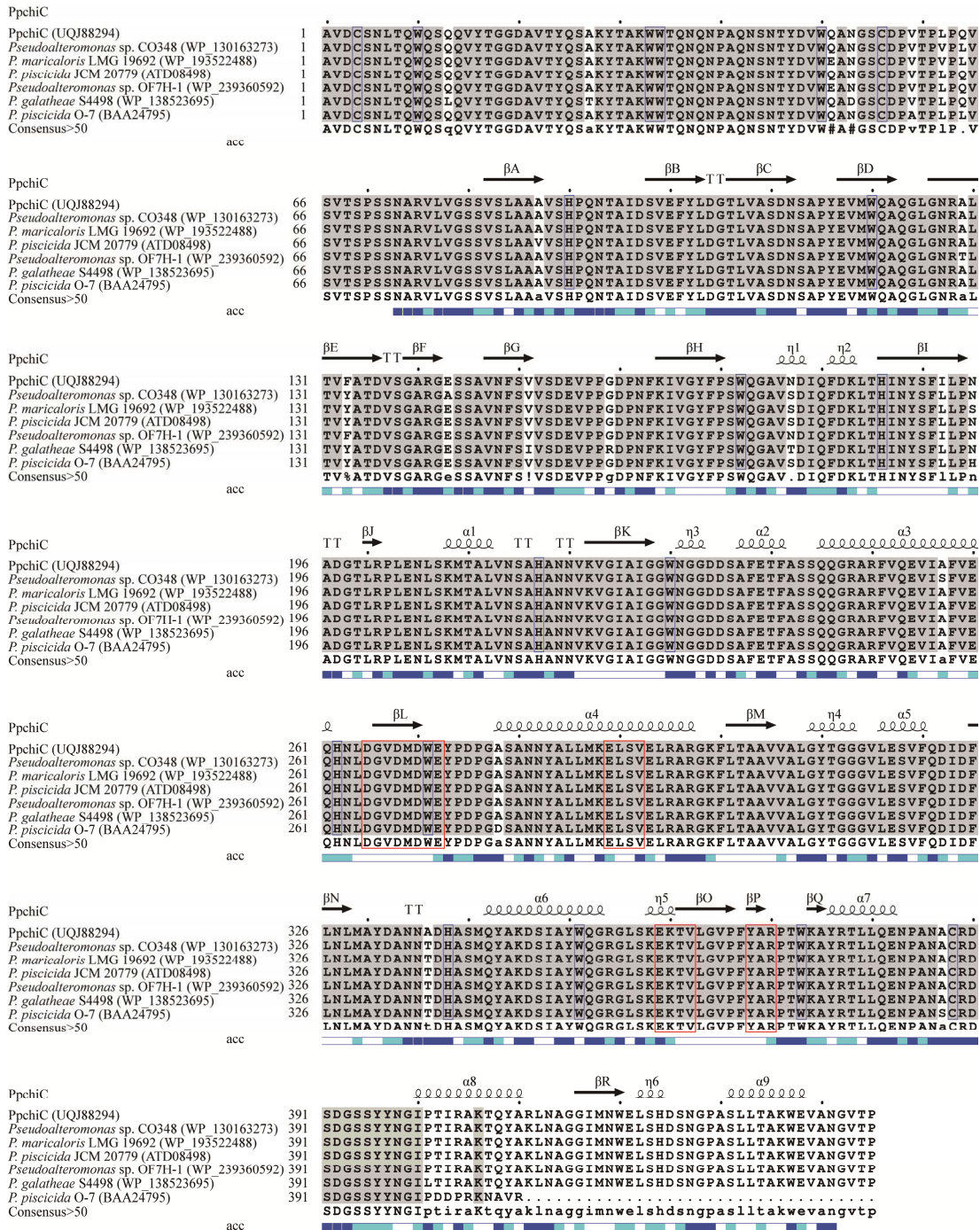


图 2 杀鱼假交替单胞菌 C923 几丁质酶 PpchiC 二级结构及其与其他假交替单胞菌 GH18 家族几丁质酶多序列比对 100%相似性的残基以灰色背景表示，保守基序 DxxDxDxE、YxR 和[E/D]xx[V/I]以红框示意

Figure 2 Secondary structure of chitinase PpchiC of *Pseudoalteromonas piscicida* C923 and its multiple sequence alignment to those belonged to the GH18 family chitinases from other *Pseudoalteromonas* spp.. Residues with 100% identical are shown with a grey background, and the red boxes represent the conserved DxxDxDxE, YxR and [E/D]xx[V/I] motifs.

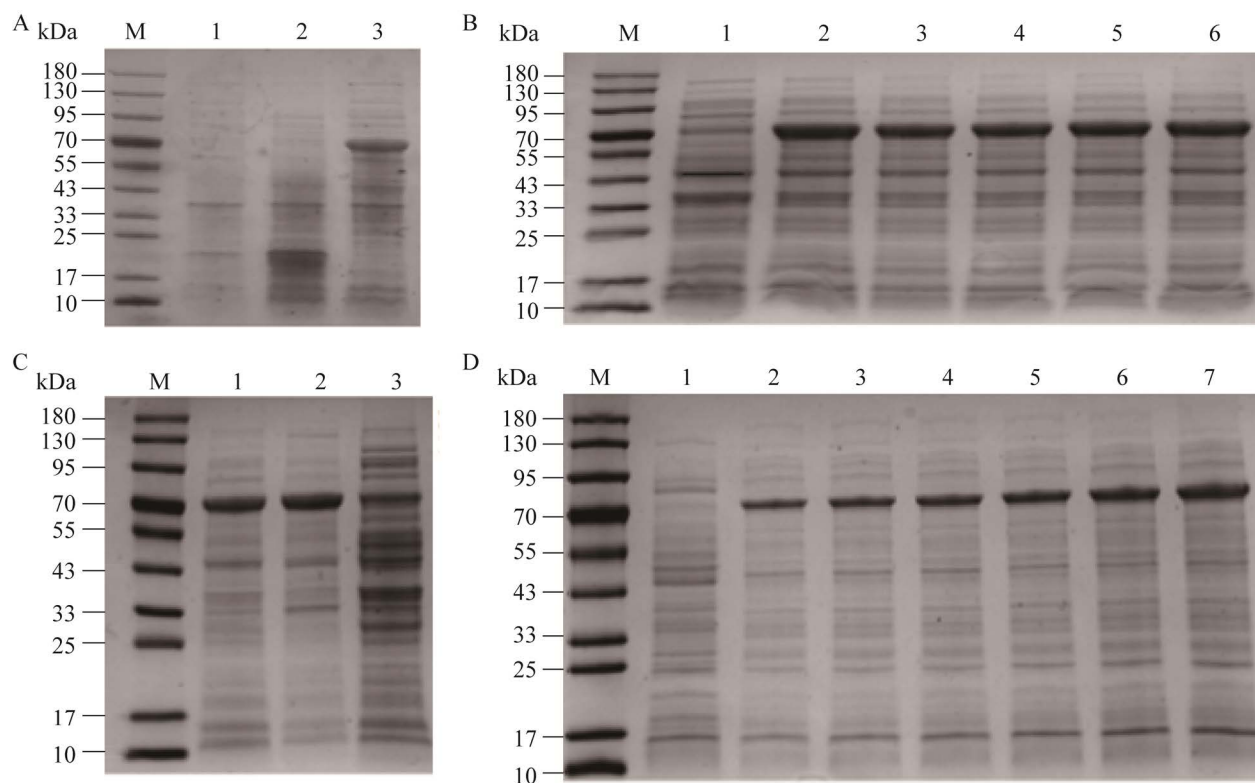


图 3 *PpchiC* 重组蛋白的原核表达及条件优化 M: 蛋白分子标准. A: *PpchiC* 重组蛋白的原核表达. 1-2: 空载体诱导前及诱导后; 3: *PpchiC* 诱导后. B: 最适诱导浓度探索. 1: *PpchiC* 未诱导; 2-6: IPTG 浓度分别为 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 mmol/L. C: 最适诱导温度探索. 1-3: 诱导温度分别为 16、28、37 °C. D: 最适诱导时间探索. 1: *PpchiC* 未诱导; 2-7: 诱导时间分别为 0、2、4、6、8、10、12 h

Figure 3 Prokaryotic expression and expression condition optimization of *PpchiC*. M: Protein molecular standard. A: Prokaryotic expression of *PpchiC*. 1-2: Expression of empty vector before and after induction; 3: Expression of *PpchiC* after induction. B: Exploration of the optimal induction concentration. 1: Expression results of *PpchiC* without induction; 2-6: Expression of *PpchiC* at IPTG concentrations of 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.25 mmol/L, respectively. C: Exploration of the optimal induction temperature. 1-3: Expression of *PpchiC* at 16, 28 and 37 °C. D: Exploration of the optimal induction time. 1: Expression of *PpchiC* without induction; 2-7: Induction time for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 h, respectively.

采用单一变量法分别检测不同的 IPTG 诱导浓度、温度及诱导时间发现, IPTG 浓度为 0.25 mmol/L 时目的蛋白表达量较高, 而且随着 IPTG 诱导剂浓度的增加, 目的蛋白表达量无明显提高(图 3B), 因此将 0.25 mmol/L 作为最佳 IPTG 诱导浓度。温度诱导结果显示, 16、28 °C 条件下蛋白的表达量较多但无明显差异, 而 37 °C 条件下重组蛋白的表达量相对较少(图 3C), 因低温更有利于维持蛋白的空间结构和酶活性,

因此选择 16 °C 作为 *PpchiC* 重组蛋白的最佳诱导温度。在诱导温度为 16 °C 和 IPTG 浓度为 0.25 mmol/L 条件下, 重组蛋白表达量随诱导时间的延长而逐渐增加, 因 12 h 的重组蛋白表达较显著, 因此确定 12 h 为适宜诱导时间。

2.3 *PpchiC* 重组蛋白的可溶性

在已优化的诱导条件下, 对 pET-32a-*PpchiC* 进行诱导培养, 经超声波细胞破碎处理后, 裂解液上清和沉淀样品的 SDS-PAGE 结果显示,

沉淀样品表达出明显单一条带，而上清样品中相应位置的条带较弱(图 4)。这表明 PpchiC 重组蛋白主要以包涵体的形式存在，少部分为可溶性蛋白。

2.4 重组蛋白纯化及蛋白免疫印迹鉴定结果

对纯化后的 PpchiC 蛋白进行 PAGE 检测

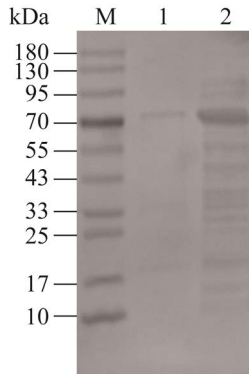


图 4 PpchiC 重组蛋白可溶性分析 M: 蛋白分子标准; 1: PpchiC 裂解液上清; 2: PpchiC 裂解液沉淀

Figure 4 Solubility analysis of PpchiC recombinant protein. M: Protein molecular standard; 1: PpchiC lysate supernatant; 2: PpchiC lysate precipitate.

的结果如图 5 所示，在流穿液(FT)及低浓度咪唑滤液(W1、W5)中无明显条带，洗脱液 E1-E6 的条带由浅变深再变浅且无杂带，E7-E8 则无条带。表明目的蛋白充分结合到层析柱上，经 250 mmol/L 咪唑溶液洗脱后已基本被收集。对纯化后的蛋白进行免疫印迹鉴定，结果显示为单一目的条带，表明 PpchiC 重组蛋白与 His-Tag 单克隆抗体特异性结合，PpchiC 酶蛋白纯化效果较好。

2.5 酶蛋白降解几丁质效应

表达菌菌体沉淀与上清、纯化的 PpchiC 等各组总蛋白浓度、几丁质酶活性及比酶活的测定结果如表 1 所示，可见表达菌菌体沉淀与上清及纯化的 PpchiC 酶蛋白组的几丁质酶活性均明显高于空载体菌体沉淀与上清组，尤其表达菌沉淀组因酶蛋白较多富集，其酶活性分别是上清组与纯化组的 3.88 倍与 4.19 倍；但比酶活则是纯化的酶蛋白最高。总体上这些酶活性变化与直接观察到的降解效果相对应，如图 6 所示，与胶体几丁质对照相比，表达菌菌体沉

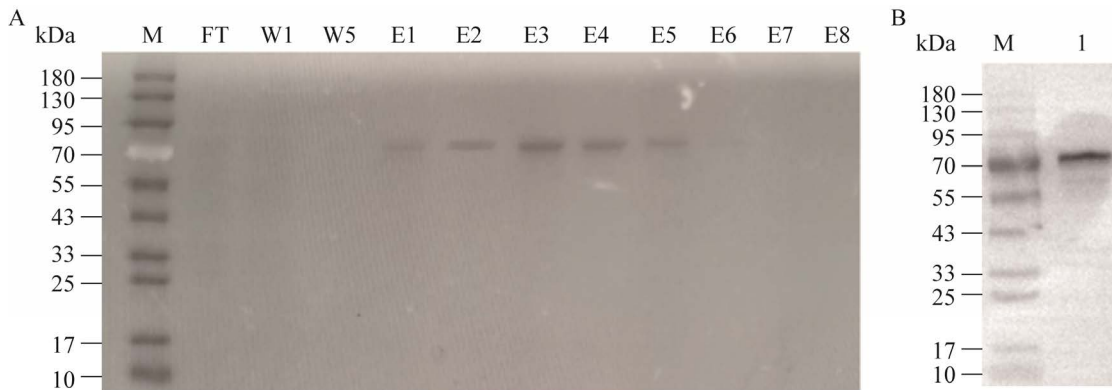


图 5 PpchiC 重组蛋白纯化及 Western blotting 鉴定结果 A: PpchiC 重组蛋白纯化结果. M: 蛋白分子标准; FT: 流穿液; W1 和 W5: 第 1 次和第 5 次收集的 20 mmol/L 咪唑滤液; E1-E8: 第 1-8 次收集的 250 mmol/L 咪唑洗脱液. B: PpchiC 重组蛋白 Western blotting 检测结果. 1: PpchiC 重组蛋白

Figure 5 Purification and Western blotting identification results of PpchiC recombinant protein. A: Purification of PpchiC recombinant protein. M: Protein molecular standard; FT: Flow-through solution; W1, W5: 20 mmol/L imidazole filtrate collected in the 1st and 5th times; E1-E8: 250 mmol/L imidazole eluate collected in the 1st to 8th times. B: Western blotting identification results of PpchiC recombinant protein. 1: PpchiC recombinant protein.

表 1 粗酶液、纯化酶液蛋白浓度及几丁质酶活测定结果

Table 1 Results of protein concentration and chitinase activity of crude enzyme solution and purified enzyme solution

组别 Group	总蛋白浓度 Total protein concentration (mg/mL)	几丁质酶活 Chitinase activity (U/mL)	比酶活 Specific activity (U/mg)
胶体几丁质对照 Colloidal chitin control	—	—	—
空载体菌体沉淀 Empty carrier cell sedimentation	4.41	0.17	0.04
空载体菌体上清 Empty carrier cell supernatant	1.52	0.15	0.10
表达菌菌体沉淀 Expressed cell sedimentation	7.74	7.38	0.95
表达菌菌体上清 Expressed cell supernatant	1.85	1.90	1.03
纯化的 <i>PpchiC</i> 酶蛋白 Purified <i>PpchiC</i> protein	0.72	1.76	2.44

—: 未检出

-: Not detected.

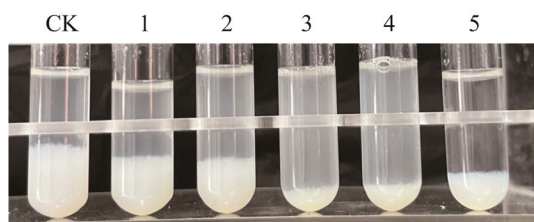


图 6 不同粗酶液及 *PpchiC* 纯化酶液对胶体几丁质的降解效应 CK: 胶体几丁质对照; 1: 空载体菌体沉淀; 2: 空载体菌体上清; 3: 表达菌菌体沉淀; 4: 表达菌菌体上清; 5: 纯化的 *PpchiC* 酶蛋白

Figure 6 Degradation effects of different crude enzyme solutions and purified *PpchiC* to colloidal chitin. CK: Colloidal chitin control; 1: Empty carrier cell sediment; 2: Empty carrier cell supernatant; 3: *PpchiC* expressed cell sediment; 4: *PpchiC* expressed cell supernatant; 5: Purified *PpchiC* protein.

淀组的几丁质剩余量最少, 降解速度最快; 表达菌菌体上清组降解速度次之, 其后为纯化的酶蛋白组, 表明载体表达的酶蛋白活性较好, 其中纯化的 *PpchiC* 酶蛋白组在静置 5 min 后上层液体最为透明澄清, 这可能与该组杂质较少有关。以上表明 *PpchiC* 有着较好的几丁质降解效应。

2.6 *PpchiC* 酶学性质

图 7A 表明 *PpchiC* 酶最适反应温度为 50 °C, 在 4 °C 和 75 °C 时相对酶活分别为 37.8% 和 58.0%。热稳定性研究发现, 在 20–45 °C 保温 2 h 该酶仍保留 90% 以上的酶活力, 而当温度超过 50 °C 时, 2 h 后酶活性下降到 50% 左右(图 7B)。图 7C 表明 *PpchiC* 酶在 pH 值为 8.0 时表现最高酶活力, 当 pH 值为 3.5 和 10.0 时酶活性下降至最高酶活的 10% 和 31%。此外, *PpchiC* 酶在 pH 4.5–9.0 缓冲液孵育 2 h 后仍保留 50% 以上的酶活力(图 7D)。通过孵育不同浓度的胶体几丁质测定几丁质酶活, 利用米氏方程非线性拟合得到该酶的 V_{\max} 值为 5.04 mg/(mL·min)、 K_m 值为 2.58 mg/mL。

3 讨论

3.1 菌株 C923 基因 *PpchiC* 及其编码蛋白结构

本研究成功克隆到杀鱼假交替单胞菌 C923 基因 *PpchiC*, 系统发育分析表明该基因编码的蛋白 *PpchiC* 与 6 株假交替单胞菌的 GH18 家族几丁质酶聚为一支, 整体相似性为 97.62%, 而且与其中 OF7H-1 菌株的几丁质酶(WP_239360592.1)氨

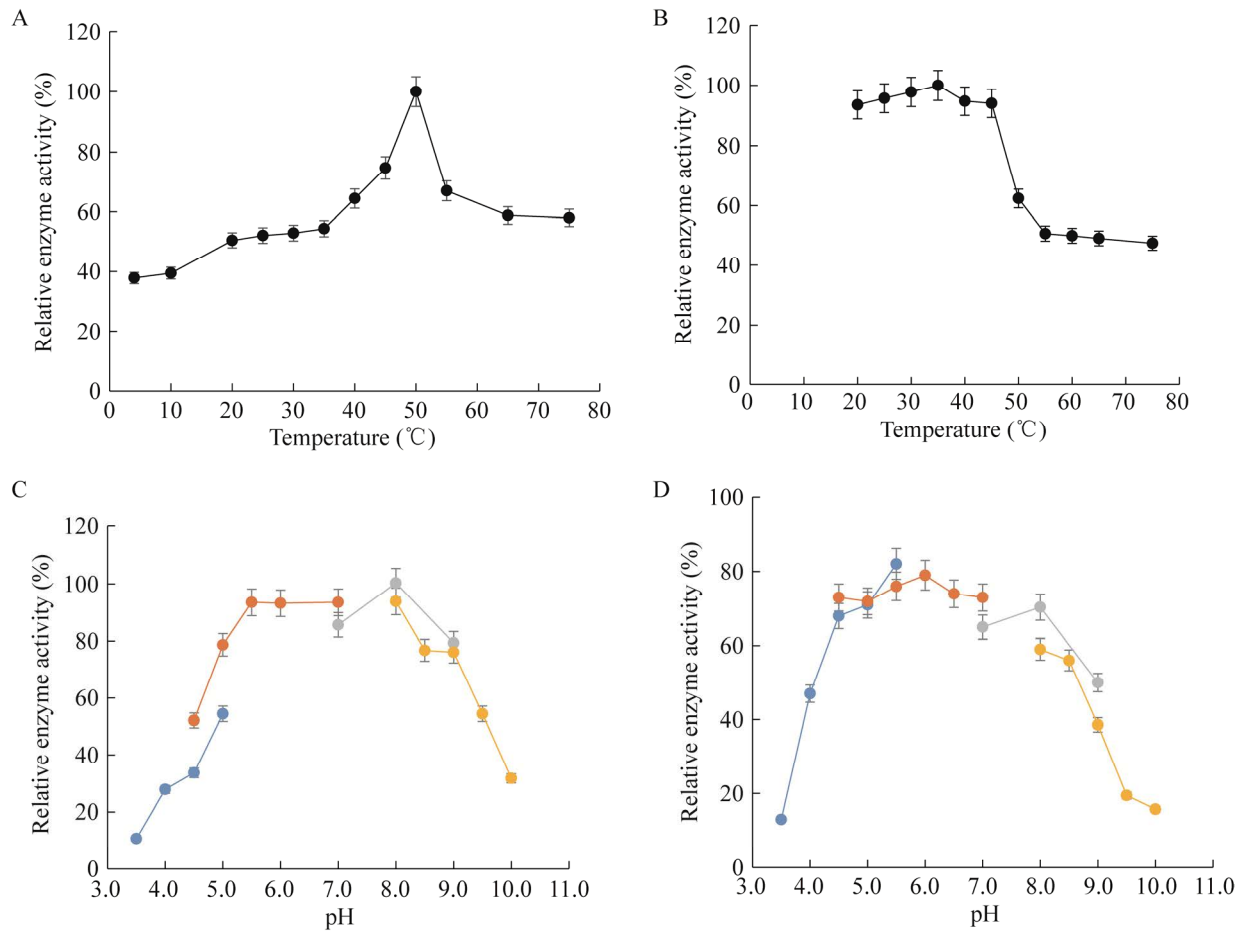


图7 温度和 pH 对 Ppchic 酶活性与稳定性的影响 A: 反应温度对酶活性的影响. B: Ppchic 酶的热稳定性. C: pH 对酶活性的影响. D: Ppchic 酶的 pH 稳定性. 反应所用缓冲液分别为醋酸盐缓冲液 (pH 3.5–5.5)、柠檬酸钠-磷酸盐缓冲液 (pH 4.5–7.0)、Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0–9.0)、甘氨酸缓冲液 (pH 8.0–10.0)

Figure 7 Effect of temperature and pH on activity of Ppchic. A: Effect of reaction temperature. B: Thermal stability of Ppchic enzyme. C: Effect of reaction pH. D: pH stability of Ppchic enzyme. The buffers used were acetate buffer (pH 3.5–5.5), sodium citrate-phosphate buffer (pH 4.5–7.0), Tris-HCl buffer (pH 7.0–9.0), and glycine buffer (pH 8.0–10.0), respectively.

基酸序列相似性达 99.10%，这表明 *Ppchic* 可能是假交替单胞菌属产几丁质酶菌株的一个较保守基因，其同源基因在属内不同种间有着较广泛分布，但功能是否相同尚待进一步研究。对 *Ppchic* 基因编码的氨基酸序列进行二级结构预测和三级建模发现，Ppchic 酶蛋白包含一个类型 III 几丁质结合域 (ChtBD3) 和一个 GH18 催化

结构域，这与大多数已报道的 GH18 家族几丁质酶蛋白相似^[21]。几丁质结合域对酶结合不可溶的几丁质可能是必需的，如 Watanabe 等^[22]对环状芽孢杆菌 (*Bacillus circularis*) 研究发现，ChtBD3 在几丁质酶降解几丁质过程中促进催化域与底物结合；此外，ChtBD3 还促进底物脱乙酰基，提高脱乙酰度，有利于底物由不溶

性转化为可溶性, 因此结合域对几丁质酶降解活性起关键作用。

本研究发现 *PpchiC* 的氨基酸序列中含有 GH18 家族最典型的保守催化基序“DxxDxDxE”, 其中包含充当催化位点的谷氨酸, 能够促进酶与底物结合, 对酶催化活性起重要作用^[23], 这也与 Wang 等报道在众多假交替单胞菌菌株中具有的一致基序及其功能相同^[14]。Vaaje-Kolstad 等^[24]报道粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)基因 *chiB* 编码的几丁质酶氨基酸中有保守基序“DxDxE”, 其中的天冬氨酸与谷氨酸是关键催化位点。Churklam 等^[25]发现, 单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的几丁质酶(LmChiA 和 LmChiB)同样具有保守的“DxDxE”基序, 通过定点诱变“DxDxE”基序中保守的天冬氨酸和谷氨酸残基, 发现两种几丁质酶对胶体几丁质的分解活性均显著降低。GH18 家族几丁质酶根据序列和结构特征又可被分为 A、B、C 3 个亚家族。A 亚家族几丁质酶在 loop 7 上具有($\alpha+\beta$)插入结构域(CID)^[8], 结合 *PpchiC* 结构域内存在 A 亚家族两个相对保守基序 YxR 与[E/D]xx[V/I]^[26], 参与底物结合与催化, 因此 *PpchiC* 可能是 A 亚家族的一员, 通过持续性作用于几丁质多糖或寡糖的一端, 依次水解产生二糖单元。可见, DxDxE、YxR 与[E/D]xx[V/I]等保守基序在几丁质酶的催化机制中起着关键作用。本研究 C923 菌株基因 *PpchiC* 具有 GH18 家族几丁质酶典型而保守的结构特征, 从而具备高效降解几丁质的潜能。

3.2 *PpchiC* 蛋白的原核表达及其酶学性质

García-Fraga 等^[15]报道, 表达菌体的浓度、温度、pH 及诱导剂浓度均是影响几丁质酶异源表达的重要因子, 而且不同菌的几丁质酶最优表达时对这些因素的要求范围不同, 因此, 对有潜在应用价值的几丁质酶应明晰其最

优表达状态。本研究对诱导时间、诱导温度及 IPTG 浓度进行优化发现, 诱导温度为 16、28 °C 时, 目的蛋白表达量高且无明显差异, 而 37 °C 时 *PpchiC* 的表达量低于前 2 个温度, 推测这可能是在高温诱导表达过程中, 蛋白进行加工时因速率太快导致空间错误折叠形成包涵体, 而低温有利于减缓蛋白加工速率, 提高可溶性蛋白得率^[27]。张博阳等^[28]也报道诱导温度为 16 °C 时, 桑氏链霉菌(*Streptomyces sampsonii*)几丁质酶 *ChiKJ40* 基因在大肠杆菌中能高效表达。针对诱导时间, 本研究发现 0–12 h 内, 随着诱导时间的延长, *PpchiC* 表达量逐渐提高, 虽然未出现拐点无法确定最佳诱导时间, 但 12 h 已表达大量重组蛋白, 而诱导时间过长则不利于生产应用, 因此将 12 h 作为适宜的诱导时间。优化实验还表明, IPTG 浓度对 *PpchiC* 酶蛋白的表达无明显影响, 在 0.25 mmol/L 时 *PpchiC* 已高效表达, 这与张博阳等^[28]报道不同浓度 IPTG 对几丁质酶 *ChiKJ40* 基因的表达无明显差异的结果相似。对 *PpchiC* 酶学性质的研究发现, 该酶在 50 °C 表现出最高酶活, 在 20–45 °C 保温 2 h 仍能维持 90% 以上酶活性, 热稳定性较好。*PpchiC* 的最适 pH 值为 8.0, 在 pH 4.5–9.0 之间孵育 2 h 仍有 50% 以上酶活力, 有着良好的 pH 稳定性。最适反应条件下, *PpchiC* 的米氏常数 K_m 值为 2.58 mg/mL, 说明该酶有较强的底物结合能力。因此, 本研究获得的几丁质酶 *PpchiC* 最佳表达条件与酶学性质可为该基因的功能应用提供依据。

3.3 *PpchiC* 酶蛋白功能

本研究发现, 基因 *PpchiC* 表达菌破碎后的菌体沉淀、上清及从上清中纯化的 *PpchiC* 酶蛋白均能较快速地降解几丁质, 但三者之间也呈现一定差异。表达菌沉淀组在降解速度上优于上清组, 这可能是表达的 *PpchiC* 较多集中于沉

淀促进了几丁质的快速降解。各组在静置 5 min 后, 表达菌沉淀组与上清组的试管底部残留的大颗粒几丁质胶体较少, 而纯化 PpchiC 酶蛋白降解效果不及前两者, 这可能是菌体中含有的其他几丁质降解相关酶与 PpchiC 协同作用时比单一 PpchiC 的作用更好。例如, Qin 等^[29]克隆表达嗜热细菌(*Caldicellulosiruptor acetigenus*) 的几丁质酶 CaChiT 和 CaHex 后进行酶解产物分析发现, 两者在降解胶体几丁质中表现出协同作用。Wang 等^[14]也报道从假交替单胞菌 DL-6 克隆表达的几丁质酶 ChiA 与 ChiC 在促进多种形式几丁质化合物降解中均有着明显的协同作用, 而且能够将几丁质降解至单体 GlcNAc。鉴于几丁质降解是一复杂的涉及到多种酶与结合蛋白的作用过程, 对菌株 C923 基因 *PpchiC* 与其他几丁质降解基因的协同作用值得进一步研究。

几丁质作为饲料添加剂, 具有抗菌、防病和增强水产动物免疫等功效^[6]。然而 Clark 等^[30]报道凡纳滨对虾摄食 1%–4% 几丁质后表现消化率为 32%–39%, 表明对虾自身对几丁质有一定利用能力, 但较低的消化率有待提高。本课题组前期研究发现, 菌株 C923 拌料投喂凡纳滨对虾, 与适量几丁质饲料混合投喂时可降低饲料系数, 显著提高增重率, 促进对虾生长^[19]。本研究进一步发现菌株 C923 基因 *PpchiC* 表达产物具备典型的几丁质酶功能域特征, 而且表达纯化的几丁质酶和表达菌的粗酶液都有较好的几丁质降解活性, 因此该菌株可促进对虾吸收利用几丁质, 发挥几丁质这一重要营养素在提高对虾生长与免疫中的功效。

4 结论

本研究从杀鱼假交替单胞菌 C923 中克隆得到一个几丁质酶基因 *PpchiC*, 并成功在大肠

杆菌中表达。PpchiC 对几丁质的降解作用明显, 优化表达条件为 16 °C、0.25 mmol/L IPTG 诱导 12 h; PpchiC 最适反应温度和 pH 分别为 50 °C 和 pH 8.0, 在温度 20–45 °C、pH 4.5–9.0 范围内具有较高的稳定性。本研究完善了菌株 C923 作为对虾养殖用几丁质降解益生菌的背景, 拓展了几丁质酶的来源, 为其应用提供了参考依据。

REFERENCES

- [1] PATEL S, GOYAL A. Chitin and chitinase: role in pathogenicity, allergenicity and health[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 97: 331-338.
- [2] FOX CJ. The effect of dietary chitin on the growth, survival and chitinase levels in the digestive gland of juvenile *Penaeus monodon* (Fab.)[J]. *Aquaculture*, 1993, 109(1): 39-49.
- [3] SHIAU SY, YU YP. Chitin but not chitosan supplementation enhances growth of grass shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *The Journal of Nutrition*, 1998, 128(5): 908-912.
- [4] KUMAR P, SAHU NP, SAHARAN N, REDDY AK, KUMAR S. Effect of dietary source and level of chitin on growth and survival of post-larvae *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2006, 22(5): 363-368.
- [5] 刘兴旺. 甲壳动物碳水化合物利用研究进展[J]. *广东饲料*, 2015, 24(1): 42-44.
LIU XW. Research progress on carbohydrate utilization of crustaceans[J]. *Guangdong Feed*, 2015, 24(1): 42-44 (in Chinese).
- [6] NIU J, LI CH, TIAN LX, LIU YJ, CHEN X, WU KC, JUN W, HUANG Z, WANG Y, LIN HZ. Suitable dietary chitosan improves the growth performance, survival and immune function of tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(7): 1668-1678.
- [7] PORIA V, RANA A, KUMARI A, GREWAL J, PRANAW K, SINGH S. Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications[J]. *Biology*, 2021, 10(12): 1319.
- [8] 赵沙, 颜子娟, 张舒, 余俊红, 吴秀芸, 王禄山. 细菌几丁质酶结构、功能及分子设计的研究进展[J]. *生*

- 物化学与生物物理进展, 2022, 49(7): 1179-1191.
- ZHAO S, YAN ZJ, ZHANG S, YU JH, WU XY, WANG LS. Research progress on structure, function and molecular design of bacterial chitinase[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2022, 49(7): 1179-1191 (in Chinese).
- [9] ITOH T, KIMOTO H. Bacterial chitinase system as a model of chitin biodegradation[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2019, 1142: 131-151.
- [10] BOWMAN J. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*[J]. Marine Drugs, 2007, 5(4): 220-241.
- [11] PAULSEN SS, STRUBE ML, BECH PK, GRAM L, SONNENSCHNEIN EC. Marine chitinolytic *Pseudoalteromonas* represents an untapped reservoir of bioactive potential[J]. mSystems, 2019, 4(4): e00060-19.
- [12] YU M, TANG KH, LIU JW, SHI XC, GULDER TAM, ZHANG XH. Genome analysis of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1 reveals various survival advantages in marine environment[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 707.
- [13] MAKHDOUNI A, DEGHANI-JOYBARI Z, MASHREGHI M, JAMIALAHMADI K, ASODEH A. A novel halo-alkali-tolerant and thermo-tolerant chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. DC14 isolated from the Caspian Sea[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2015, 12(12): 3895-3904.
- [14] WANG XH, CHI NY, BAI FW, DU YG, ZHAO Y, YIN H. Characterization of a cold-adapted and salt-tolerant exo-chitinase (ChiC) from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6[J]. Extremophiles, 2016, 20(2): 167-176.
- [15] GARCÍA-FRAGA B, da SILVA AF, LÓPEZ-SEIJAS J, SIEIRO C. Optimized expression conditions for enhancing production of two recombinant chitinolytic enzymes from different prokaryote domains[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(12): 2477-2486.
- [16] HOLT CC, BASS D, STENTIFORD GD, van der GIEZEN M. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2021, 186: 107387.
- [17] TZUC JT, ESCALANTE DR, ROJAS HERRERA R, GAXIOLA CORTÉS G, ORTIZ MLA. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. SpringerPlus, 2014, 3(1): 280.
- [18] GAO S, PAN LQ, HUANG F, SONG MS, TIAN CC, ZHANG MY. Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of the farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Aquaculture, 2019, 499: 109-118.
- [19] 宁为民. 一株几丁质降解菌的分离鉴定、酶基因克隆表达及对凡纳对虾生长和肠道菌群影响[D]. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文, 2021.
- NING WM. Isolation and identification of a chitin-degrading bacterium, cloning and expression of chitinase genes, and its effect on the growth and intestinal microbiota of *Penaeus vannamei*[D]. Zhanjiang: Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2021 (in Chinese)
- [20] 郑家敏, 梁燕辉, 朱凡, 叶秀云, 林娟. 几丁质酶基因的克隆表达及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1027-1034.
- ZHENG JM, LIANG YH, ZHU F, YE XY, LIN J. Cloning, expression and characterization of the chitinase gene from *Vibrio* sp. GR52[J]. Microbiology China, 2018, 45(5): 1027-1034 (in Chinese).
- [21] 王艳君. 海洋假交替单胞菌属细菌降解几丁质的特性及新型几丁质酶的表达[J]. 山东大学博士学位论文, 2020.
- WANG YJ. Characterization of chitin degradation of *Pseudoalteromonas* and novel chitinases[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2020 (in Chinese)
- [22] WATANABE T, ITO Y, YAMADA T, HASHIMOTO M, SEKINE S, TANAKA H. The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(15): 4465-4472.
- [23] SYNSTAD B, GÅSEIDNES S, van AALTEN DMF, VRIEND G, NIELSEN JE, EIJSINK VGH. Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(2): 253-262.
- [24] VAAJE-KOLSTAD G, HORN SJ, SØRLIE M, EIJSINK VGH. The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*-a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides[J]. The FEBS Journal, 2013, 280(13): 3028-3049.
- [25] CHURKLAM W, AUNPAD R. Enzymatic characterization

- and structure-function relationship of two chitinases, LmChiA and LmChiB, from *Listeria monocytogenes*[J]. *Heliyon*, 2020, 6(7): e04252.
- [26] LI H, GREENE LH. Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8654.
- [27] 周维, 汤菊芬, 高增鸿, 甘桢, 简纪常, 吴灶和, 丁燊. 哈维氏弧菌 *qnr* 基因的克隆及原核表达条件优化[J]. *广东海洋大学学报*, 2016, 36(1): 93-97.
ZHOU W, TANG JF, GAO ZH, GAN Z, JIAN JC, WU ZH, DING Y. Cloning and optimization of prokaryotic expression of quinolone resistance gene in *Vibrio harveyi*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2016, 36(1): 93-97 (in Chinese).
- [28] 张博阳, 朱天辉, 韩珊, 王莹, 李姝江, 譙天敏. 桑氏链霉菌几丁质酶 *ChiKJ40* 基因的克隆表达及其抑菌作用[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(5): 1016-1026.
ZHANG BY, ZHU TH, HAN S, WANG Y, LI SJ, QIAO TM. Cloning, expression and antibacterial functions of *ChiKJ40*, a chitinase gene from *Streptomyces sampsonii*[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(5): 1016-1026 (in Chinese).
- [29] QIN X, XIN YZ, SU XY, WANG XL, ZHANG J, TU T, WANG YR, YAO B, HUANG HQ, LUO HY. Heterologous expression and characterization of thermostable chitinase and β -N-acetylhexosaminidase from *Caldicellulosiruptor acetigenus* and their synergistic action on the bioconversion of chitin into N-acetyl-D[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 192: 250-257.
- [30] CLARK DJ, LAWRENCE AL, SWAKON DHD. Apparent chitin digestibility in penaeid shrimp[J]. *Aquaculture*, 1993, 109(1): 51-57.