

真菌壳聚糖酶研究进展

龚香艺^{1,2}, 吴 静^{1,2,*}, 邬敏辰²

(1.江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2.江南大学医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 壳聚糖酶是专一性降解壳聚糖的糖苷水解酶。在对比分析真菌壳聚糖酶和细菌壳聚糖酶的异同的基础上, 总结近年来真菌壳聚糖酶在分类、酶学性质、基于分子生物学和生化工程的高产策略的研究进展。通过整理文献发现, 来自真核微生物的壳聚糖酶降解产物为壳寡糖与氨基葡萄糖, 具有分子质量大、活性较低等特点, 针对酶活低这个迫切要解决的问题, 讨论了提高产酶的潜在策略。

关键词: 真菌壳聚糖酶; 酶学性质; 高产策略

Research Progress of Fungal Chitosanase

GONG Xiang-yi^{1,2}, WU Jing^{1,2,*}, WU Min-chen²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Chitosanase is a glycoside hydrolase for specific degradation of chitosan. In this article, the recent research progress in the classification and characterization of chitosanases, and the current strategies for improving chitosanase activity are summarized. To the best of our knowledge and after an extensive literature review, we present that the degradation products by chitosanase from fungi are chitoligosaccharide and glucosamine with a high molecular weight and a low specific activity. Potential strategies for improving chitosanase activity are also discussed in this paper.

Key words: fungal chitosanase; enzymatic characteristics; high yield strategy

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)17-0308-04

作为一种专一性降解壳聚糖的糖苷水解酶, 壳聚糖酶能催化水解含有一个氨基葡萄糖基团(GlcN)的糖苷键和水解部分乙酰化壳聚糖, 但不能降解完全乙酰化的几丁质^[1]。与壳聚糖比较, 通过壳聚糖酶水解而形成的壳寡糖具有良好水溶性、易吸收等优点, 并表现出独特的生理活性与功能, 广泛应用于食品、医药、农业和化妆品等工业领域中(表 1)。目前, 真核壳聚糖酶研究较细菌少, 国内主要是通过寻找新的高产菌株、人工诱变、条件优化、固态发酵及基因工程改造方法等方面着手研究。而国外则侧重研究细菌壳聚糖酶的初级结构和催化机理, *Bacillus circulans* MH-K1 和 *Streptomyces* sp. N174 的壳聚糖酶三级结构已被测定, 但真菌壳聚糖酶还没有三维结构方面的报道, 还有真菌壳聚糖酶的生理学作用, 相关信息将有助于通过改变外部条件, 提高真菌产酶量。以往综述较为宽泛地总结了微生物壳聚糖酶(细菌和真菌壳聚糖酶), 因此, 在对比研究真菌壳聚糖酶与细菌壳聚糖酶异同的基础上, 系统总结真菌壳聚糖酶的

分类、酶学性质、提高产量的分子和生化工程策略等研究情况, 旨在较为全面地了解近年来真菌壳聚糖酶研究涉及内容、遇到的困难以及未来的发展前景。

表 1 壳聚糖酶及壳寡糖的应用

Table 1 Applications of chitosanase and chitoligosaccharide

物质	应用
壳聚糖酶	科学研究: 研究壳聚糖的天然结构和在真菌中的生理学作用; 制备真菌原生质体
	环保: 有望通过壳聚糖酶将壳聚糖变成极具价值的壳寡糖
	工业: 水解壳聚糖为壳寡糖
壳寡糖	食品: 作为食品添加剂
	医药: 抗肿瘤、抗感染、提高机体免疫力
	化妆品: 保湿保水
	农业: 对植物病原菌有拮抗作用

1 真菌壳聚糖酶与细菌壳聚糖酶的比较

源于细菌和真菌的壳聚糖酶性质比较于表 2 中。发现两者具有共同特性: 1)壳聚糖酶活性随壳聚糖脱乙酰化

收稿日期: 2011-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101229)

作者简介: 龚香艺(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。E-mail: gong.xiangyi@163.com

* 通信作者: 吴静(1981—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为功能性成分微生物制造。E-mail: wujing@jiangnan.edu.cn

程度的提高而提高;2)在最适反应条件下,维持高酶活的时间不长,半衰期较短;3)当催化溶液中 $\text{pH} > 7$ 时,源于细菌或真菌的壳聚糖酶活性急剧下降,出现这一状况的原因可能在于在高 pH 值条件下壳聚糖酶发生变性所致;另一方面,在高 pH 值条件下底物壳聚糖溶解度降低,导致活性降低。除上述共同点外,真菌壳聚糖酶与细菌壳聚糖酶比较,具有:1)活性较低:真菌壳聚糖酶比细菌壳聚糖酶具有较大的 K_m 值;2)真菌壳聚糖酶的分子质量普遍大于细菌壳聚糖酶;3)催化产物不同:真菌壳聚糖酶的酶解产物是壳寡糖与氨基葡萄糖的混合物。

2 真菌壳聚糖酶的分类

能在胞外分泌壳聚糖酶的真核微生物主要包括:*Fusarium solani*^[2-3]、*Aspergillus* 属^[4-6]、*Penicillium* 属^[7-8]、*Beauveria bassiana*^[9-10]、*Mucor rouxii*^[11]、*Metarhizium anisopliae*^[12]、*Gongronella* sp. JG^[13]等。通过分析上述微生物所生产的壳聚糖酶的氨基酸序列,发现几乎所有生产的壳聚糖酶均属于糖苷水解酶 75 号家族。上述微生物所生产的壳聚糖酶主要分为:1)诱导酶和组成酶。其中诱导酶占大多数,如 A.sp. CJ22-326 菌株所产壳聚糖酶是一典型诱导酶,其合成与分泌都需壳聚糖诱导^[14]。然而,组成型真菌壳聚糖酶主要来源于植物病原真菌 *F. solani*,只要培养基中含有葡萄糖,即使没有壳聚糖的情况下,该菌也能分泌壳聚糖酶^[3]。2)内切酶和外切酶。真菌内切酶是指壳聚糖酶(E.C.3.2.1.132),属于 GH75 家族;真菌外切酶是指外切-1,4- β -D-氨基葡萄糖苷酶(E.C.3.2.1.165),属于 GH2 家族^[15]。内切酶水解壳聚糖为壳寡糖,外切酶的最终产物为氨基葡萄糖。对于大多数真菌壳聚糖酶而言,既包含内切酶又包括外切酶。

3 真菌壳聚糖酶的酶学性质

真菌壳聚糖酶的酶学性质总结于表 3。真菌壳聚糖酶一般仅水解壳聚糖及壳聚糖衍生物,如乙二醇壳聚糖、胶体壳聚糖。然而,源于 *F. solani* f. sp. *phaseoli* SUF386 的壳聚糖酶除可降解壳聚糖外,还能有效地降解壳五糖、乙二醇壳聚糖,此外,还能微量地降解乙二醇几丁质和羧甲基纤维素^[2]。

真菌壳聚糖酶的底物一般是 70%~100% 物质的量分数脱乙酰化的壳聚糖,其活性随壳聚糖的脱乙酰化程度的提高而增强^[16]。壳聚糖酶能催化的位点包括:1)断裂 GlcN-GlcN 及 GlcNAc-GlcN 键;2)断裂 GlcN-GlcN 键;3)断裂 GlcN-GlcN 及 GlcN-ClcNAc 键^[17]。综合发现各种壳聚糖酶都能有效地断裂 GlcN-GlcN 键。在壳聚糖中, GlcN-GlcN 键的数量随着脱乙酰化度的提高而逐渐增加,因此酶活力的高低取决于壳聚糖的脱乙酰化程度。然而,壳聚糖酶活性除与壳聚糖脱乙酰化程度有关外,还与壳聚糖酶本身的性质有关,因为来源于 *F. solani* f. sp. *phaseoli* 的壳聚糖酶仅在壳聚糖脱乙酰化度为 52%~70% 物质的量分数时才表现出高活性^[2]。

4 提高壳聚糖酶产量的发酵优化与控制策略

4.1 提高壳聚糖酶产量的生化工程策略

提高真菌壳聚糖酶产量的生化工程策略包括:1)最佳诱导物种类的选择及其质量浓度优化:因大多数来源于真菌的壳聚糖酶为诱导酶,因此通过优化诱导物的种类和质量浓度而提高壳聚糖酶的活性,如在 A.sp. CJ22-326 发酵生产壳聚糖酶的过程中,添加质量分数为 2% 壳聚糖可显著提高壳聚糖酶的活性;而采用氨基葡萄糖、乙酰氨基葡萄糖作为碳源时,并不利于酶活力的提高^[14]。

表 2 细菌与真菌壳聚糖酶的比较
Table 2 Comparison of chitosanases from bacteria and fungi

酶学特性	细菌	真菌
反应最适 pH	接近中性($\text{pH} 6 \sim 7$),部分 pH 值为 7.5 和 8	偏酸性条件($\text{pH} 4 \sim 6.5$)
pH 值稳定性	与温度有关,在最适 pH 值时,保持高活性时间较短;在中性或微碱性条件下快速失活	较细菌的稳定范围小,但 <i>Aspergillus fumigatus</i> (3.5~8.5)和 <i>Paecilomyces lilacinus</i> (3.8~9.9)的稳定范围较宽,但稳定时间不长
反应最适温度/℃	50~65	50~55
温度稳定性	与 pH 值有关,在较高温度时半衰期较短;稳定时间还与底物存在与否有关, Ca^{2+} 可增强温度稳定性	最适温度条件下酶的稳定时间较短, Ca^{2+} 显著增强稳定性
激活剂	Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+}	Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 是否激活与浓度相关
抑制剂	Ag^{+} 、 Hg^{+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+}	Ag^{+} 、 Hg^{+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+}
K_m /(mg/mL)	以壳聚糖为底物时, K_m 值较小	以壳聚糖为底物时, K_m 值较细菌大,且 K_m 值与壳聚糖的乙酰化度有关
pI	碱性蛋白质	酸性蛋白质,但 <i>Paecilomyces lilacinus</i> 为碱性蛋白质
分子质量	较小,20~40kD,甚至低于 10kD	大于 40kD
三级结构	研究的较多,有 <i>Streptomyces</i> sp.、 <i>Bacillus circulans</i> 和 <i>Bacillus</i> sp.	—
降解特点	以内切酶为主,但 <i>Microbacterium</i> 能产内切酶和外切酶	同时产内切酶和外切酶
酶解产物	壳寡糖	壳寡糖,夹杂氨基葡萄糖
酶活力	较高	较低

注:—表示没有相关报道。下同。

表3 真菌壳聚糖酶的性质
Table 3 Characteristics of fungal chitosanases from different sources

来源	产酶方式	降解方式	分子质量/kD	最适pH	最适温度/℃	金属离子	参考文献
<i>Fusarium solani</i>	组成	内切	36	4.5~6.5	40		[2]
<i>Penicillium islandicum</i>	诱导	内切	30	4.5~6.0	45	激活: Ca^{2+} ; 抑制: Cu^{2+}	[7]
<i>Beauveria bassiana</i>	诱导	内切	36	4.0	高于 40℃ 急剧失活	Mn^{2+} 有强烈抑制作用	[10]
<i>Mucor rouxii</i>	诱导	内切	酶 A 76 酶 B 58	5.0	酶 A 55 酶 B 50	激活: Ca^{2+} ; 抑制: Mn^{2+} 、 Cu^{2+}	[11]
<i>Metarhizium anisopliae</i>	诱导	内切	50.3	4.0	50	激活: Cu^{2+} ; 抑制: Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ag^{+}	[12]
<i>Gongronella</i> sp. JG	—	内外	内 28 外 90	内 5.6 外 4.6~4.8	内 55~60 外 50	(内)激活: Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Cu^{2+} (1mmol/L); 抑制: Cu^{2+} (10mmol/L); (外)激活: Mn^{2+} 、 Cu^{2+} ; 抑制 Cu^{2+} (10mmol/L)	[13]
<i>Aspergillus</i> sp. Y2K	—	内外	内 25 外 135	内 6.5 外 5.5	65~70	激活: Mn^{2+} 、 Cu^{2+} ; 抑制: Cd^{2+} 、 Hg^{2+}	[18]
<i>Aspergillus fumigatus</i> KB-1	—	内外	内 23.38 外 111.23	内 5.5 外 6.5	内 70 外 60	抑制: Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Mo^{6+}	[19]
<i>Aspergillus fumigatus</i> KH94	—	内外	内 25.5 外 108	外 4.5~5.5	内 70~80 外 50~60	—	[20]
<i>Aspergillus oryzae</i> IAM2660	诱导	内外	内 40 外 135	内外 5.5	内外 50	—	[21]
<i>Aspergillus</i> sp. CJ22-326	诱导	内外	内 29 外 109	内 6.0 外 4.0	内 60~65 外 50~55	激活: Mn^{2+} ; 抑制: Cu^{2+} 、 Ag^{+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{3+}	[22]
<i>Penicillium</i> sp. ZD-Z1	诱导	内外	内 43 外 115	内 5.0 外 5.5	内 65 外 60	—	[23]
<i>Penicillium</i> sp. D-1	诱导	—	酶 A 93 酶 B 21	内外 4.0	酶 A 52 酶 B 48	(酶 A)激活: Mn^{2+} ; (酶 B)激活: Ca^{2+} 酶 A 和 B 抑制: Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ag^{+}	[24]

表4 真菌壳聚糖酶分子生物学研究进展
Table 4 Research advances in molecular biology of chitosanases

菌株	表达载体	宿主菌	参考文献
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i> SUF386	pET-28a-c(+)(原核表达载体, 非融合型)	<i>E.coli</i> BL21(DE3)	[3]
<i>Fusarium solani</i> 0114	pET-15b(原核, 非融合型) pYMIKP(酵母整合质粒)	<i>E.coli</i> BL21(DE3) 酵母工程菌 N-27	[27]
<i>Aspergillus</i> sp. CJ22-326(内)	pET-28a-c(+)	<i>E.coli</i> BL21(DE3)	[29]
<i>Aspergillus oryzae</i> IAM2660	pGEX-4T-2(原核, 融合型)	<i>E.coli</i> BL21(DE3)	[5]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	pRSET A(原核, 非融合型)	<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	[6]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	pGEX-3X(原核, 融合型)	<i>E.coli</i> DH5 α	[30]

2)选择复合碳源:壳聚糖能显著提高壳聚糖酶的活性,但不利于细胞生长。为了能让真菌细胞生长良好的同时提高酶活,研究发现采用麸皮和壳聚糖作为复合碳源能有效提高壳聚糖酶的活性^[14]。3)选择最优氮源:研究发现,氮源显著影响壳聚糖酶的高效生产^[25]。如方祥年等^[9]利用蛋白胨、酵母浸膏和干酪素组成复合氮源,诱导球孢白僵菌高产壳聚糖酶。对于*A.sp. CJ22-326*,无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 比有机氮源如胰蛋白胨、酵母膏、牛肉膏或复合氮源更利于壳聚糖酶的生产^[14]。4)促进壳聚糖酶的分泌:陈小娥等^[14]在*A.sp. CJ22-326*的培养基中添加0.1%吐温-80提高细胞膜的通透性,使壳聚糖酶活性提高11%。5)固定化工艺:采用包埋和吸附法、双载体固定化等固定化细胞技术能显著提高壳聚糖酶的产酶水平^[26],但这方面的研究报道很少。

4.2 提高壳聚糖酶产量的基因工程策略

如表4所示,采用基因工程策略提高壳聚糖酶产量的研究主要集中于从不同真菌中克隆壳聚糖酶基因,选用原核或真核表达体系,获得高效表达的基因工程菌。相关研究主要集中于:1)原核表达系统:原核表达系统的研究主要集中于选择合适的表达载体/宿主菌组合和优化培养条件,使用最广泛的宿主菌为BL21(DE3),其优点在于缺失*lon*和*ompT*蛋白酶,不降解所分泌的蛋白质。2)真核表达系统:目前研究集中在酵母和丝状真菌。在酵母表达系统中,采用整合型质粒将壳聚糖酶基因与酵母染色体的同源部分同源重组,让基因更稳定的表达,同时,可将壳聚糖酶基因与表达载体以外的信号肽(如菊粉酶信号肽)融合,再与表达载体连接后转化酵母宿主,从而促进大分子蛋白的分泌表达^[27]。以丝状真菌为表达宿主方面,主要是利用根瘤农杆菌介导转化技术将受*gpdA*启动子和*trpC*终止子控制的*F.solani*0114

壳聚糖酶基因重新导回到 *F.solani*0114 基因组中, 实现其在腐皮镰孢菌中的过量表达^[28]。理论而言, 源于真核微生物的基因应在真核表达系统中具有更好的表达, 因为真核表达系统中可以进行转录和翻译后的糖基化等修饰。然而, 真菌壳聚糖酶在真核表达系统中的产量难以实现突破。

5 结 语

目前, 真菌壳聚糖酶较细菌研究较少, 其作用机制和结构少有报道, 原因在于真菌源壳聚糖酶的酶活较细菌要低很多, 改造多是采用基因工程方法构建高效表达工程菌, 但对真菌壳聚糖酶进行基因工程改造, 至今未获得酶活很高的工程菌株。提高真菌产酶的潜在策略总结如下: 1) 产酶水平: 目前研究真菌壳聚糖酶的发酵生产采用的是液态深层发酵, 产量较低。而丝状真菌相比细菌更适合固态发酵, 因此, 可以尝试采用固态发酵工艺实现壳聚糖酶的高效生产。另一方面, 鉴于真菌壳聚糖酶是诱导酶且其活性取决于壳聚糖的脱乙酰化程度, 因此可通过调整诱导物种类、诱导物质量浓度(主要是壳聚糖的质量浓度), 以及改变壳聚糖的脱乙酰度以提高壳聚糖酶酶活力水平。2) 基因工程菌改造: 到目前为止, 利用基因克隆实现壳聚糖酶成功表达的报道还较少, 多数成功表达的是在原核表达系统中实现的, 但重组酶在高表达时会以包涵体形式存在, 变性再复性的过程会使酶损失, 所以可以更多的研究利用根瘤农杆菌介导转化技术, 酵母表达系统和酵母细胞表面工程等方法^[31], 以实现壳聚糖酶的高表达。

参考文献:

- [1] 张虎, 杜昱光, 虞星炬. 几丁质酶和壳聚糖酶对部分乙酰化壳聚糖作用方式的比较[J]. 中国微生物学杂志, 1999, 11(5): 317-319.
- [2] SHIMOSAKA M, NOGAWA M, OHNO Y, et al. Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*: purification and some properties[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1993, 57(2): 231-235.
- [3] SHIMOSAKA M, KUMEHARA M, ZHANG Xiaoyong, et al. Cloning and characterization of a chitosanase gene from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani*[J]. J Ferment Bioeng, 1996, 82(5): 426-431.
- [4] 陈小娥, 夏文水, 余晓斌. 曲霉 CJ22_326 内切壳聚糖酶的分离纯化和性质[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(3): 10-14.
- [5] ZHANG Xiaoyong, DAI Anlan, KUROIWA K, et al. Cloning and characterization of a chitosanase gene from the koji mold *Aspergillus oryzae* strain IAM 2660[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(4): 977-981.
- [6] CHENG C Y, CHANG Chuhan, WU Yuejin, et al. Exploration of glycosyl hydrolase family 75, a chitosanase from *Aspergillus fumigatus* [J]. J Biol Chem, 2005, 281(6): 3137-3144.
- [7] FENTON D M, EVELEIGH D E. Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium islandicum*[J]. J Gen Microbiol, 1981, 126: 151-165.
- [8] RODRÍGUEZ-MARTÍN A, ACOSTA R, LIDDELL S, et al. Characterization of the novel antifungal chitosanase PgChP and the encoding gene from *Penicillium chrysogenum*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 88(2): 519-528.
- [9] 方祥年, 杜昱光, 黄秀梨, 等. 球孢白僵菌高壳聚糖酶突变株的筛选[J]. 微生物学通报, 2001, 28(3): 60-64.
- [10] 方祥年, 杜昱光, 黄秀梨, 等. 球孢白僵菌胞外壳聚糖酶的纯化和性质[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 77-83.
- [11] CARLOS A, MARTINEZ JM, FUENSANTA R. Purification and properties of two endochitosanases from *Mucor rouxii* implicated in its cell wall degradation[J]. FEMS Microbiol Lett, 1992, 95(2/3): 187-194.
- [12] 杨刚. 贵州绿僵菌壳聚糖酶的纯化鉴定及高产菌株的诱变选育[D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [13] WANG Jun, ZHOU Wei, YUAN Hang, et al. Characterization of a novel fungal chitosanase Csn2 from *Gongronella* sp. JG[J]. Carbohydrate Res, 2008, 343(15): 2583-2588.
- [14] 陈小娥, 夏文水, 余晓斌. 壳聚糖酶高产菌株选育及发酵条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(3): 66-69.
- [15] BRZEZINSKI R, NEUGEBAUER A. The chitosanase web page[EB/OL]. (2008-07-14) [2011-07-01]. <http://pages.usherbrooke.ca/rbrzezinski/>.
- [16] LIU Jing, XIA Wenshui. Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulase[J]. Biochem Eng J, 2006, 30(1): 82-87.
- [17] FUKAMIZO T, OHTAKARA T, IKEDA Y, et al. Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1205(2): 183-188.
- [18] CHENG C Y, LI Y K. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2000, 32: 197-203.
- [19] EOM T K, LEE K M. Characteristics of chitosanases from *Aspergillus fumigatus* KB-1[J]. Arch Pharm Res, 2003, 26(12): 1036-1041.
- [20] KIM S Y, SHON D H, LEE K H. Purification and characteristics of two types of chitosanases from *Aspergillus fumigatus* KH-94[J]. J Microbiol Biotechnol, 1998, 8: 568-574.
- [21] ZHANG Xiaoyong, DAI Anlan, ZHANG Xuekun, et al. Purification and characterization of chitosanase and exo- β -D-glucosaminidase from a koji mold, *Aspergillus oryzae* IAM2660[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(9): 1896-1902.
- [22] CHEN Xiaoe, XIA Wenshui, YU Xiaobin. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus* sp. CJ22-326[J]. Food Res Int, 2005, 38: 315-322.
- [23] 隋斯光, 方文建, 郑连英. 壳聚糖酶的分离提纯及其酶学性质研究[J]. 高校化学工程学报, 2007(21): 814-819.
- [24] 戴芸. 青霉 D-1 菌株壳聚糖酶的酶学性质及基因片段的克隆[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [25] 陈桂光, 邵利, 潘丽霞, 等. 响应面分析优化壳聚糖酶产生菌的发酵条件[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 380-383.
- [26] 周桂, 何子平, 褐金彩. 双载体法固定化黑曲霉发酵产壳聚糖酶的研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(5): 104-107.
- [27] 刘怀伟, 鲍晓明. 腐皮镰孢菌壳聚糖酶的酶学性质研究及其在酿酒酵母工业菌株中的表达[J]. 微生物学报, 2009, 49(12): 1607-1612.
- [28] LIU Huaiwei, BAO Xiaoming. Overexpression of the chitosanase gene in *Fusarium solani* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. Curr Microbiol, 2008, 58(3): 279-282.
- [29] LI Songlin, CHEN Liang, WANG Chen, et al. Expression, purification and characterization of endo-type chitosanase of *Aspergillus* sp. CJ22-326 from *Escherichia coli*[J]. Carbohydrate Res, 2008, 343(17): 3001-3004.
- [30] 梁冬春, 左爱军, 郭刚, 等. 烟曲霉壳聚糖酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 微生物学报, 2005, 45(4): 539-542.
- [31] FUKUDA T, ISOGAWA D, TAKAGI M, et al. Yeast cell-surface expression of chitosanase from *Paenibacillus fukuinensis*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(11): 2845-2847.