

一株海洋高产壳聚糖酶菌株 *Renibacterium* sp.QD1的筛选鉴定及产酶研究

邢培川, 刘 丹, 于文功, 路新枝*

(中国海洋大学医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 山东省糖科学与糖工程重点实验室,
山东青岛 266003)

摘要:目的: 获得高产壳聚糖酶菌株。方法: 利用唯一碳源法富集产壳聚糖酶菌株, 并利用平板水解圈和酶活力检测进行复筛。利用PCR克隆16S rDNA基因进行种属鉴定。利用SDS-PAGE凝胶原位复性鉴定野生菌株产壳聚糖酶的数量和大小。利用单一变量法进行发酵条件的初步优化。结果: 获得了一株高产壳聚糖酶菌株, 对该菌株的16S rDNA序列进行比对和分析发现该菌株属于*Renibacterium*属, 将该菌命名为*Renibacterium* sp. QD1。SDS-PAGE电泳和凝胶原位复性结果显示, 该菌株能产生一种胞外壳聚糖酶, 分子量大小在25ku左右。对其发酵条件进行初步优化, 用成分为壳聚糖(0.50%)、 KH_2PO_4 (0.10%)、 K_2HPO_4 (0.20%)、 MgSO_4 (0.07%)、 NaCl (0.10%)、 CaCl_2 (0.01%)、酵母粉(0.05%)、马铃薯浸粉(%)、蛋白胨(0.2%)的培养基发酵, 其粗酶活力可达400U/mL, 比文献报道的活力最高的*Microbacterium* sp. OU01高近4倍。结论: 获得了一株高产壳聚糖酶菌株, 该菌株的发现为壳寡糖的制备提供了新的工具。

关键词: 壳聚糖酶, 鲑鱼肾杆菌QD1, 凝胶原位复性

Screening, identification and research on enzyme production of the chitosanase producing marine bacteria *Renibacterium* sp. QD1

XING Pei-chuan, LIU Dan, YU Wen-gong, LU Xin-zhi*

(Key Laboratory of Marine Drugs, Chinese Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy,
Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Objective: This study was carried out to obtain high yield chitosanase producing strain. Methods: Chitosanase producing strains were enriched by sole carbon source, and rescreened by observing hydrolysis circle on chitosan plate and assaying culture supernatant enzyme activity. The 16S rDNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) for strain identification. SDS-PAGE gel *in situ* refolding was used for crude enzyme analysis. Single-factor method was adopted to optimizing the fermentation parameters to maximize chitosanase activity. Results: Strain QD1 with high chitosanase activity was isolated from marine environment. Based on the 16S rDNA sequence, QD1 was assessed to be *Renibacterium* sp., and was thus named *Renibacterium* sp. QD1. A chitosanase with the molecular weight of about 25ku was observed on refolded SDS-PAGE gel. After optimization, the yield of chitosanase activity reached up to 400U/mL, which was nearly four times of the previous reported chitosanase from *Microbacterium* sp. QD1. The fermentation medium including chitosan (0.50%), KH_2PO_4 (0.10%), K_2HPO_4 (0.20%), MgSO_4 (0.07%), NaCl (0.10%), CaCl_2 (0.01%), yeast extract (0.05%), potato starch (%) and peptone (0.2%). Conclusion: A strain with high chitosanase activity was isolated from marine environment which provided a new tool for chitooligosaccharides preparation.

Key words: chitosanase; *Renibacterium* sp. QD1; *in situ* refolding

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)18-0165-05

传统的壳寡糖制备方法以化学降解法^[1-3]为主, 以物理降解法^[4-5]、合成法^[6]为辅。化学方法虽然简便,

但是反应剧烈、条件不易控制、产物均一性差, 而且产生了大量的工业三废^[7]。酶法是一种新兴的生物降解方法, 相比于传统方法, 具有寡糖产率高、易于规模化制备, 而且节能减排, 属于绿色环保式现代生物生产技术。因此, 酶降解法取代传统的化学降解法已成为当今研究的热点。

壳聚糖酶(EC 3.2.1.99)是指专一性水解壳聚糖的一类酶。壳聚糖酶广泛分布于细菌、真菌、放线菌以及病毒^[8]中, 在很多植物组织中也发现了壳聚糖酶

收稿日期: 2013-03-15 * 通讯联系人

作者简介: 邢培川(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学。

基金项目: 国家自然科学基金(31070712、81102368); 国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA09070304); 海洋公益性行业科研专项(201105027、201005024); 国家重点基础研究发展规划(973)(2011CB200906)。

的存在^[9]。根据酶对底物识别的特异性,壳聚糖酶可以分为3个亚类:亚类Ⅰ作用于GlcN-GlcN、GlcNAc-GlcN;亚类Ⅱ只作用于GlcN-GlcN;亚类Ⅲ则作用于GlcN-GlcN、GlcN-GlcNAc(GlcN:氨基葡萄糖;GlcNAc:乙酰氨基葡萄糖)。根据酶对底物的切割方式不同,壳聚糖酶可分为内切型和外切型,内切型酶对底物的切割是随机的,在水解过程中表现为底物初始黏度下降快,后期趋于平稳,外切型酶从底物的一端逐个进行切割,在降解初期底物的黏度变化不明显。目前所发现的壳聚糖酶大多数属于内切型酶。

微生物来源的壳聚糖酶多数属于诱导型酶,在菌株发酵过程中壳聚糖底物的存在是酶产生的必要因素,因此在以壳聚糖为唯一碳源和氮源的平板上,产壳聚糖酶的菌株会形成透明水解圈,根据水解圈的大小可以初步判断菌株的产酶能力。但是在有其他碳源和壳聚糖降解产物存在时,酶的产生会受到抑制。

目前市面上已经商品化的壳聚糖酶非常少,而且存在活力低、生产成本高、价格昂贵等缺点,因此筛选具有工业化应用潜力的新酶十分必要。针对此种情况,本文利用壳聚糖选择性培养基从青岛海域筛选高产壳聚糖酶的菌株,对高产菌株进行了种属鉴定,并对其发酵条件进行了初步优化,以期对壳聚糖的规模化生产以及应用开发提供新的工具。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

分子生物试剂dNTP、La Taq DNA聚合酶和核酸电泳Marker TakaRa公司;3,5-二硝基水杨酸、琼脂糖、壳聚糖粉末、酵母浸出粉、蛋白胨 青岛生工生物科技有限公司;氨基葡萄糖盐酸盐 Sigma公司;初筛培养基 壳聚糖0.50%、KH₂PO₄ 0.10%、K₂HPO₄ 0.20%、MgSO₄ 0.07%、NaCl 0.10%、CaCl₂ 0.01%;平板复筛培养基 壳聚糖0.50%、KH₂PO₄ 0.10%、K₂HPO₄ 0.20%、MgSO₄ 0.07%、NaCl 0.10%、CaCl₂ 0.01%、酵母粉0.05%、琼脂粉1%~1.5%;发酵培养基 不含琼脂粉的复筛培养基;其他常规的试剂 国产分析纯。

基因组DNA提取试剂盒 BioTeKe公司;琼脂糖凝胶电泳仪EPS 601 瑞典Amersham pharmacia公司;高速冷冻离心机J2-MC 美国BECKMAN COULTER公司;台式往复振荡培养箱TB-12R-3F 日本高崎(TAKASAKI)科学仪器公司;PCR仪PCR system 9700 美国Applied Biosystems公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组的提取 按照试剂盒说明书操作提取基因组DNA。

1.2.2 壳聚糖溶液的配制 1%壳聚糖溶液的配方为:1g壳聚糖粉末(脱乙酰度大于90%)加入10mL 1mol/L的HCl,边搅拌边加入80mL水,于50℃水浴至全部溶解。用1mol/L NaOH调节至pH6.0,最后定容至100mL,并于121℃灭菌。

1.2.3 酶活力的测定方法

1.2.3.1 还原糖-DNS标准曲线的建立 标准曲线制作方法:精确称取100℃干燥至恒重的氨基葡萄糖盐

酸盐(分子量215.5)0.215g,加蒸馏水溶解并定容至100mL,配成10μmol/mL浓度的溶液。在各管中加入表1中溶液,加入DNS试剂1.5mL,于沸水浴中煮沸10min进行显色,取出后用流动水迅速冷却。之后加蒸馏水定容至25mL,于520nm下测光吸收值。以氨基葡萄糖盐酸盐含量(μmol)为横坐标,光吸收值为纵坐标绘制标准曲线。

表1 还原糖-DNS标准曲线的反应体系

Table 1 The reaction system of the standard curve of

DNS method			
管号	标准液(mL)	ddH ₂ O(mL)	氨基葡萄糖盐酸盐含量(μmol)
0	0.00	2.00	0
1	0.20	1.80	2
2	0.40	1.60	4
3	0.80	1.20	8
4	1.20	0.80	12
5	1.60	0.40	16
6	2.00	0.00	20

1.2.3.2 酶活力的测定 采用DNS法即3,5-二硝基水杨酸比色定糖法^[10]:每100μL适当稀释的酶液加入到900μL 0.5%壳聚糖底物中,加入1mL pH5.6的醋酸盐缓冲液并立刻混合均匀,55℃恒温水浴反应10min后立即加入1.5mL的DNS终止反应,煮沸10min,加水定容至25mL,12000r/min离心10min,上清液于520nm下测定光吸收值。酶活力单位定义为:在上述条件下每分钟催化产生1μmol的还原糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

1.2.4 产壳聚糖酶菌株筛选方法

1.2.4.1 菌种的筛选 将海水样品按适当比例(微生物含量较多的样品转接量为1%左右,如海泥等;微生物含量较少的样品转接量为10%左右,如海水等)接种于初筛培养基,于25℃培养3~7d。所获得菌悬液稀释后涂布于复筛培养基平板,25℃培养2~6d,挑取有较大透明圈产生的菌株进行平板划线纯化。

1.2.4.2 菌株活力的检测 挑取平板上的单菌落,接入10mL发酵培养基,于25℃,摇床振荡培养72h,发酵液经12000r/min离心10min,取上清液,进行酶活力测定。

1.2.4.3 降解产物分析 将发酵初酶液按1:9的比例与1%的壳聚糖混合并于37℃保温12h,得到的降解产物直接点样于TLC硅胶薄层层析铝板,用正丁醇:冰乙酸:水:氨水体积比2:1:1:0.3作为展开剂,用苯胺二苯胺做显色剂。

1.2.5 细菌16S rDNA序列的克隆与测定 使用通用引物,以基因组为模版进行PCR反应。引物为:27F:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';1492R:5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。PCR产物经胶回收后连接pMD-18T载体并进行序列测定,DNA序列测定由Invitrogen生命技术有限公司完成。

1.2.6 SDS-PAGE凝胶原性实验 发酵粗酶液经浓缩后进行SDS-PAGE电泳,电泳后的样品一部分

用考马斯亮蓝染色,另一部分进行原位复性,所采用的复性液配方:2mmol/L EDTA,50mmol/L Tris-HCl pH8.0,0.01% NaN₃,甲醇25%,10g/L干酪素。

将PAGE胶经蒸馏水冲洗后置于复性液中于常温下复性2h,期间更换一次复性液。经复性的凝胶置于含0.5%壳聚糖的琼脂平板上,以不含壳聚糖的琼脂平板为对照排除琼脂酶的干扰,37℃反应12h,取走复性胶,并用卢戈氏碘液对平板进行染色。酶蛋白被复性后能将平板中的壳聚糖降解因此不能被卢戈氏碘液染色,会在平板上出现透明圈^[11]。

1.2.7 QD1菌株发酵过程中产酶条件的研究

1.2.7.1 QD1菌株产酶曲线的测定 将QD1菌株按1%接种量转接到500mL锥形瓶中,于25℃振荡培养,定时(6、12、18、24、36、42、48、60、72、84h)取样并按上述方法进行酶活测定,绘制产酶曲线。做三组平行实验。

1.2.7.2 不同碳源对产酶的影响 以初筛培养基为基础分别添加不同浓度的乳糖(L)、葡萄糖(G)、蔗糖(S)、马铃薯浸粉(P)浓度分别为0.1%、0.5%、1%,检测不同碳源对产酶的影响。

1.2.7.3 不同氮源对产酶的影响 以初筛培养基为基础分别添加蛋白胨(Pd)、酵母粉(Y)、大豆粉(Sd)、硫酸铵(As)、玉米粉(Cd)作为氮源浓度分别为0.05%、0.1%、0.2%,检测不同氮源对产酶的影响。

2 结果与分析

2.1 还原糖-DNS标准曲线的建立

绘制标准曲线如图1,计算酶活力的标准曲线方程式为 $y=0.0849x+0.0023$, $R^2=0.999$,说明曲线回归性较好。

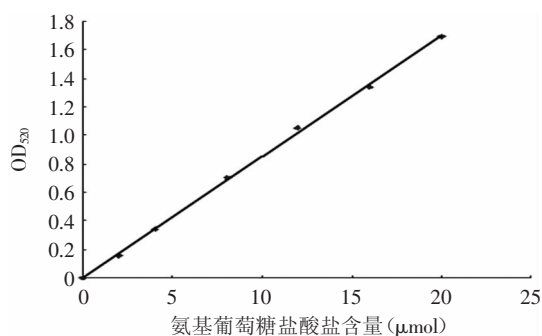


图1 DNS法测定氨基葡萄糖盐酸盐含量的标准曲线

Fig.1 The standard curve of DNS method for the determination of glucosamine hydrochloride content

2.2 菌株筛选结果

从海洋环境中一共筛选到21株菌,根据水解透明圈的大小挑选出水解圈最大的一株菌命名为QD1作为研究对象。QD1在固体培养基上于25℃生长12h,便可以产生明显的透明圈。菌落成白色有光泽,边缘整齐、表面光滑、中央突起(如图2所示)。显微镜下观察其形态呈短杆状或短链状,革兰氏染色呈阳性。

2.3 细菌16S rDNA序列的克隆与测定

2.3.1 菌株QD1 16S rDNA序列的克隆 提取了菌

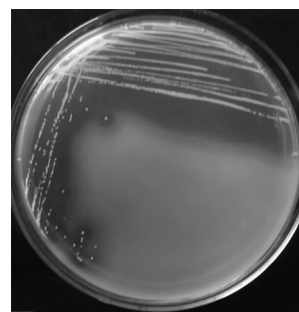


图2 菌株QD1降解壳聚糖平板产生水解圈

Fig.2 Strain QD1 formed clear hydrolysis circle on the chitosan solid medium

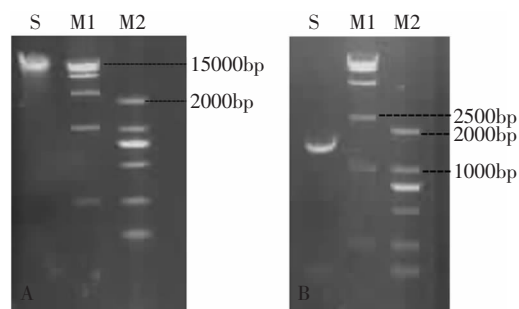


图3 菌株QD1基因组及16SrDNA电泳

Fig.3 The electrophoresis result of QD1 genome and 16SrDNA

注:A:QD1基因组DNA电泳图谱;B:16SrDNA;M1:DL15000 marker;M2:DL2000 marker;S:样品。

株QD1的基因组并利用PCR克隆了QD1的16SrDNA。如图3所示,A图S泳道为基因组提取结果,大小在15000bp以上;B图S泳道为PCR结果,大小为1500bp。

2.3.2 16S rDNA基因序列测序结果及系统进化树的构建 对测得的16S rDNA基因序列进行Blast分析并构建了进化树,结果显示QD1的16S rDNA基因序列与*Renibacterium salmoninarum*(鲑鱼肾杆菌)同源性达99%以上。因此菌株QD1命名为*Renibacterium* sp. QD1。其种属系统进化树如图4所示。

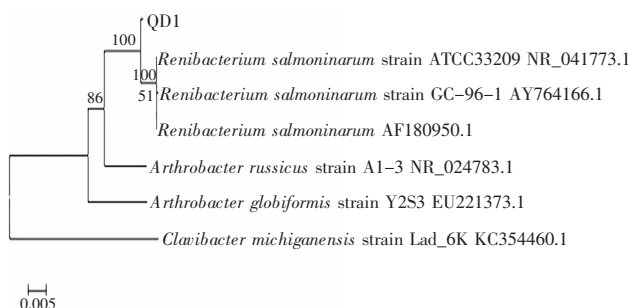


图4 *Renibacterium* sp. QD1的系统进化树图

Fig.4 The phylogenetic tree of *Renibacterium* sp. QD1

2.4 TLC分析粗酶液降解产物

菌株QD1发酵粗酶液降解壳聚糖具有快速高效的特点,根据反应初期黏度下降快,而到后期趋于平缓这一特点初步推断此酶为内切酶。由图5可看出其降解壳聚糖的终产物以壳三糖和壳四糖为主,还含有少量的壳二糖。

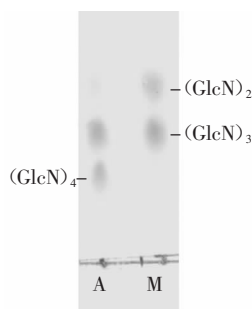


图5 TLC分析QD1降解壳聚糖终产物

Fig.5 Analysis of enzymatic hydrolysates by TLC
注: A: QD1降解产物; M: 壳二糖和壳三糖标准品。

2.5 SDS-PAGE凝胶原位复性

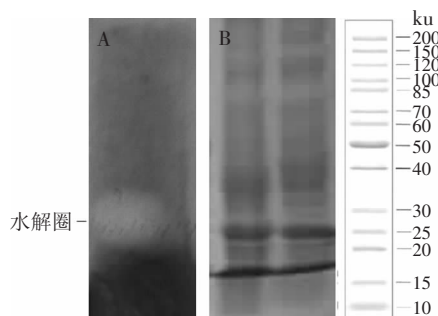


图6 QD1发酵液上清SDS-PAGE和凝胶原位复性分析

Fig.6 SDS-PAGE and in situ refolding analysis of culture supernatant of QD1

注: A: 凝胶原位复性分析; B: SDS-PAGE分析。

QD1菌株发酵液上清经过超滤浓缩后,进行SDS-PAGE分析和凝胶原位复性分析,结果表明QD1仅能产生大小为25ku左右的胞外壳聚糖酶,其在发酵上清总蛋白中所占的比例在20%左右(图6)。

2.6 QD1菌株发酵过程中产酶条件的研究

2.6.1 QD1菌株产酶时间曲线的测定 图7表明菌株生长10h左右,酶开始迅速积累,在42h时达到顶峰,在前42h内呈对数增长。酶活力达到顶峰时只持续很短的一段时间便迅速下降,因此酶的最佳收获时间为40~44h之间。

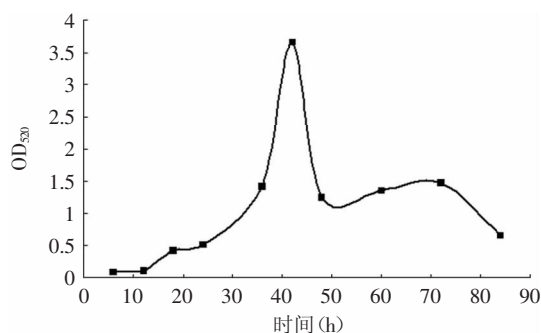


图7 QD1菌株产酶时间曲线

Fig.7 Enzyme production time course of QD1

2.6.2 发酵碳源和氮源对产酶的影响 在壳聚糖为必要诱导条件下,通过添加不同浓度的碳氮源,考查

其对QD1产酶的影响,结果表明0.5%、1%乳糖,0.1%葡萄糖,0.1%、1%马铃薯浸粉有显著性差异($p < 0.05$),其中1%的马铃薯浸粉对产酶促进效果最好(如图8)。氮源影响结果显示0.1%、0.2%蛋白胨,硫酸铵,玉米粉有极显著性差异($p < 0.01$),其中0.2%蛋白胨对促进产酶效果最佳(如图9)。

因此,选择1%马铃薯浸粉作为碳源,0.2%蛋白胨作为氮源进行下一步实验。

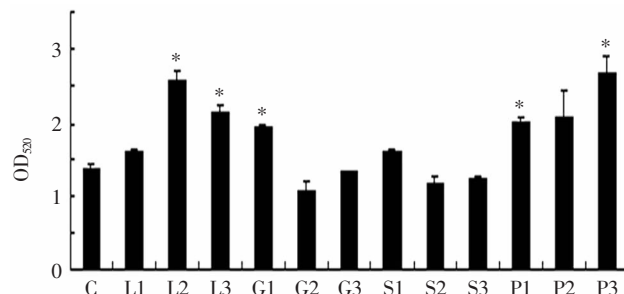


图8 不同碳源对QD1产酶的影响

Fig.8 Carbon sources effect on enzyme production

注: C: 对照组; L1~L3: 乳糖浓度分别为0.1%、0.5%、1%; G1~G3: 葡萄糖浓度分别为0.1%、0.5%、1%; S1~S3: 蔗糖浓度分别为0.1%、0.5%、1%; P1~P3: 马铃薯浸粉浓度分别为0.1%、0.5%、1%; *表示与对照组具有显著差异($p < 0.05$); **表示与对照组具有极显著差异($p < 0.01$); 图9同。

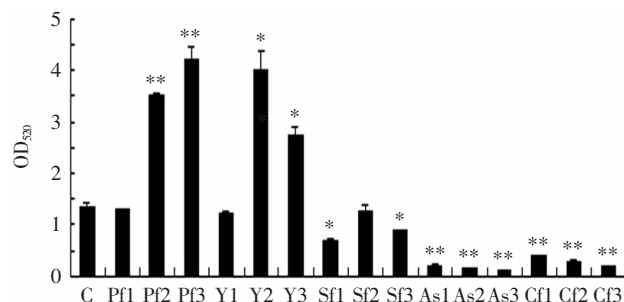


图9 不同氮源对QD1产酶的影响

Fig.9 Nitrogen sources effect on enzyme production

注: C: 对照组; Pf1~Pf3: 蛋白胨浓度分别为0.05%、0.1%、0.2%; Y1~Y3: 酵母粉浓度分别为0.05%、0.1%、0.2%; Sf1~Sf3: 大豆粉浓度分别为0.05%、0.1%、0.2%; As1~As3: 硫酸铵浓度分别为0.05%、0.1%、0.2%; Cf1~Cf3: 玉米粉浓度分别为0.05%、0.1%、0.2%。

2.6.3 验证实验 综合碳源和氮源的优化条件,在初筛培养基的基础上,增加1%的马铃薯浸粉和0.2%蛋白胨进行发酵培养,测定粗酶活力可达400U/mL,与未优化前(100U/mL)相比增加了3倍。

3 讨论与结论

研究通过初筛富集、复筛鉴定从海洋中筛选到一株高产壳聚糖酶菌株QD1,经过形态分析、革兰氏染色和16S rDNA序列测定,菌株QD1被鉴定为*Renibacterium*种属,革兰氏染色呈阳性。

通过SDS-PAGE和凝胶原位复性分析显示,QD1能分泌产生一种胞外壳聚糖酶,其分子量为25ku左右。凝胶原位复性法能够简单而快速地对野生菌株

(下转第173页)

胞内代谢物对代谢结果分类的贡献,找出发酵过程中可能的潜在的标记物。对分类的贡献较大的分别是:甘氨酸、乙酰磷酸、磷酸、5-氧代脯氨酸、3-磷酸甘油、6-磷酸葡萄糖、2-磷酸甘油、3-磷酸甘油酸、6-磷酸葡萄糖醇、苹果酸和琥珀酸,主要是糖酵解途径和三羧酸循环的中间代谢物,表明在此过程中糖酵解途径和三羧酸循环途径发生较大改变。

3 结论

不同的溶解剂和衍生剂以及衍生方法对待测的代谢产物的影响很大,本实验最终确定了最佳分析方法:以吡啶作为溶解剂、BSTFA+TMCS作为衍生剂的两步衍生化方法。在此条件下,共确定38种已知代谢物,并进行了方法学验证,具有良好精密度、稳定性和重复性。该分析方法成功用于拟干酪乳杆菌发酵过程研究,结果表明不同时间菌体代谢轮廓不同,在此过程中糖酵解途径和三羧酸循环途径发生较大改变。

参考文献

- [1] 杨登峰,关妮,潘丽霞,等. 微生物发酵L-乳酸的研究进展[J]. 中国酿造,2009(5):1-3.
- [2] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources[J]. Enzyme Microb Technol,2000,26(2-4):87-107.
- [3] Bundy JG, Willey TL, Castell RS, et al. Discrimination of pathogenic clinical isolates and laboratory strains of *Bacillus cereus* by NMR-based metabolomic profiling[J]. FEMS Microbiol

Lett,2005,242(1):127-136.

- [4] Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, et al. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations[J]. Nat Biotechnol,2001,19(1):45-50.
- [5] Villas-Boas SG, Moon CD, Noel S, et al. Phenotypic characterization of transposon-inserted mutants of *Clostridium proteoclasticum* B316T using extracellular metabolomics[J]. J Biotechnol,2008,134(1-2):55-63.
- [6] 邱绪建,耿伟,刘光明,等. 代谢组学方法在食品安全中的应用研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(21):369-373.
- [7] 陈利利,李云志,李丽,等. 代谢组学技术及其在食品鉴别中的应用[J]. 食品工业科技,2011,32(12):585-589.
- [8] 薛金红,李晖,韦萍,等. 微生物代谢组学及其在工业中的应用[J]. 生物技术通报,2012(2):20-27.
- [9] Korneli C, Bolten CJ, Godard T, et al. Debottlenecking recombinant protein production in *Bacillus megaterium* under large-scale conditions-targeted precursor feeding designed from metabolomics[J]. Biotechnol Bioeng,2012,109(6):1538-1550.
- [10] Koek MM, Mulwijk B, van der Werf MJ, et al. Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry[J]. Anal Chem,2006,78(4):1272-1281.
- [11] Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes[J]. Plant Mol Biol,2002,48(1-2):155-171.
- [12] Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics[J]. Mass Spectrom Rev,2007,26(1):51-78.

(上接第168页)

所产壳聚糖酶进行分析,为壳聚糖酶的筛选和鉴定提供了方法依据,也为以后酶的分离纯化提供了数据参考。用TLC法分析该酶降解产物表明:QD1降解壳聚糖的终产物以壳三糖和壳四糖为主。对菌株QD1产酶曲线分析显示,在发酵20h后,产酶量迅速提高,在42h左右达到最高峰,但是随后产酶量急剧下降,造成酶的收获时间非常短暂。

与大多数壳聚糖酶产生菌株一样,壳聚糖是诱导QD1产酶的必要条件,但是在发酵液中添加乳糖、马铃薯淀粉、酵母粉和蛋白胨,酶的产量可提高2~3倍,最终经过初步优化发酵液中的酶活可达到400U/mL,而此前文献报道的产酶最高的 *Microbacterium* sp. OU01经优化后也仅能达到118U/mL^[12]。

综上所述,菌株QD1能产生一种分子量较小的胞外酶,且其产酶时间较短,酶产量高,以上结果预示了菌株QD1具有极高的工业应用前景。

参考文献

- [1] 李继晰,马玉,吴剑平,等. 壳寡糖的制备研究[A]. 2002年全国生物资源与生物技术药物学术研讨会论文集[C]. 北京:中国药学会,2002,124-127.
- [2] 邵健,杨宇民. 低聚氨基葡萄糖的研制[J]. 中国医药工业杂志,1999,30(11):481-483.
- [3] 李邦良,高仕瑛,乔新惠,等. 甲壳低聚糖的制备和分析[J]. 中国生化药物杂志,1999,20(6):292-294.

[4] 刘松,邢容斌. 微波辐射对不同介质均相壳聚糖的降解研究[J]. 食品科学,2006,26(10):30-34.

- [5] Chen Rong Huei, Chang Jaan Rong, Shyr Ju Shii. Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and Polydispersity of treated chitosan[J]. Carbohydr Res,1997,299:287-294.
- [6] J Kubota N, Tatsumoyo N, Sano T, et al. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents[J]. Carbohydr Res,2000,324(4):268-274.
- [7] 张立彦,曾庆孝. 酶法在低聚壳聚糖制备上的研究现状及展望[N]. 湛江海洋大学学报,2000,20(4):72-77.
- [8] Yamada T, Hiramatsu S. Alternative expression of a chitosanase gene products two different proteins in cells infected with Chlorella virus CKV2[J]. Virology,1992,230:361-368.
- [9] Wolfgang F, Osswald. Purification and characterization of acidic hydrolases with chitinase and chitosanase from sweet orange callus tissue[J]. Plant Cell Physiol,1994,35(5):811-820.
- [10] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Anal Chem,1959,31:426-428.
- [11] 刘丹,邢培川,于文功,等. 利用Site-Finding PCR克隆琼胶酶基因[J]. 现代生物医学进展,2013,13(1):5-10.
- [12] SUN Y, HAN B, LIU W, et al. Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium* sp. OU01[J]. Bioresource Technology,2007,98(8):1548-1553.