

一株蛙源几丁质分解菌 JD-3 的分离鉴定、全基因组测序及功能分析

王蕊^{1#}, 林星荣^{1#}, 王婉婷¹, 沈迎芳^{1,2,3}, 张涓泽^{1,2,3*}

1 青海民族大学 生态环境与资源学院, 青海 西宁

2 青海省特色经济植物高值化利用重点实验室, 青海 西宁

3 国家民委青藏高原资源化学与生态环境保护重点实验室, 青海 西宁

王蕊, 林星荣, 王婉婷, 沈迎芳, 张涓泽. 一株蛙源几丁质分解菌 JD-3 的分离鉴定、全基因组测序及功能分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1571-1586.

WANG Rui, LIN Xingrong, WANG Wanting, SHEN Yingfang, ZHANG Xuze. Isolation, identification, whole genome sequencing, and functional analysis of a frog-derived chitin-degrading bacterium JD-3[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(4): 1571-1586.

摘要: 【目的】从两栖动物肠道中分离并筛选能够有效分解几丁质的菌株, 研究其发酵条件、酶学特性, 并进行细菌全基因组测序及功能分析。【方法】对高原林蛙肠道内容物进行筛选, 分离出 1 株具有产几丁质酶能力的菌株, 并进行形态学和分子生物学鉴定; 通过单因素试验和响应面试验对产酶条件进行优化, 并研究其酶学性质; 开展全基因组测序, 鉴定几丁质酶基因家族。【结果】筛选到 1 株可有效产几丁质酶的菌株 JD-3, 经鉴定为麦芽香肉食杆菌(*Carnobacterium maltaromaticum*)。最佳产酶条件为: 发酵时间 2.47 d, 发酵温度 31.4 °C, 初始 pH 4.9, 接种量 4%, 酶活性达到 12 mU/mL。酶学性质分析表明, 该酶的最适反应温度为 20 °C, pH 3.0, 在室温、酸性条件下表现出良好的稳定性。全基因组分析显示, JD-3 基因组全长为 4 195 636 bp, 包含 6 个环状重叠群(contig)、63 个 tRNA 基因、19 个 rRNA 基因和 3 864 个蛋白质编码序列(coding sequence, CDS)。在基因组中鉴定出 2 个几丁质酶基因, 均属于 GH18 家族, 系统发育分析将其归为 2 个不同的类别。【结论】从高原两栖动物肠道中分离出 1 株具有常温耐酸特性的几丁质分解菌, 经形态学和系统发育鉴定为麦芽香肉食杆菌, 这为动物消化系统微生物资源的开发利用提供了新思路。

资助项目: 国家自然科学基金(32360260); 青海省自然科学基金(2020-ZJ-965Q); 青海省昆仑英才项目(QHKLYC-GDCXCXY-2023-138); 青海民族大学校级规划项目(ESDYJ24); 青海民族大学产教融合研究生联合培养基地建设项目; 青海民族大学校级教学成果培育项目

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32360260), the Natural Science Foundation of Qinghai Province (2020-ZJ-965Q), the Kunlun Talents Program of Qinghai Province (QHKLYC-GDCXCXY-2023-138), the Qinghai Minzu University Special Project (ESDYJ24), the Qinghai Minzu University Industry-education Integration Joint Postgraduate Training Base Construction Project, and the Qinghai Minzu University School-level Teaching Achievement Cultivation Project.

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: zxz1904@126.com

Received: 2024-11-15; Accepted: 2025-01-20; Published online: 2025-03-03

关键词：高原林蛙；肠道微生物；几丁质分解菌；产酶条件优化；细菌全基因组

Isolation, identification, whole genome sequencing, and functional analysis of a frog-derived chitin-degrading bacterium JD-3

WANG Rui^{1#}, LIN Xingrong^{1#}, WANG Wanting¹, SHEN Yingfang^{1,2,3}, ZHANG Xuze^{1,2,3*}

1 College of Ecological Environment and Resources, Qinghai Minzu University, Xining, Qinghai, China

2 Qinghai Provincial Key Laboratory of High-value Utilization of Characteristic Economic Plants, Xining, Qinghai, China

3 Qinghai-Tibet Plateau Key Laboratory of Resource Chemistry and Ecological Environment Protection of the National Ethnic Affairs Commission, Xining, Qinghai, China

Abstract: [Objective] To establish a theoretical foundation for the application and development of chitinases, this study isolated and screened chitin-degrading bacteria from the intestines of amphibians, optimized their fermentation conditions, characterized their enzymatic properties, and analyzed their whole genomes. [Methods] A strain capable of producing chitinase was isolated from the intestinal contents of *Rana kukunoris* and identified based on morphological characteristics and molecular biological evidence. The enzyme production conditions of the strain were optimized by single factor and response surface methodology (RSM) experiments, and the enzymatic properties were studied. Whole genome sequencing was carried out for identification of the chitinase gene family. [Results] The chitin-degrading strain JD-3 was identified as *Carnobacterium maltaromaticum*. This strain achieved the highest enzyme activity of 12 mU/mL after fermentation with the inoculum amount of 4% at 31.4 °C and initial pH 4.9 for 2.47 d. The optimal reaction conditions of the enzyme were 20 °C and pH 3.0, and the enzyme maintained good stability at room temperature and under acidic conditions. The genome of JD-3 was 4 195 636 bp long, containing 6 circular contigs, 63 tRNA genes, 19 rRNA genes, and 3 864 protein coding sequences. Two chitinase genes belonging to the glycoside hydrolase family 18 (GH18) were identified and phylogenetically classified into two distinct categories. [Conclusion] We isolated an acid-tolerant chitin-degrading bacterium, *C. maltaromaticum* JD-3, from the intestines of plateau amphibians. The findings provide new insights into the development and utilization of microbial resources in the digestive systems of animals.

Keywords: *Rana kukunoris*; gut microbiota; chitin-degrading bacterium; optimization of enzyme production conditions; bacterial whole genome sequence

几丁质(chitin)是由 N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetylgluco-samine, GlcNAc)单元通过 β -1,4-糖苷键连接而成的多聚物,在自然界中的含量仅次于纤维素^[1],广泛分布于水生和陆地生态系

统^[2]。几丁质酶(chitinase)属于糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GH),能够催化几丁质脱去 N-乙酰氨基葡萄糖,从而分解几丁质^[3]。根据其作用机制的不同,几丁质酶可分为内切型

几丁质酶(endochitinase, EC 3.2.1.14)和外切型几丁质酶(exochitinase, EC 3.2.1.29)。内切型几丁质酶在几丁质链的中间部位随机断裂 β -1,4糖苷键,生成多种长度的低聚糖;而外切型几丁质酶则从几丁质链的末端开始,依次移除几丁二糖单元^[4]。内切几丁质酶主要来源于GH18和GH19这2个糖苷水解酶家族,外切几丁质酶则主要来源于GH18和GH20糖苷水解酶家族^[5]。几丁质酶广泛分布于细菌、真菌、病毒、动物和高等植物等多种生物体中^[6],在降解农业、水产业中的几丁质废弃物,调控病原真菌,增强作物抗病力等方面具有重要应用价值^[7]。

动物消化道内寄居着复杂且稳定的微生物群落^[8]。这些微生物在生物降解、为宿主提供必需营养成分等方面起着重要作用^[9-10],同时还具备疾病防治、生态平衡维持等多种功能^[11-12]。Dar等^[13]成功从褐云玛瑙螺(*Achatina fulica*)肠道中分离出32株纤维素降解菌;Saranya等^[14]揭示了皱纹螺旋粉虱(*Aleurodicus rugioperculatus* Martin)肠道细菌群落的功能及在宿主营养供应方面的重要作用。食虫动物消化系统演化出了专门的几丁质降解机制,使其能够高效分解富含几丁质的昆虫外骨骼^[15],不仅提高了食虫动物的营养获取效率,也为微生物在工业应用中的潜力提供了新的视角。Macdonald等^[16]在节尾猴(*Callimico goeldii*)的粪便中筛选出了能够降解几丁质的细菌,包括纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等。Zhang等^[17]研究发现,两栖动物肠道中的普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)等细菌对食物的消化与吸收、肠道调控至关重要;Lombardo^[18]研究发现,两栖动物肠道中存在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等真菌,帮助宿主分解纤维素和其他难以消化的物质;Dhole

等^[19]在黑眶蟾蜍(*Duttaphrynus melanostictus*)的肠道中成功分离出几丁质分解菌;Xu等^[20]基于16S rRNA基因测序,在饰纹姬蛙(*Microhyla fissipes*)肠道中也筛选到几丁质分解菌。然而,关于两栖动物肠道微生物筛选并纯化几丁质分解菌的报道仍较少,这限制了对几丁质分解菌资源的开发利用。进一步探索两栖动物肠道中几丁质分解菌的筛选和应用,不仅有助于揭示其生物学机制,也为生物技术的应用提供了新的视角。

高原林蛙(*Rana kukunoris*)隶属于蛙科(Ranidae)林蛙属(*Rana*),是青藏高原广泛分布的两栖动物^[21],分布于海拔2 000–4 000 m的地区^[22],主要以蜉金龟科(Aphodiidae)小型昆虫为食^[21]。在消化过程中,高原林蛙需分泌几丁质酶消化昆虫的几丁质外壳。因此,几丁质分解菌可能是高原林蛙肠道中的关键微生物。本研究分离纯化高原林蛙肠道中的几丁质分解菌,筛选产酶能力较高的菌株进行全基因组测序,并鉴定几丁质酶基因,以期为进一步几丁质酶资源的开发提供理论依据,并为两栖动物肠道微生物资源的开发利用提供例证。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株分离自青海省西宁市大通县向化乡北川河源湿地(37.105°N, 101.463°E, 3 100 m)。采集高原林蛙6只,双毁髓处死后取高原林蛙肠道内容物,迅速放入液氮中,运送到青海民族大学实验室,置于-80℃冰箱中保存备用。动物实验通过青海民族大学科技伦理审查(批准号为:2024-015)。

1.2 溶液及培养基

5%胶体几丁质溶液:称取20 g几丁质粉末,加入250 mL的85%的磷酸,在一定时间内完全溶解后,将酸解后的液体倒入预冷的

2.5 L 蒸馏水中, 搅拌均匀, 4 °C 静置过夜; 8 000 r/min 离心 10 min, 将上清液倒出, 加入预冷的蒸馏水重悬, 再静置, 多次反复, 直到悬浊液 pH 为 6.5; 定容至 400 mL, 121 °C 灭菌后置于 4 °C 保存备用。

初筛培养基(g/L): 胶体几丁质 10.00, K_2HPO_4 0.70, KH_2PO_4 0.30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50, ZnSO_4 0.01, 琼脂 20.00, pH 自然。121 °C 灭菌 20 min。

复筛培养基(发酵培养基)(g/L): 胶体几丁质 10.00, K_2HPO_4 0.70, KH_2PO_4 0.30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50, ZnSO_4 0.01, pH 自然。121 °C 灭菌 20 min。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.00, NaCl 5.00, 酵母膏 5.00, pH 7.0–8.0。121 °C 灭菌 20 min。

1.3 菌株筛选

1.3.1 初筛

取 0.1 g 高原林蛙肠道内容物加入 25 mL 富集培养基中, 30 °C、160 r/min 培养 3 d, 富集后的样品梯度稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 浓度, 并涂布于初筛培养基上, 30 °C 倒置培养至培养基表面菌落生长。挑选能产生透明圈的菌落, 多次分离纯化, 直至能在培养基表面形成单菌落。

1.3.2 复筛

将初筛得到的菌株接种于发酵培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 3 d。随后采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)比色法测定粗酶液的酶活性, 选取酶活性高的菌株进行下一步鉴定。

1.4 酶活性测定

测定方法参照沈愿愿^[23]的方法进行。酶活力单位(U)定义为: 在温度为 37 °C 的条件下, 每分钟催化产生 1 μmol 还原糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。同时, 以 N-乙酰氨基葡萄糖制作

标准曲线。

1.5 菌种鉴定

将分离纯化出来的单菌落接种到已灭菌的 LB 培养基中, 30 °C 倒置培养 48 h, 观察菌落特征, 进行革兰氏染色, 利用光学显微镜观察菌株染色状况。采用扫描电子显微镜观察细胞形态。

采用 DNA 试剂盒提取菌株的全基因组 DNA 作为模板, 使用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 对待测菌株的 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μL): 2 $\times$ phanta Max Mix (p515) 12.5 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 模板 0.5 μL , ddH₂O 10 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 次循环; 72 °C 终延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将获得的序列通过 BLAST 与 GenBank 中的已知序列进行比对, 并利用 MEGA v.11.0 基于最大似然法构建菌株系统发育树, 以确定菌株的属种。

1.6 产酶条件优化

初始发酵培养条件: 初始 pH 7.0, 温度 30 °C, 转速 160 r/min, 装液量 100 mL (250 mL 三角瓶), 接种量 5%。单因素试验: 在初始培养条件下, 分别考察发酵时间(1、2、3、4 和 5 d)、发酵温度(26、28、30、32 和 34 °C)、接种量(2%、4%、6%、8% 和 10%)以及培养基的初始 pH (4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0) 对产几丁质酶活性的影响, 培养 72 h 后测定几丁质酶活性。

在单因素试验的基础上, 选取发酵时间、发酵温度、初始培养基 pH 作为主要的 3 个影响因素, 以这 3 个因子为自变量, 几丁质酶活

性(Y)为响应值, 采用 Design-Expert v.11.0 设计 3 因素 3 水平的 Box-Behnken (BB)响应面试验, BB 试验因素与水平见表 1。

1.7 几丁质粗酶液酶学性质探究

选用优化后的培养条件: 培养温度 32 °C, 培养基初始 pH 5.0, 培养时间 2 d, 产酶发酵培养基初始接种量 4%。

1.7.1 最适温度及稳定性

通过在不同温度(20–60 °C)下测定酶活性, 确定几丁质粗酶的最适温度。同时, 将粗酶液在不同温度下预先孵育 2 h 后测定酶活性, 以评估其稳定性。

1.7.2 最适 pH 及稳定性

通过在不同 pH 体系(pH 3.0–8.0)下测定酶活性, 确定几丁质粗酶的最适 pH。同时, 将粗酶液在不同 pH 体系(pH 3.0–8.0)中于 4 °C 放置 2 h 后测定酶活性以评估其 pH 稳定性。

1.8 反应进程曲线及动力学参数测定

在最适温度和最适 pH 条件下, 将 1 mL 几丁质粗酶液与 1 mL 1% 几丁质胶体混合, 分别在 10、20、30、40、50、60、90、120、150、180 min 的时间点反应 1 h 后, 按照 DNS 比色法测定反应体系中的还原糖含量, 并绘制反应进程曲线。

为测定几丁质粗酶的反应动力学参数, 记录酶在不同浓度几丁质胶体中的初始反应速度。根据上述实验所获得的最佳反应温度和最佳反应 pH, 将几丁质粗酶与不同浓度(0.25%、

0.5%、1%、2%、4%)的几丁质胶体分别反应 1 h, 采用 DNS 比色法测定几丁质粗酶酶活性和各体系中的还原糖含量。通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法进行动力学参数模型测定, 计算米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})值。

1.9 菌株全基因组测序及分析

将菌株接种在 LB 液体培养基中, 30 °C、160 r/min 培养 24 h 后, 置于冷冻离心机中 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液, 迅速将菌体置于液氮中保藏, 并通过干冰运输至上海凌恩生物科技有限公司进行测序。采用三代测序搭建框架和二代测序进行补洞纠错的方法完成菌株 JD-3 全基因组的测序, 使用 Flye 软件拼接, 获得完整的细菌基因组完成图。利用 QUAST 和 TABLET 软件^[24]对拼接结果进行评估。采用 Prodigal v.2.6.3 软件预测编码基因序列。

1.10 几丁质酶基因家族鉴定

使用 HMMER v.3.4.0 软件筛选出符合条件的几丁质酶蛋白。对筛选得到的几丁质酶家族蛋白序列构建最大似然进化树, bootstrap 值设定为 1 000, 其他参数保持默认, 以探讨其系统发育关系。利用基因组 Gff 注释文件, 通过比对获得几丁质酶家族蛋白的定位信息, 使用 TBtools 软件进行染色体定位图的绘制和共线性分析, 并通过 MEME 软件预测保守结构基序。

2 结果与分析

2.1 高原林蛙肠道产几丁质酶菌株的筛选

利用几丁质酶筛选培养基, 从高原林蛙肠道中分离得到 6 株几丁质分解菌(图 1A)。在 30 °C 培养 4 d (图 1B), 计算 D/d 值判断菌株产几丁质酶活性。结果发现, 6 株菌均能产几丁质酶, 其中菌株 JD-3 形成的透明圈最大, 表明菌

表1 Box-Behnken试验因素与水平

Table 1 Box-Behnken design factors and levels

Levels	Factors		
	$T/^\circ\text{C}$	t/d	pH
-1	30	1	4.0
0	32	2	5.0
1	34	3	6.0

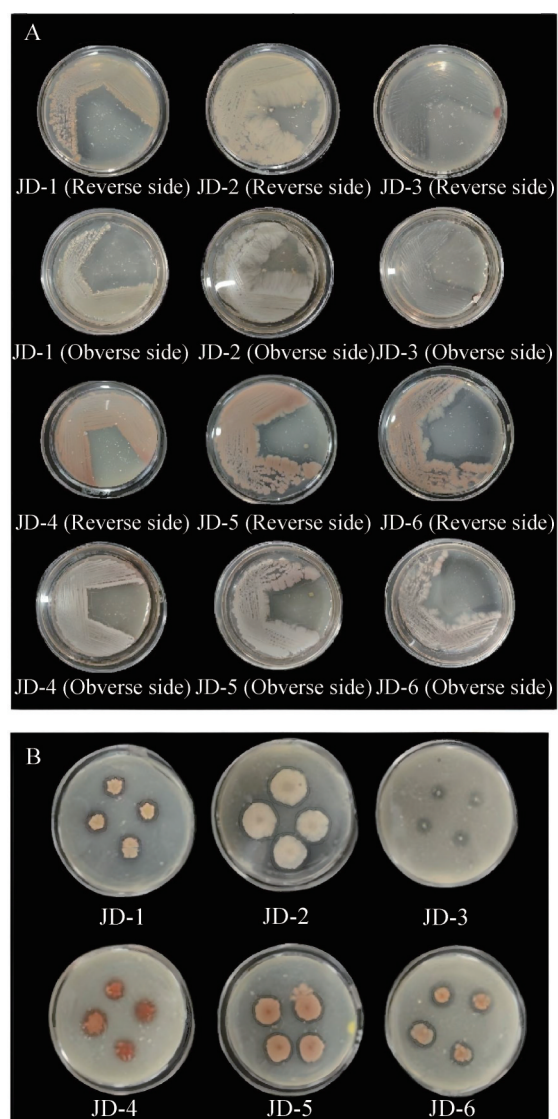


图1 产几丁质酶菌株的筛选

Figure 1 Screening of chitinase-producing strains. A: Preliminary screening results; B: Growth results of strain cultured in culture medium for 4 d.

株 JD-3 产几丁质酶的能力最强。通过摇瓶复筛测定菌株的几丁质酶活性，菌株 JD-3 的几丁质酶活性较强，初始酶活性达到 0.010 U/mL。对 JD-3 菌株进行单菌落分离。

2.2 JD-3 菌株的鉴定

将菌株 JD-3 接种至 LB 平板上，于 30 °C 恒温培养 3 d 后，观察到菌落形状为圆形，无色透

明，黏稠且易挑起，革兰氏染色为阳性，扫描电镜观察显示菌体呈短棒状(图 2)。

将菌株 JD-3 的 16S rRNA 测序结果上传至 NCBI 进行 BLAST 比对，发现其与麦芽香肉食杆菌(*Carnobacterium maltaromaticum*) TMW 2.1581 的比率为 100%。[核酸序列数据存储在微生物科学数据中心，链接为 <https://nmdc.cn/resource/genomics/sequence/detail/NMDCN0007N9M>，编号为 NMDCN0007N9M]。使用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树(图 3)，结果显示，菌株 JD-3 与麦芽香肉食杆菌(*Carnobacterium maltarom*)、乳酸肉食杆菌(*Lactobacillus carnis*)、栖鱼肉食杆菌(*Carnobacterium piscicola*)聚为一支，并与鸡肉杆菌(*Carnobacterium gallinarum*)形成姊妹群，再与广布肉毒杆菌(*Carnobacterium divergens*)聚类。综合菌株 JD-3 的形态学鉴定及 16S rRNA 基因序列分析，最终将其鉴定为麦芽香肉食杆菌(*Carnobacterium maltaromaticum*)。

2.3 菌株 JD-3 产酶条件的优化

随着发酵时间的延长，菌株 JD-3 产生的几丁质粗酶活性在第 2 天时达到最大值 0.020 U/mL，

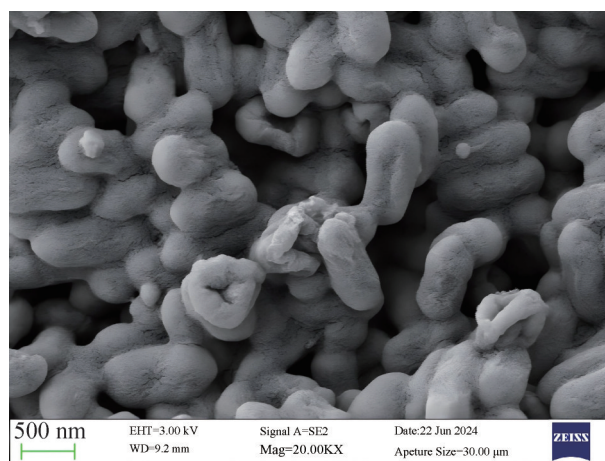


图2 菌株JD-3的扫描电镜图

Figure 2 Scanning electron microscopy (SEM) of strain JD-3.

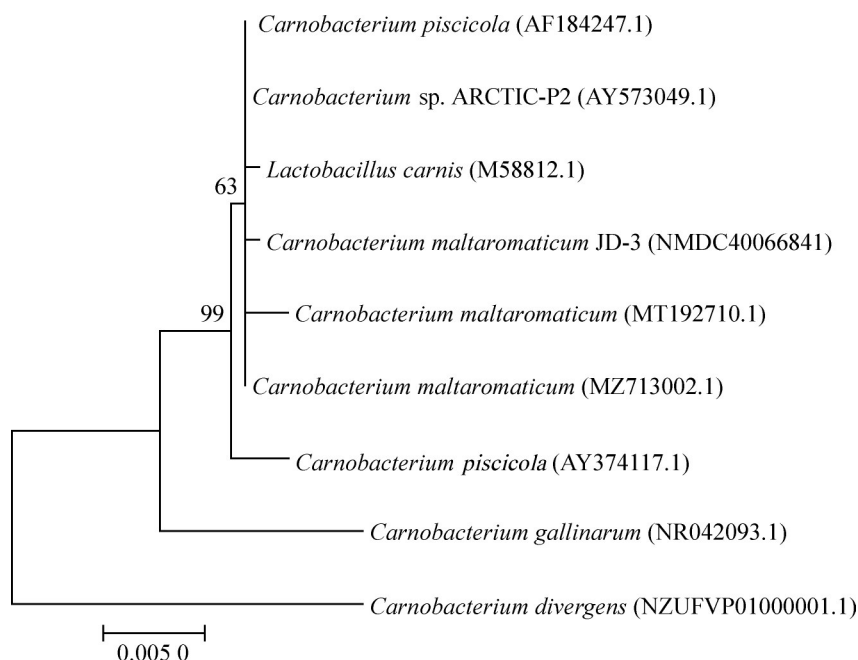


图3 菌株JD-3基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain JD-3 based on the 16S rRNA gene sequence. The evolutionary history was inferred using the maximum likelihood method based on the Kimura 2-parameter model. The bootstrap consensus tree inferred from 1 000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed.

随后逐渐下降(图 4A), 表明菌株 JD-3 的最适产酶发酵时间为 2 d。当培养基的初始 pH 为 6.0 时, 几丁质粗酶活性达到最大值后急剧下降(图 4B), 表明菌株 JD-3 在弱酸性环境中产几丁质酶的活性较高。在初始接种量为 4% 的条件下, 几丁质粗酶活性达到最大值 0.012 U/mL(图 4C), 表明菌株 JD-3 的最佳接种量为 4% 左右; 当发酵温度达到 32 °C 时, 几丁质粗酶活性达到最大值, 为 0.012 U/mL。随着发酵温度的继续升高, 几丁质粗酶的酶活性开始下降(图 4D), 说明 JD-3 的最适发酵温度为 32 °C。

在单因素试验的基础上, 确定发酵温度(A)、发酵时间(B)、培养基初始 pH(C)为主要影响因素, 以这 3 个影响因素为考察因素, 几丁质酶活性(Y)为响应值, 采用 Design-Expert v.11.0 设计 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 响应面试验, 对数据进行拟合分析, 得到的二次多项回归方

程为: $Y=0.0114+0.0004A+0.0010B+0.0004C-0.0003AC-0.0005BC-0.0006A^2-0.0013B^2-0.0031C^2$ 。所建立的模型极显著($P<0.01$), 失拟项模型不显著($P=0.8395$); 该模型的决定系数 $R^2=0.9777$, 调整决定系数 $R_{adj}^2=0.9490$, 说明该方程对试验拟合性较好。在一次项中, A 对结果影响极显著($P<0.01$); 在二次项中, A、B、C 均达到了显著水平($P<0.05$); 在交互项中 AB、AC、BC 均未达到显著水平。根据各因素的 F 值大小可以得出: 各因素对酶活性水平的影响由大到小依次是: $B>C>A$ (发酵时间>发酵温度=培养基初始 pH)。经软件优化, 菌株的最佳培养条件为: 发酵温度 31.4 °C, 培养基初始 pH 4.9, 发酵时间为 2.47 d(图 5)。

2.4 菌株 JD-3 粗酶液的酶学性质测定

菌株 JD-3 在最优培养条件下产生的几丁质粗酶活性随温度变化展现出不同的趋势。随着

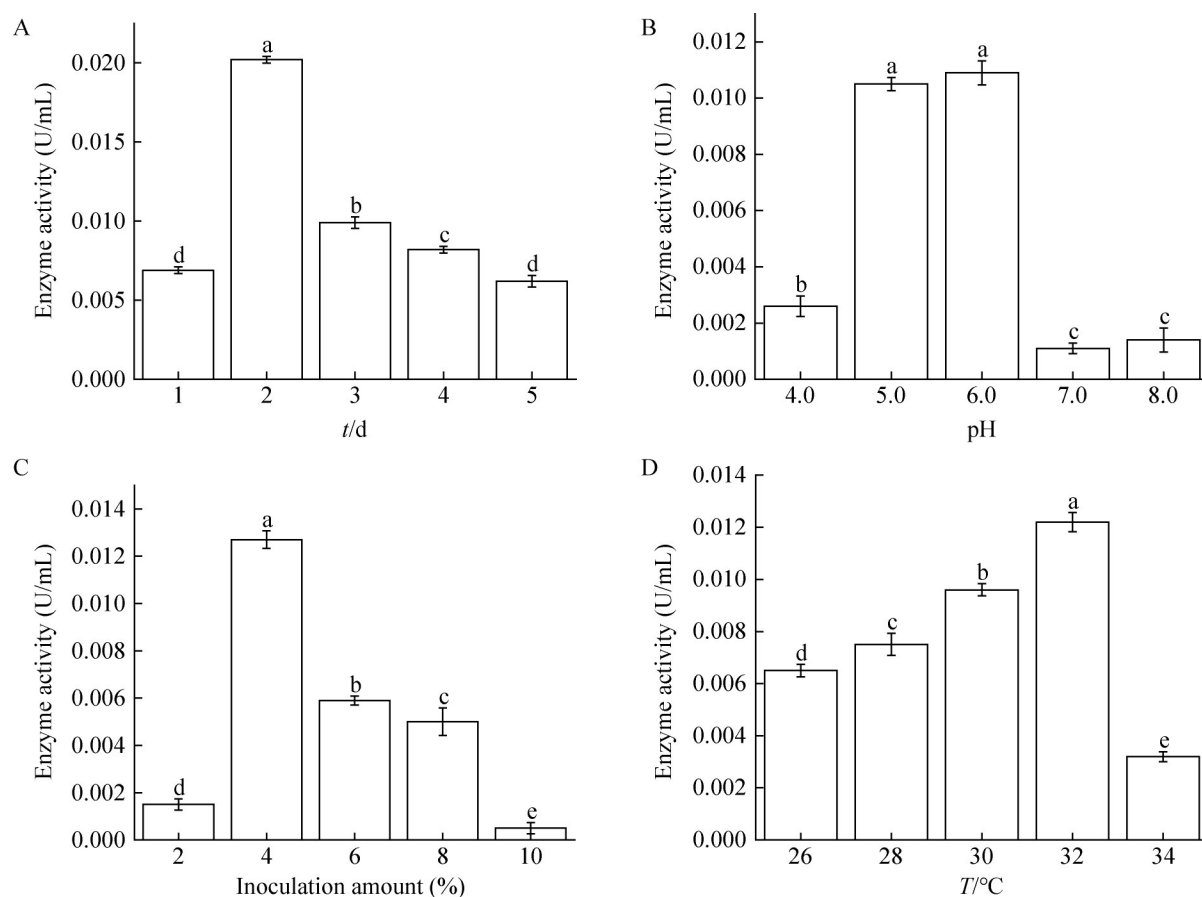


图4 单因素试验对几丁质粗酶酶活性的影响

Figure 4 Effect of single factor experiment on the activity of chitin crude enzyme. A: Fermentation time; B: Initial pH; C: Initial inoculum size; D: Fermentation temperature. The different lowercase letters in the picture indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$.

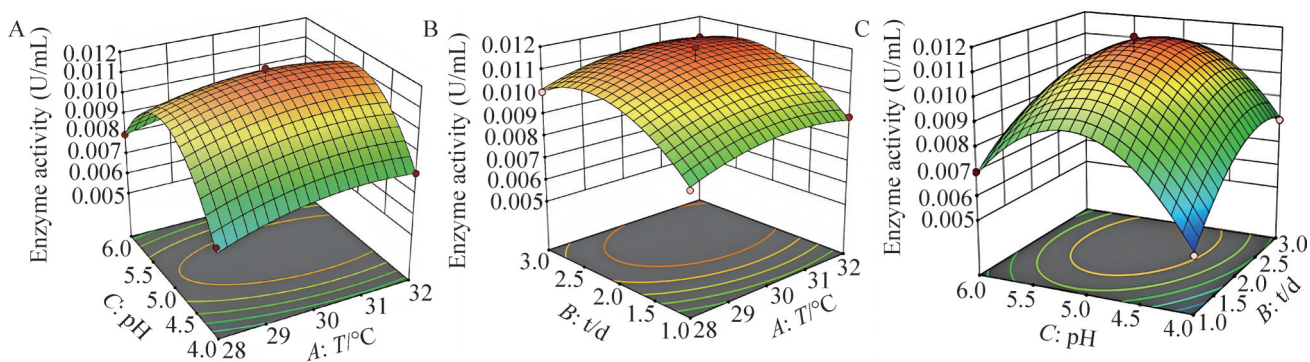


图5 双因素交互关系的响应曲面图

Figure 5 Response surface diagrams of the interactions between two factors. A: Temperature and pH; B: Temperature and time; C: Time and pH.

温度的升高, 酶活性逐渐下降, 在 20 °C 时为最大值 0.013 U/mL, 随温度继续升高而逐渐降低, 当温度超过 50 °C 时, 几丁质酶的活性显著下降, 表明其在较低温度下具有较高的活性。结合菌株的培养条件推测几丁质酶在 20 °C 内可能达到最大活性(图 6A)。在温度稳定性方面, 酶活性在 20 °C 时最高, 在 30 °C 时显著下降, 而在 60 °C 时活性降至 20 °C 时的 1/7 左右, 表明菌株 JD-3 所产的几丁质酶在 30 °C 以下具有较好的热稳定性, 60 °C 时酶活性基本丧失(图 6B)。此外, 菌株 JD-3 产生的几丁质酶在偏酸性范围内活性相对稳定, 最大值出现在 pH 3.0 (图 6C)。当菌株 JD-3 所产的几丁质酶在 pH 3.0–4.0 时, 几丁质酶活性基本稳定, 在偏碱性环境下, 酶

活性降低了近 50% (图 6D)。这表明该酶在强酸性环境中较为稳定, 而在弱酸性或碱性环境下稳定性明显降低。

2.5 反应进程曲线及动力学参数的测定

在最适反应条件下, 几丁质酶的反应进程曲线如图 7A 所示。在 0–240 min 内, 酶的反应速率保持相对稳定, 同时葡萄糖浓度持续上升; 240–360 min 内, 反应速率开始下降, 这可能是由于底物浓度降低, 反应接近饱和状态; 400 min 后, 反应趋于饱和, 葡萄糖浓度不再变化, 反应速率降至 0, 反应基本结束。通过底物浓度倒数与反应初始速度倒数绘制的 Lineweaver-Burk 曲线如图 7B 所示, 计算得出该酶促反应的

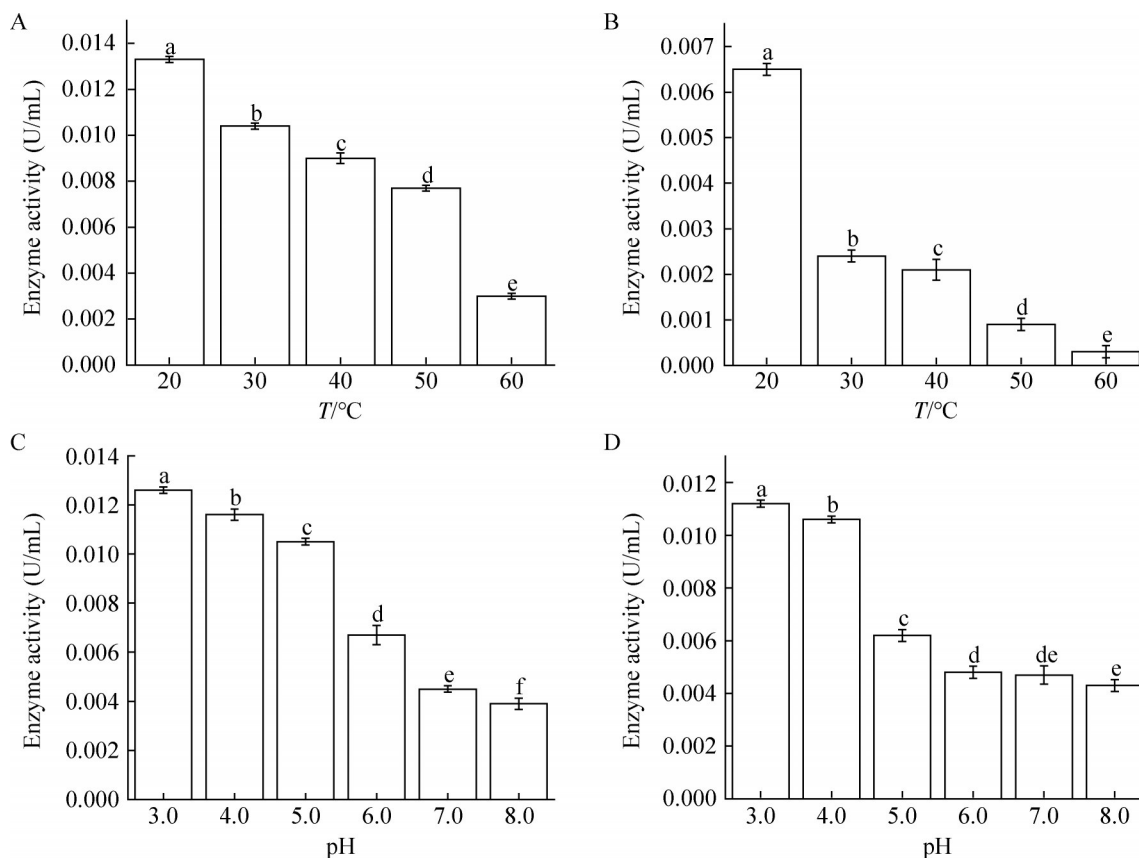


图6 酶学性质研究

Figure 6 Study on enzymatic properties. A: Temperature; B: Temperature stability; C: pH; D: Acid-base stability. The different lowercase letters in the picture indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$.

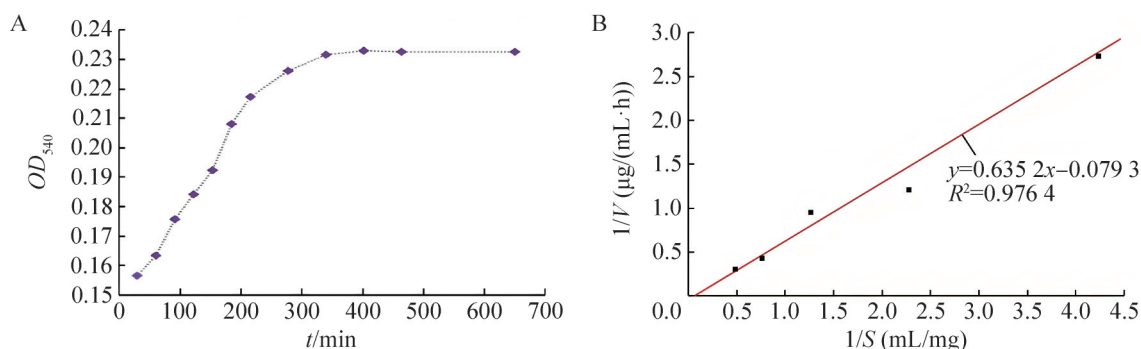


图7 反应进程曲线(A)及Lineweaver-Burk曲线(B)

Figure 7 Reaction proceeding curve (A) and Lineweaver-Burk curve (B).

$K_m=8.07$ mg/mL, $V_{max}=12.610$ μg/(mL·h), K_m 值较小, 表明该酶对几丁质胶体具有较强的亲和力。

2.6 全基因组分析

为获取高质量的细菌全基因组序列, 本研究采用三代 PacBio 测序结果构建框架, 并用二代 Illumina 测序数据进行补洞和纠错。共获得 370 Mb 的 Illumina 二代测序数据和 460 Mb 的 PacBio 三代测序数据(原始数据存储在国家微生物科学数据中心, 链接为 <https://nmdc.cn/resource/genomics/sra/detail/NMDC40066841>, 编号为 NMDC40066841)。C. maltaromaticum JD-3 菌株全基因组全长为 4 195 636 bp, 包含 6 个 contig (图 8A)。预测到 3 864 个蛋白质编码序列 (coding sequency, CDS), 总长度约为 3.5 Mb, 平均长度为 913.8 bp, 占基因组序列的 85%。预测到 63 个转运 RNA 基因, 呈现长链或经典三叶草结构。预测到 19 个核糖体 RNA, 包括 7 个 5S rRNA 基因、6 个 16S rRNA 基因、6 个 23S rRNA 基因。基于 rRNA 基因构建的系统发育树显示, 核糖体 RNA 在种内相对保守 (图 8B)。通过 TRF 软件对基因组进行重复序列预测, 共识别出 181 个重复序列(表 2), 其中 130 个位于 contig 1 上, 总长度为 16 kb, 占全基因组的 0.3%。

2.7 几丁质酶基因家族鉴定

在细菌全基因组中, 鉴定出 2 个属于 GH18 家族的几丁质酶家族基因, 命名为 *gh18* 和 *gh19*。这些基因分布在 contig 1 的特定区域 (图 9A)。将几丁质酶基因序列与 NCBI 数据库进行比对, 共发现 10 个保守基序(图 9B)。*gh18* 和 *gh19* 属于不同的类别, 其中 *gh18* 包含 10 个保守基序, 而 *gh19* 包含 7 个保守基序(图 9C)。系统发育分析表明, *gh18* 和 *gh19* 基因均与麦芽香肉食杆菌几丁质酶基因聚为一支。然而, 它们在结构基序上存在较大差异, 推测它们在几丁质分解的不同阶段发挥作用。

3 讨论

3.1 几丁质分解菌的分离鉴定及功能分析

几丁质分解菌的研究始于 20 世纪初, 最初主要集中在从土壤、废弃物和水体中筛选产酶微生物^[25]。目前已确认能够分解几丁质的微生物种类繁多, 广泛分布于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、肠杆菌属(*Enterobacter*), 以及链霉菌属(*Streptomyces*)、曲霉属(*Aspergillus*)、白僵菌属(*Beauveria*)、木霉属(*Trichoderma*) 等多个属

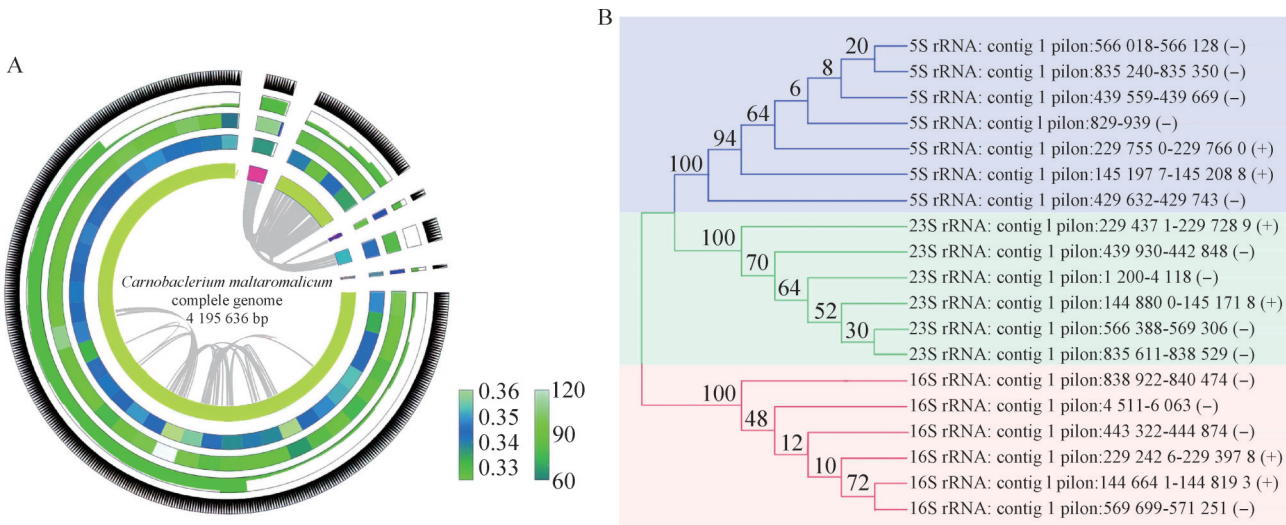


图8 菌株JD-3全基因结构注释

Figure 8 JD-3 gene structure annotation. A: Characterization and characteristics of the JD-3 genome (Orbital 1 represents the contig length, orbital 2 represents the gene density, orbital 3 represents the gene G+C content, orbital 4 represents the gene G+C offset, and orbital 5 represents the N base content in the gene); B: Phylogenetic tree based on predicted ribosomal RNA.

表2 基因组中的重复序列分布

Table 2 Distribution of repetitive sequences in the genome

Sequence index	Sequence description	Number of repetitive sequences
1	Contig 1 piloncontig 1 pilon	130
2	Contig 2 piloncontig 1 pilon	7
3	Contig 3 piloncontig 1 pilon	34
4	Contig 4 piloncontig 1 pilon	2
5	Contig 5 piloncontig 1 pilon	6
6	Contig 6 piloncontig 1 pilon	2

种^[26-30]。几丁质分解菌不仅在生态系统中发挥着分解几丁质的关键作用，还影响昆虫与哺乳动物消化^[31-32]。然而，针对食虫动物，特别是两栖动物肠道微生物中几丁质分解菌的研究较少^[33]。对饰纹姬蛙 16S rRNA 基因和宏基因组测序显示，丹毒丝菌科(*Erysipelotrichaceae*)、拟杆菌科(*Bacteroidaceae*)和瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)与几丁质分解有关^[20]，对中

华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*)皮肤和肠道微生物组成分析发现，其皮肤微生物中以柄杆菌科(*Caulobacteraceae*)和鞘氨醇单胞菌科(*Sphingomonadaceae*)为主，肠道内容物则以考克斯氏体科(*Coxiellaceae*)和支原体科(*Mycoplasmataceae*)为主，高海拔环境和动物个体特征可能会共同影响两栖动物微生物组成^[34]。本研究从青藏高原东部地区广泛分布的高原林蛙肠道内容物中获得麦芽香肉食杆菌，发现其能有效分解几丁质。肉食杆菌属作为一种广泛分布的微生物类群，通常生长在温度较低的环境中。Nicholson 等^[35]从西伯利亚地区冻土中分离出的 6 种优势菌均为肉食杆菌属；Kosiorek 等^[26]在南北极土壤及类似物质中分离出 10 株嗜冷肉食杆菌。杨福梅等^[36]从昆明轿子雪山自然保护区一只麂子肩部肌肉组织中分离得到 1 株麦芽香肉食杆菌，表明肉食杆菌能够适应低温环境。Leisner 等^[37]发现，在 115 株来自 29 种乳酸菌的菌株中，只有肉食杆菌属的广布肉杆菌

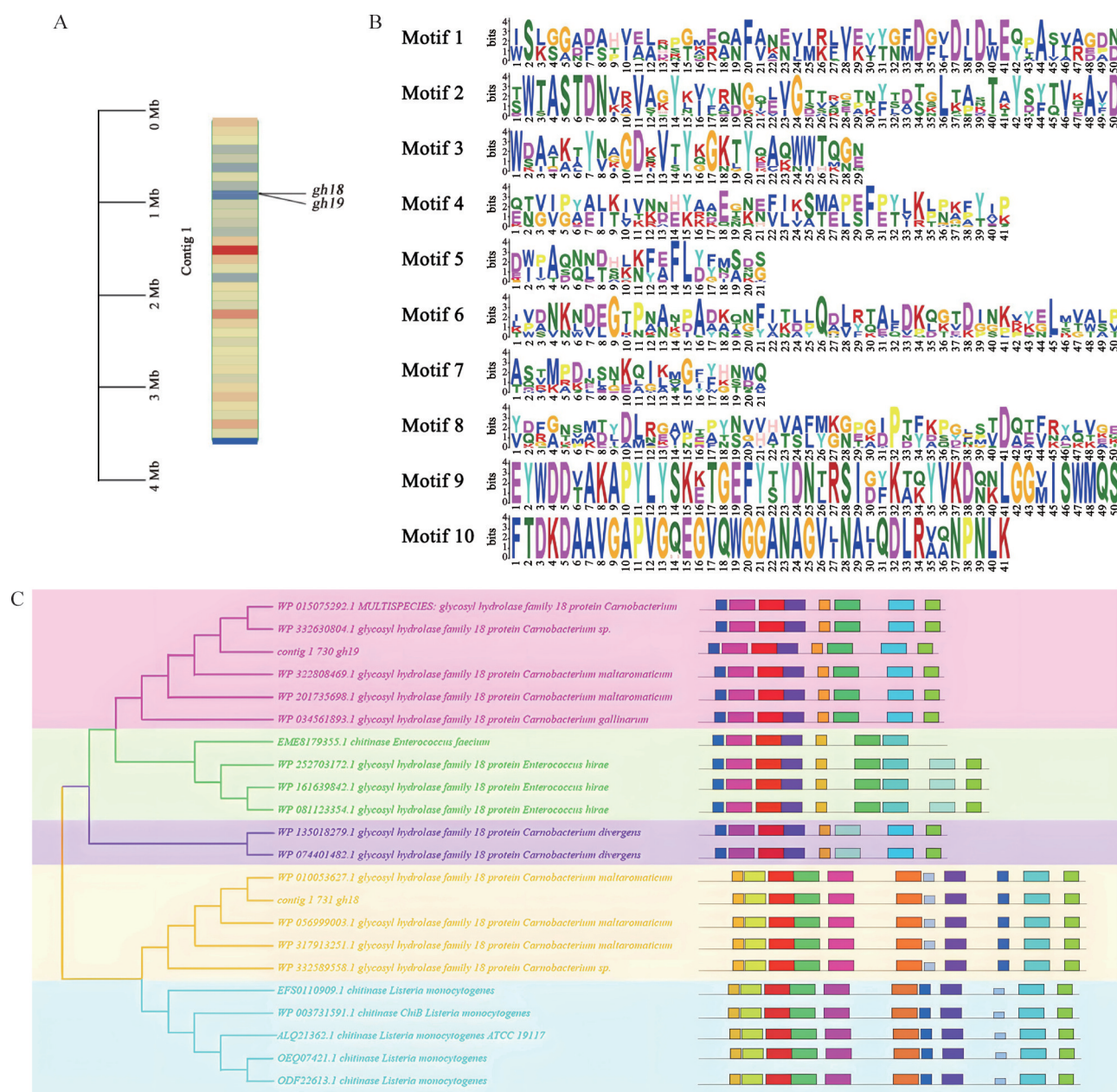


图9 几丁质酶基因家族鉴定

Figure 9 Chitinase gene family identification. A: Chromosome distribution of chitinase gene family; B: Ten motif sequences predicted by chitinase gene family; C: Phylogenetic map of conserved motifs of 3-20 chitinase gene family.

(*C. divergens*)和麦芽香肉杆菌(*C. maltaromaticum*)能够水解 α -几丁质,进一步证实了 *C. maltaromaticum* JD-3 菌株几丁质分解能力。Li 等^[38]发现麦芽香肉食杆菌通过促进肠道维生素 D 的产生,抑制

雌性小鼠结直肠癌的发生,表明该菌在肠道菌群中具有巨大的开发潜力。以上研究为动物消化系统来源的资源微生物开发提供了新的研究视角,拓宽了我们对麦芽香肉食杆菌功能多样

性的认知, 揭示了高原两栖动物在低温环境下消化分解几丁质的原因, 为几丁质分解菌的挖掘和应用开辟了新途径。

3.2 *C. maltaromaticum* JD-3 产酶条件及酶学性质分析

为评估 *C. maltaromaticum* 菌株 JD-3 对几丁质的分解能力, 本研究对其产酶条件进行了系统的优化。单因素试验结果显示, 发酵温度、时间和培养基初始 pH 对 *C. maltaromaticum* JD-3 几丁质酶活性的影响尤为显著。在最优条件下, *C. maltaromaticum* JD-3 所产的几丁质酶活性为 12 mU/mL, 不及盐单胞菌(*Halomonas*)等高产几丁质酶微生物^[26]。微生物种属的遗传差异导致的几丁质酶分子结构和催化机理的差异、培养基成分的复杂性、细胞生长过程中生物量的动态积累以及环境参数的交互影响, 都可能是导致酶活性差异的关键因素^[39]。然而, *C. maltaromaticum* JD-3 在 20 °C 和 pH 3.0 条件下展现出较强的几丁质分解能力, 表明该菌株在常温、酸性环境下具有独特的产酶优势。这种产酶模式可能与其栖息地的低温和消化系统酸性环境密切相关。Dwyer 等^[30]的研究证实, 酸性几丁质酶在低 pH 条件下对未经处理的底物具有出色的分解效果, 显示出了其在工业应用领域的巨大潜力。高原林蛙是变温动物, 生活在青藏高原高海拔水体环境中, 能够在较低温度下消化昆虫几丁质外壳。这种环境适应性赋予了 *C. maltaromaticum* JD-3 在工业应用中的潜力, 尤其在食品加工过程中几丁质废弃物的处理和资源回收利用方面^[40]。*C. maltaromaticum* JD-3 几丁质酶在室温酸性环境下的稳定性和活性, 为开发新型几丁质酶制剂提供了重要参考。未来, 我们将继续探索其不同环境条件下的应用潜力, 为几丁质生物分解和资源回收提供创新解决方案。

3.3 *C. maltaromaticum* JD-3 全基因组测序及分析

Dang 等^[41]从西南印度洋深海沉积物中分离出一株几丁质分解菌 C6131, 鉴定为海生微菌(*Marinimicrobium* sp.), 基因组测序发现, 该菌株基因组相对较小, 长度为 4 207 651 bp, G+C 含量为 58.50%, 含 3 471 个 CDS 序列; González-Gragera 等^[42]从大西洋鲑(*Salmo salar*)肠道中分离得到一株耐冷 *C. maltaromaticum* CM22, 其基因组大小为 4.08 Mb, G+C 含量为 33.59%, 含有 62 个 tRNA 基因、10 个 rRNA 基因和 3 797 个 CDS 序列。相比之下, *C. maltaromaticum* JD-3 菌株基因组全长为 4 195 636 bp, G+C 含量为 34.41%, 含有 63 个 tRNA 基因、19 个 rRNA 基因以及 3 864 个 CDS 序列, 这一差异暗示 *C. maltaromaticum* JD-3 菌株可能拥有相对复杂的基因组结构, 包含更丰富的基因家族和功能多样性。*C. maltaromaticum* JD-3 菌株 G+C 含量与 *C. maltaromaticum* CM22 接近, 但与 *Marinimicrobium* sp. C6131 存在较大差异。这种 G+C 含量的差异暗示菌株在进化过程中倾向于适应不同的环境压力, 体现了不同的生存策略。

几丁质酶基因家族根据氨基酸序列的相似性被划分为不同的家族, 其中 GH18 和 GH19 是最重要的几丁质酶家族。GH18 家族的成员通常表现出内切酶活性, 能够随机切割几丁质链, 而 GH19 家族成员通常具有外切酶活性, 从几丁质链的非还原端开始切割^[43]。GH18 家族通过底物结合、活性位点构象变化、催化位点结构调整以及产物移位促进几丁质的降解^[44], 在古细菌、原核生物和真核生物中广泛分布, 在组织分解与重塑、营养摄取、病原入侵及免疫反应调节等多个生理过程中发挥重要作用^[45]。本研究成功预测了 2 个 GH18 几丁质酶家族成员, 并

发现这 2 个基因均位于 contig 1 上, 通过对 *gh18* 和 *gh19* 基因序列分析, 分别筛选到 10 个和 7 个保守基序, 说明本次筛选得到的几丁质酶具有多样化功能, 或能分解不同类型几丁质。未来可进一步对 *C. maltaromaticum* JD-3 几丁质酶家族开展筛选鉴定, 并基于定向进化方法筛选出产酶能力更强的菌株。

综上所述, 菌株 JD-3 拥有更复杂的基因组结构, 可能具有更广泛的代谢能力和环境适应性。基因组的测定为 *C. maltaromaticum* JD-3 的深入研究提供了数据支持, 也为两栖动物肠道微生物在几丁质分解和资源回收等领域的应用提供了理论依据。

4 结论

从高原林蛙肠道内容物中分离出一株可分解几丁质的菌株 JD-3, 鉴定为麦芽香肉食杆菌 (*C. maltaromaticum*)。该菌在常温酸性环境中酶活性最高, 证实其在极端环境中的适应性。全基因组测序发现 *C. maltaromaticum* JD-3 基因组结构复杂, 含有 2 个 GH18 几丁质酶基因。研究结果丰富了对肉食杆菌属分解几丁质功能的认识, 为阐释其分解几丁质提供了数据支撑, 也为蛙源微生物资源在生物分解和资源回收领域的应用提供了理论基础。

作者贡献声明

王蕊: 论文撰写和修改, 数据处理和分析; 林星荣: 实验执行, 数据收集和处理分析; 王婉婷: 协助实验操作, 参与论文讨论; 沈迎芳: 实验构思和设计, 参与论文讨论和修改; 张涪泽: 实验构思和设计, 论文撰写和修改, 数据处理和分析。

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] KURITA K. Chemistry and application of chitin and chitosan[J]. Polymer Degradation and Stability, 1998, 59(1/2/3): 117-120.
- [2] BEIER S, BERTILSSON S. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 149.
- [3] HENRISSAT B, BAIROCH A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. Biochemical Journal, 1993, 293(Pt 3): 781-788.
- [4] 欧阳石文, 冯兰香, 赵开军. 几丁质酶的三级结构和催化机制[J]. 生命的化学, 2001, 21(2): 131-133. OUYANG SW, FENG LX, ZHAO KJ. Tertiary structure and catalytic mechanism of chitinases[J]. Chemistry of Life, 2001, 21(2): 131-133 (in Chinese).
- [5] CANTAREL BL, COUTINHO PM, RANCUREL C, BERNARD T, LOMBARD V, HENRISSAT B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(Database issue): D233-D238.
- [6] HENRISSAT B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. Biochemical Journal, 1991, 280(Pt 2): 309-316.
- [7] GONFA TG, NEGESEA AK, BULTO AO. Isolation, screening, and identification of chitinase-producing bacterial strains from riverbank soils at Ambo, Western Ethiopia[J]. Heliyon, 2023, 9(11): e21643.
- [8] HUTTENHOWER C, GEVERS D, KNIGHT R, ABUBUCKER S, BADGER JH, CHINWALLA AT, CREASY HH, EARL AM, FITZGERALD MG, FULTON RS, GIGLIO MG, HALLSWORTH-PEPIN K, LOBOS EA, MADUPU R, MAGRINI V, MARTIN JC, MITREVA M, MUZNY DM, SODERGREN EJ, VERSALOVIC J, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome[J]. Nature, 2012, 486: 207-214.
- [9] PENG BY, SUN Y, WU ZY, CHEN JB, SHEN Z, ZHOU XF, WU WM, ZHANG YL. Biodegradation of polystyrene and low-density polyethylene by *Zophobas atratus* larvae: fragmentation into microplastics, gut microbiota shift, and microbial functional enzymes[J]. Journal of Cleaner Production, 2022, 367: 132987.
- [10] GREINDA T, GREINDA A, DOMARADZKI P, KRAWCZYK P, KWIAŁTEK K. Probiotic potential of *Clostridium* spp. -advantages and doubts[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2022, 44(7): 3118-3130.
- [11] TEIXEIRA TFS, SOUZA NCS, CHIARELLO PG, FRANCESCHINI SCC, BRESSAN J, FERREIRA CLLF, DO CARMO G, PELUZIO M. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with

- metabolic syndrome risk factors[J]. *Clinical Nutrition*, 2012, 31(5): 735-740.
- [12] ZHONG Z, NONG WY, XIE YC, HUI JHL, CHU L. Long-term effect of plastic feeding on growth and transcriptomic response of mealworms (*Tenebrio molitor* L.)(J). *Chemosphere*, 2022, 287: 132063.
- [13] DAR MA, PAWAR KD, JADHAV JP, PANDIT RS. Isolation of cellulolytic bacteria from the gastro-intestinal tract of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and their evaluation for cellulose biodegradation[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 98: 73-80.
- [14] SARANYA M, KENNEDY JS, ANANDHAM R. Functional characterization of cultivable gut bacterial communities associated with rugose spiralling whitefly, *Aleurodicus rugioperculatus* Martin[J]. *3 Biotech*, 2022, 12(1): 14.
- [15] ZHU KY, MERZENDORFER H, ZHANG WQ, ZHANG JZ, MUTHUKRISHNAN S. Biosynthesis, turnover, and functions of chitin in insects[J]. *Annual Review of Entomology*, 2016, 61: 177-196.
- [16] MACDONALD C, BARDEN S, FOLEY S. Isolation and characterization of chitin-degrading micro-organisms from the faeces of Goeldi's monkey, *Callimico goeldii*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(1): 52-59.
- [17] ZHANG MJ, GAUGHAN S, CHANG Q, CHEN H, LU GQ, WANG XG, XU LL, ZHU LF, JIANG JP. Age-related changes in the gut microbiota of the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8(7): e00778.
- [18] LOMBARDO MP. Access to mutualistic endosymbiotic microbes: an underappreciated benefit of group living[J]. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2008, 62(4): 479-497.
- [19] DHOLE NP, PHUGE S, DAR MA, PANDIT RS. Screening of chitin degrading bacteria from the gut of Asian common toad *Duttaphrynus melanostictus*: implication for valorization of chitin rich seafood waste[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2022, 28: 102929.
- [20] XU LL, CHEN H, ZHANG MJ, ZHU W, CHANG Q, LU GQ, CHEN YH, JIANG JP, ZHU LF. Changes in the community structure of the symbiotic microbes of wild amphibians from the eastern edge of the Tibetan Plateau[J]. *MicrobiologyOpen*, 2020, 9(4): e1004.
- [21] 谢锋, 叶昌媛, 费梁, 江建平, 松井正文. 中国西北地区中国林蛙各居群的分类学研究(两栖纲: 蛙科)[J]. *动物分类学报*, 2000, 25(2): 228-235.
- XIE F, YE CY, FEI L, JIANG JP, MATSUI M. Taxonomical studies on the populations of *Rana chensinensis* in north-western China (Amphibia: Ranidae)[J]. *Zoological Systematics*, 2000, 25(2): 228-235 (in Chinese).
- [22] 马明. 基于多组学分析高原林蛙响应高海拔胁迫的分子机制[D]. 兰州: 兰州大学博士学位论文, 2022.
- MA M. Analysis of the molecular mechanism of *Rana kukunoris* response to high altitude stress based on multi-omics[D]. Lanzhou: Doctor's Thesis of Lanzhou University, 2022 (in Chinese).
- [23] 沈愿愿. 蝉花土壤几丁质酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶特性研究[D]. 天津: 天津商业大学硕士学位论文, 2021.
- SHEN YY. Screening, identification and enzymatic characteristics of chitinase-producing bacteria in *Cicada* soil[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Commerce, 2021 (in Chinese).
- [24] ISLAM T, RANJAN D, ZUBAIR M, YOUNG E, XIAO M, RIETHMAN H. Analysis of subtelomeric REXTAL assemblies using QUAST[J]. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 2021, 18(1): 365-372.
- [25] 周玉玲, 蒋思婧, 贺妮莎, 张桂敏. 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 YL, JIANG SJ, HE NS, ZHANG GM. Research progress of microbial chitinase and its application in the preparation of N-acetylglucosamine[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(8): 2192-2204 (in Chinese).
- [26] KOSIOREK K, GRZESIAK J, GAWOR J, SAŁAŃSKA A, ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK T. Polar-region soils as novel reservoir of lactic acid bacteria from the genus *Carnobacterium*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(17): 9444.
- [27] SULISTIOWATI R, SUDIN, MARSUCI HARMAN R. Chitinase activity potential and identification of chitinolytic bacteria isolated of swimmer crab's cell[J]. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2021, 14(3): 211-217.
- [28] AKTAS C, RUZGAR D, GURKOK S, GORMEZ A. Purification and characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* chitinase with antifungal and insecticidal properties[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2023, 53(7): 797-806.
- [29] WU J, LIU Y, ZHANG J, WANG X. Cloning, expression, purification and functional study of low-temperature chitinase PBCH15 gene from marine-derived photobacteria[J]. *Cryo Letters*, 2023, 44(5): 280-290.
- [30] DWYER K, BENTLEY IS, FITZPATRICK DA, SALEH AA, TIGHE E, MCGLEENAN E, GAFFNEY D, WALSH G. Recombinant production, characterization and industrial application testing of a novel acidic exo/endo-chitinase from *Rasamsonia emersonii*[J]. *Extremophiles*, 2023, 27(2): 10.
- [31] HONGKULSUP C, KHUTORYANSKIY VV, NIRANJAN K. Enzyme assisted extraction of chitin from shrimp shells (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2016, 91(5): 1250-1256.
- [32] ARAKANE Y, MUTHUKRISHNAN S. Insect chitinase and chitinase-like proteins[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(2): 201-216.
- [33] HU CL, MA ZY, ZHU JX, FAN Y, TUO BG, LI TL, LIU XM. Physiological and pathophysiological roles of acidic mammalian chitinase (*CHIA*) in multiple organs[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 138: 111465.
- [34] ZHANG MJ, CHEN H, LIU LS, XU LL, WANG XG, CHANG LM, CHANG Q, LU GQ, JIANG JP, ZHU LF. The changes in the frog gut microbiome and its putative oxygen-related phenotypes accompanying the development of gastrointestinal complexity and dietary shift[J]. *Frontiers*

- in *Microbiology*, 2020, 11: 162.
- [35] NICHOLSON WL, KRIVUSHIN K, GILICHINSKY D, SCHUERGER AC. Growth of *Carnobacterium* spp. from permafrost under low pressure, temperature, and anoxic atmosphere has implications for Earth microbes on Mars[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(2): 666-671.
- [36] 杨福梅, 杨林富, 曾成, 杨志, 王康, 段纲, 代飞燕. 1株鹿子源麦芽香肉杆菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(1): 398-407.
- YANG FM, YANG LF, ZENG C, YANG Z, WANG K, DUAN G, DAI FY. Isolation, identification and biological characterization analysis of a strain of *Carnobacterium maltaromaticum* from barking deer[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 50(1): 398-407 (in Chinese).
- [37] LEISNER JJ, VOGENSEN FK, KOLLMANN J, AIDEH B, VANDAMME P, VANCANNEYT M, INGMER H. Alpha-chitinase activity among lactic acid bacteria[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2008, 31(2): 151-156.
- [38] LI Q, CHAN H, LIU WX, LIU CG, ZHOU YF, HUANG D, WANG XL, LI XX, XIE C, LIU WY, WANG XS, NG SK, GOU HY, ZHAO LY, FONG W, JIANG LP, LIN YF, ZHAO GJ, BAI FH, LIU XD, et al. *Carnobacterium maltaromaticum* boosts intestinal vitamin D production to suppress colorectal cancer in female mice[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(8): 1450-1465.e8.
- [39] ABBASILIASI S, RAMANAN RN, IBRAHIM TAT, MOHAMAD R, DAUD HHM, ARIFF AB. Effect of medium composition and culture condition on the production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Lactobacillus Paracasei* LA07, a strain isolated from Budu[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2011, 25(4): 2652-2657.
- [40] WANG JR, ZHU MJ, WANG P, CHEN W. Biochemical properties of a cold-active chitinase from marine *Trichoderma gamsii* R1 and its application to preparation of chitin oligosaccharides[J]. *Marine Drugs*, 2023, 21(6): 332.
- [41] DANG YR, ZHANG XY, LIU SS, LI PY, REN XB, QIN QL. Genomic analysis of *Marinimicrobium* sp. C6131 reveals its genetic potential involved in chitin metabolism[J]. *Marine Genomics*, 2023, 67: 101007.
- [42] GONZÁLEZ-GRAGERA E, GARCÍA-LÓPEZ JD, TESO-PÉREZ C, JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ I, PERALTA-SÁNCHEZ JM, VALDIVIA E, MONTALBAN-LOPEZ M, MARTÍN-PLATERO AM, BAÑOS A, MARTÍNEZ-BUENO M. Genomic characterization of piscicolin CM22 produced by *Carnobacterium maltaromaticum* CM22 strain isolated from salmon (*Salmo salar*)[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2024. DOI: 10.1007/s12602-024-10316-1.
- [43] JAVED S, HAMID R, KHAN M, AHMAD M, AHMAD M, ABDIN M, MUSARRAT J. Chitinases: an update[J]. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2013, 5(1): 21.
- [44] RENAUD S, DUSSUTOUR A, DABOUSSI F, POMPON D. Characterization of chitinases from the GH18 gene family in the myxomycete *Physarum polycephalum*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2023, 1867(6): 130343.
- [45] CHEN W, JIANG X, YANG Q. Glycoside hydrolase family 18 chitinases: the known and the unknown[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 43: 107553.