

研究报告

湘江河岸土壤中高产甲壳素脱乙酰酶菌株的筛选及鉴定

王晓玲^{1,2} 万芳芳^{1,2} 刘高强^{1,2*}

(1. 中南林业科技大学 经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室 湖南 长沙 410004)

(2. 中南林业科技大学 南方林业生态应用技术国家工程实验室 湖南 长沙 410004)

摘要:【目的】甲壳素脱乙酰酶(CDA)是将天然甲壳素生物转化为可商品化利用的壳聚糖的关键酶。本文旨在从湘江河岸的土壤中筛选可高产 CDA 的新菌株。【方法】以甲壳素为唯一碳源,利用 4'-硝基乙酰苯胺为显色剂,通过变色圈法进行产 CDA 菌株初筛,产酶活性分析复筛;通过形态学和 ITS 区序列特征对菌株进行鉴定。【结果】从湘江(长沙段)河岸边的土壤中分离出的 117 株菌株中筛选到可产 CDA 的菌株 30 株,其中 4 株具有较强产 CDA 的能力。进一步经发酵产酶分析验证,菌株 A1 具有较强的产 CDA 能力,其胞外 CDA 酶活高达 13.21 U/mL。结合形态学和 ITS 区序列特征,菌株 A1 初步鉴定为层生镰孢菌。【结论】从湘江河岸边的土壤中筛选到可高产 CDA 的菌株 A1,具有较好的开发应用前景。

关键词: 菌株筛选, 甲壳素脱乙酰酶, 变色圈法, 层生镰孢菌

Isolation of chitin deacetylase-producing microorganisms from riverside soils of Xiangjiang of China

WANG Xiao-Ling^{1,2} WAN Fang-Fang^{1,2} LIU Gao-Qiang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees, Central South University of Forestry and Technology, Ministry of Education, Changsha, Hunan 410004, China)

(2. National Engineering Laboratory for Applied Forestry and Ecological Technology in Southern China, Central South University of Forestry & Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: [Objective] Chitin deacetylase is a key enzyme in the conversion of natural chitin into chitosan, which can be commercially used. The aim of this work is to screen a new strain with high capacity for producing chitin deacetylase. [Methods] Chitin deacetylase producing strains from soils of Xiangjiang riverside in Changsha area were preliminarily screened with chitin as only source of carbon by color reaction of 4'-nitroacetanilide, and further screened by enzyme activity analysis; Identification of strains was analyzed by morphological and internal transcribed spacer (ITS)

Foundation item: Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department of China (No. 12K069); New Century Excellent Talents in University (No. NCET-13-1046); Discipline Leaders in Universities Training Fund of Hunan Province (No. 2014-04)

***Corresponding author:** Tel: 86-731-85658690; Fax: 86-731-85623498; E-mail: gaoliuedu@163.com

Received: October 18, 2015; **Accepted:** February 24, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 07, 2016

基金项目: 湖南省高校创新平台开放基金项目(No. 12K069); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”基金项目(No. NCET-13-1046); 湖南省高校学科带头人培养对象基金项目(No. 2014-04)

***通讯作者:** Tel: 86-731-85658690; Fax: 86-731-85623498; E-mail: gaoliuedu@163.com

收稿日期: 2015-10-18; **接受日期:** 2016-02-24; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-03-07

sequence. **[Results]** We isolated 117 strains from soils of Xiangjiang riverside, thirty strains had the potential producing chitin deacetylase ability, and among which, four potential strains had the most high capacities, and validation of enzyme activity analysis suggested that strain A1 had the highest capacity for producing chitin deacetylase, the extracellular enzyme activity reached 13.21 U/mL. On the basis of morphological and ITS sequence identification, strain A1 was preliminarily identified as *Fusarium proliferatum*. **[Conclusion]** We obtained a *F. proliferatum* strain isolated from soils of Xiangjiang riverside with high capacity for producing chitin deacetylase.

Keywords: Strain screening, Chitin deacetylase, Color-changing circle method, *Fusarium proliferatum*

甲壳素(Chitin)是一种线性多糖类生物高分子,在自然界中广泛存在于低等生物菌类和藻类的细胞,节肢动物虾、蟹、昆虫的外壳,软体动物(如鱿鱼、乌贼)的内壳和软骨,高等植物的细胞壁等^[1-5]。天然的甲壳素溶解性能很差,因而其应用受到一定限制。壳聚糖(Chitosan)是甲壳素分子中的乙酰基被部分或全部脱除后的产物,其溶解性能得到很大改善,且由于其是自然界唯一的碱性多糖,在医药、食品、化工、生物、农业、纺织、印染、造纸、环保等众多领域中得到广泛应用^[1,3,6]。如在医学领域可用作手术缝合线、药物缓释剂,在食品领域可用作抗癌功能食品、保鲜剂等^[1,3]。目前我国市场需求约400多万t(4×10^9 kg),但市场供应仅约200多万t(2×10^9 kg),严重供不应求^[3]。

甲壳素脱乙酰酶(Chitin deacetylase, E1C131511114,简称CDA)是一种催化甲壳素中N-乙酰基-D-葡萄糖胺的乙酰胺基水解的酶,即可通过生物转化的方法将甲壳素中乙酰基脱除进而转化为壳聚糖。与传统的化学法相比,通过甲壳素脱乙酰酶生物转化生产壳聚糖耗能低,不需要强碱处理,是一种温和而环保的壳聚糖新型生产方法^[7-8]。但生产的关键是要获得高活性的CDA。

目前国内外已有CDA研究的相关报道,其产生菌主要来源于真菌^[2,7-9],但仍存在菌株退化、性能不稳定、所产酶活力低等问题。因此,从自然环境中筛选性能优良的产酶新菌种(菌株)仍是解决CDA工业化应用的重要课题之一。产CDA菌株在自然界中多分布于生长甲壳类动物的水域中或水域附近的土壤中。湘江是湖南的主要水系,本研究

从湖南湘江河岸长沙段的近岸土壤中分离出117株菌株,筛选到可产甲壳素脱乙酰酶的菌株30株,其中4株具有较强产甲壳素脱乙酰酶的能力,尤以A1菌株的产酶能力较强。进一步对A1菌株进行了产酶活性检测和菌种鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

甲壳素购自上海伟康生物制品有限公司;水溶性甲壳素购自山东奥康生物科技有限公司;4'-硝基乙酰苯胺(PN)购自国药集团化学试剂有限公司;马铃薯购自步步高超市;玉米粉、麸皮购自长沙市红星农贸市场。培养基组份、乳酸石碳酸棉蓝染液、氯仿:异戊醇(24:1)混合液、1 mol/L Tris-HCl 储备液、0.5 mol/L EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)储备液、2% CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)工作液、1% EB (Ethidium bromide, 溴化乙锭)储备液、10×TE 储备液、1%的琼脂糖凝胶电泳液等相关试剂和药品均为国产分析纯。

1.2 土样采集

在湖南湘江河岸长沙段的近岸土壤中采集土样。采样时间:2009年5月。采样地点:湖南湘江河岸长沙段的近岸土壤。GPS定位:28°13'28"N, 112°59'80"E。温度26-27℃,湿度75%-80% RH。土壤pH 6.5-6.6,土壤有机质含量3.07-3.36,土壤总氮含量1.58-1.73 g/kg。

1.3 培养基

菌株保藏斜面培养基(PDA, g/L):马铃薯(去皮)200,琼脂20,蔗糖20, pH自然。

菌株液体培养种子培养基(g/L): 葡萄糖 30, 蛋白胨 4, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75。

菌株产酶初筛培养基(g/L): 甲壳素 10, 酪蛋白 5, 琼脂 20, NaNO_3 2, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, PN 0.25。

菌株产酶复筛培养基(g/L): 甲壳素 15, 酪蛋白 5, NaNO_3 2, K_2HPO_4 1, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5。

1.4 CDA 粗酶液提取和酶活分析

1.4.1 粗酶液提取: 将培养好的培养液在低温条件下抽滤, 所得滤液即为胞外 CDA 粗酶液; 菌丝体用冷双蒸水洗涤数次后进行冷冻干燥, 干燥后的菌丝体在 $0-5\text{ }^\circ\text{C}$ 低温保存备用。称取一定量的菌丝体, 加入冷 Tris-HCl 缓冲液后, 用匀浆机匀浆数分钟, 浆液立即进行离心, 所得上清液即为胞内 CDA 粗酶液。

1.4.2 CDA 酶活力测定方法: 以 4'-硝基乙酰苯胺作为酶活力测定的底物, 通过分光光度法测定^[9-10]。取一支试管加 1 mL 200 mg/L 的 4'-硝基乙酰苯胺水溶液、1 mL 适当浓度的酶液以及 3 mL 在 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 预保温的浓度为 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液, 使反应液终体积为 5.0 mL, 于 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴反应 15 min, 沸水浴终止酶促反应, 加水定容至 10 mL, 混匀, 3 000 r/min 离心 10 min, 测定上清液的吸光值(A_{400})。空白对照体系中添加的为 1 mL 同样浓度的灭活酶液(高温灭活), 其余同上, 测定上清液的吸光值(A_0), 每个样品对应一个空白。

酶活单位的定义: 在上述反应条件下每小时产生 1 μg 对硝基苯胺所需要的酶量定义为一个酶活力单位。酶活力计算公式为:

$$\text{酶活力(U/mL)} = \frac{(A_{400} - A_0) \times \text{酶液稀释倍数}}{kT}$$

式中: A_{400} : 酶解液样品的吸光值; A_0 : 空白的吸光值; k : 线性系数(0.064 8); T : 酶促反应时间, h。

1.5 初筛培养

采用平板涂布法。准确称取 10 g 土样, 放入装有 90 mL 无菌水含玻璃珠的 250 mL 三角瓶中, 充分

振荡 20 min 后, 使微生物细胞分散, 静置 20–30 s, 即成 10^{-1} 稀释液。再用 1 mL 无菌吸管, 吸取 1 mL 稀释液, 移入装有 9 mL 无菌水的试管中, 吹吸 3 次让菌液混合均匀。以此类推, 连续稀释至 10^{-6} , 取 $10^{-3}-10^{-6}$ 稀释液 1 mL, 涂布于初筛培养基中, 在培养基中加入无色的 4'-硝基乙酰苯胺。培养 6 d 后取出观察, 产 CDA 菌株的周围会出现黄色(脱乙酰基后产生的黄色 4'-硝基苯胺)的显色圈, 根据显色圈的颜色深浅来判断菌株的产酶能力。从培养基中挑取变色深的单菌落, 继续纯化, 重复 3 次至菌落特征一致, 无异常菌落出现者, 可以认为是单菌落, 即完全纯化。转接于培养基试管于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保藏供复筛。

1.6 复筛

平板初筛挑选出来的菌株进一步进行摇瓶发酵产酶复筛。在 250 mL 三角瓶装液量 80 mL, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 48 h, 对各菌株发酵产生的 CDA 粗酶液进行提取, 测定每个菌株 CDA 的酶活。以 4'-硝基乙酰苯胺作为酶活力测定的底物, 通过分光光度法精确测定反应体系中对硝基苯胺的生成量来间接反映酶活力的高低。

1.7 菌株鉴定

1.7.1 形态学鉴定: 通过菌落形态和菌体染色制片, 参考《真菌鉴定手册》对菌株 A1 进行形态鉴定^[11]。

1.7.2 分子鉴定: 采用 rDNA ITS 序列分析法进行分子鉴定。通过提取菌株 DNA, 并进行 ITS 序列的 PCR 扩增, 样品进行双向序列测定。

(1) DNA 的提取: 采用 CTAB 法。

(2) DNA 样品的检测: 1% 的琼脂糖凝胶, 置于 $0.5 \times \text{TBE}$ 缓冲液中, 吸取 5 μL PCR 反应液, 与溴酚蓝上样 Buffer 混合后点样, 于 25 V 恒压电泳 40 min, 在凝胶成像系统下观察拍照。

(3) PCR 产物扩增: 引物 ITS1、ITS4 由华大基因科技公司合成。

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';

ITS4: 5'-TCCTCCGCTATTGATATGC-3'。

(4) 扩增体系(总体积 25 μL): 5 U/ μL Taq 酶

0.25 μL , 10 \times Buffer 2.5 μL , 10 mmol/L dNTPs 1.0 μL , 模板 DNA 2.5 μL , 引物 ITS1 和 ITS4 各 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , ddH₂O 16.75 μL 。

混匀离心后, 在 PCR 仪上进行扩增。

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后, 取 2 μL PCR 反应液与溴酚蓝上样 Buffer 混合后点样, 在加 EB 的 2% 琼脂糖凝胶电泳液中电泳 40 min, 用凝胶成像系统检测扩增结果。

(5) 序列测定及分析: PCR 产物样品送往华大基因科技公司直接进行序列测定。将所测菌株 A1 的 ITS 序列在 GenBank 核酸序列数据库中搜索, 得到同源性较高的 ITS 序列与基因公司测定的菌株的 ITS 序列用 MEGA 5 软件中的 ClustalW 软件进行对比排列, 排列不整齐的再进行手工校正。系统聚类采用 MEGA 5 软件中的邻接法(NJ)构建。对于由序列长度多态性所造成的空位(Gap), 在运算中处理为缺失(Missing)状态。用 Bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的置信度。再结合菌株的菌落及菌体形态

确定该菌株种类。

2 结果与分析

2.1 初筛结果

实验共从湖南湘江河岸长沙段的近岸土壤中分离菌株 117 株, 其中 30 余株有一定的产 CDA 潜力, 其中 4 株产 CDA 的能力较强(具有明显的 4'-硝基乙酰苯胺变色反应), 菌株编号分别为 A1、A3、A4 和 A5。平板初筛结果见图 1。对照菌株为微小毛霉(*Mucor pusillus*), 由本实验室保藏。

从图 1 中可见, 在变色圈法试验中, 菌株 A1 和 A4 变色圈中的黄色最为明显, 变色最为显著, 特别是 A1 菌株, 提示 A1 菌株可产 CDA, 且产酶能力最强。因此, 选取 A1 菌株作为后续菌株继续进行研究。

2.2 复筛酶活分析

在初筛的基础上, 进一步将菌株 A1、A3、A4、A5 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 的条件下培养 48 h, 测定各菌株胞内和胞外 CDA 的酶活。每个菌株做 3 次平行试验, 结果如表 1 所示。

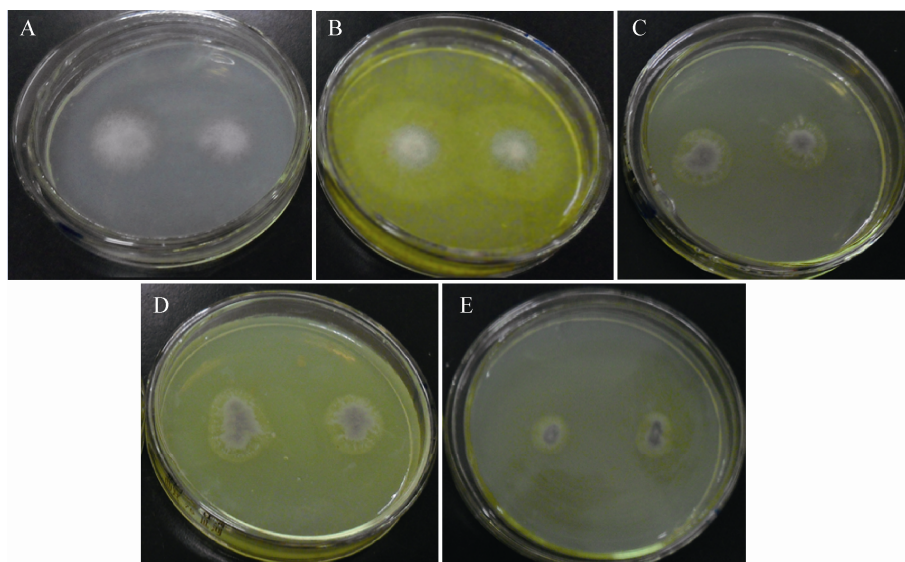


图 1 不同菌株产甲壳素脱乙酰酶显色培养试验

Figure 1 Culture of strains for producing chitin deacetylase using color-changing circle method

注: A: 对照菌株; B: 菌株 A1; C: 菌株 A3; D: 菌株 A4; E: 菌株 A5.

Note: A: Control; B: Strain A1; C: Strain A3; D: Strain A4; E: Strain A5.

表 1 各菌株胞内和胞外 CDA 酶活
Table 1 The intracellular and extracellular chitin deacelation (CDA) activity of the tested strains

测试菌株 Tested strains	胞内酶 Intracellular enzyme (U/mL)	胞外酶 Extracellular enzyme (U/mL)
Control	—	—
A1	5.09±0.12	13.21±0.68
A3	1.73±0.02	8.27±0.21
A4	4.88±0.19	10.79±0.34
A5	1.42±0.01	4.20±0.08

从表 1 可知，所有菌株的胞外酶活均显著高于各自的胞内酶活，提示 CDA 主要由细胞分泌于胞外。各菌株相比，菌株 A1 的胞内、胞外酶活均比其他几株的酶活高，分别为 5.09 U/mL 和 13.21 U/mL。因此通过发酵产酶的酶活分析进一步确认菌株 A1

具有高产 CDA 的能力。

2.3 菌株 A1 分类鉴定

2.3.1 菌株 A1 的形态特征: 图 2 为菌株 A1 在 PDA 培养基上的表型特征图。菌落特征：菌落表面有粉状物产生，在 PDA 培养基上生长速度较快，28 °C 培养 2 d 即可长出菌丝 培养 6 d 菌落直径为 55 mm 左右。气生菌丝旺盛，羊毛状，菌落初期为白色或淡紫色，菌落背面产生紫色色素，后期菌落背面为黄棕色。

图 3 为菌丝经过乳酸石碳酸染色，在显微镜下观察的结果。图 3A 为小型分生孢子，多为卵形、棒形或长椭圆形；图 3B 为大型分生孢子，镰刀形，较直而细长，通常不易产生，3–5 分隔；图 3C 为厚垣孢子，圆形、无色、壁光滑；图 3D 为产孢细胞

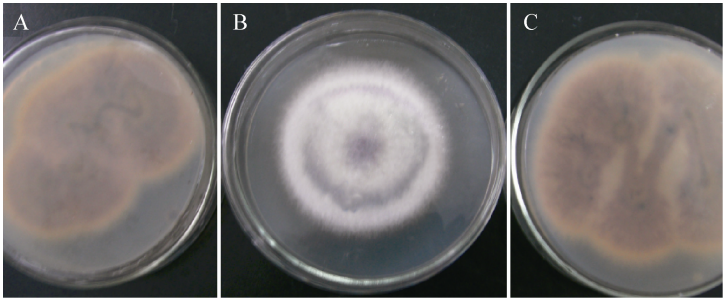


图 2 菌株 A1 在 PDA 固体培养基上的菌落

Figure 2 The colony of strain A1 grewthed on PDA culture medium

注：A 和 C：菌落正面图；B：菌落背面图。

Note: A and C: The front side of the colony; B: The back side of the colony.

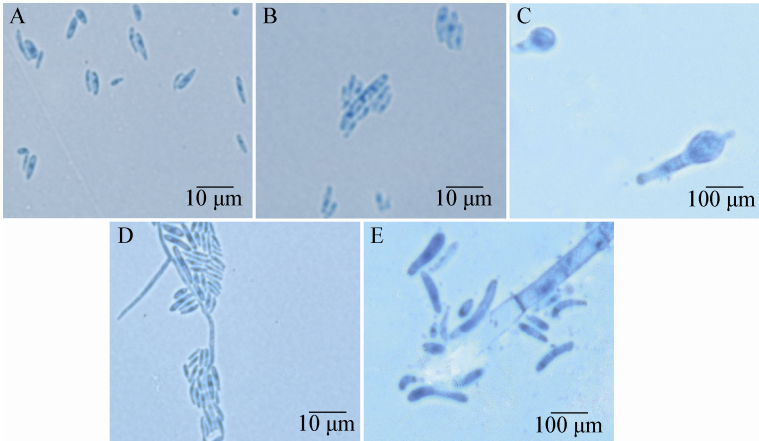


图 3 菌株 A1 的显微形态

Figure 3 Microscopic morphology of strain A1

注：A：小型分生孢子；B：大型分生孢子；C：厚垣孢子；D：产孢细胞和串生小型分生孢子；E：菌丝体。

Note: A: Microconidia; B: Macroconidium; C: Chlamydo-spore; D: Conidiogenous cells and microconidia in chain; E: Mycelium.

胞和串生的小型分生孢子，产孢细胞是复瓶梗，多分枝。大量串生的小型分生孢子，在气生菌丝的产孢细胞上形成大量较长的分生孢子链。图 3E 为菌丝，有隔。

由形态特征结合《真菌菌鉴定手册》^[11]和《浙江镰刀菌志》^[12]初步确定菌株 A1 为镰孢菌属(即镰刀菌属)。

2.3.2 菌株 A1 的分子鉴定: (1) 菌株 A1 经过 PCR 扩增后的电泳图。菌株 A1 通过研磨提取 DNA，并对提取到的 DNA 进行 ITS 序列的 PCR 扩增，然后在加 EB 的 2% 琼脂糖凝胶电泳液中电泳 40 min，用凝胶成像系统检测扩增结果见图 4。

图 4 为同一菌株 A1 的 PCR 扩增产物凝胶电泳图。从图 4 中可以看出，扩增产物经电泳检测，均出现单一的清晰条带，长度均在 559 bp。

(2) 测序结果与分析。扩增后的 PCR 产物送交华大基因公司进行序列测定，将测得的 ITS 区序列提交至 GenBank (登录号 KU184608)。在 GenBank 核酸序列数据库中进行 BLAST 搜索，得到同源性较高的 ITS 序列，下载具有代表性的菌株序列与实

验测得的菌株 ITS 序列进行比对，利用 MEGA 5 软件中的 ClustalW 将序列匹配排列后，进行邻接法 (N-J) 分析，构建的系统发育树如图 5 所示。

从图 5 中可以看出，菌株 A1 与登录号为 FJ040179.1 的菌株的亲缘关系最近，其序列的相似性为 99%，结合形态学和 ITS 区序列特征，因此鉴定菌株 A1 为层生镰孢菌(*Fusarium proliferatum*)。

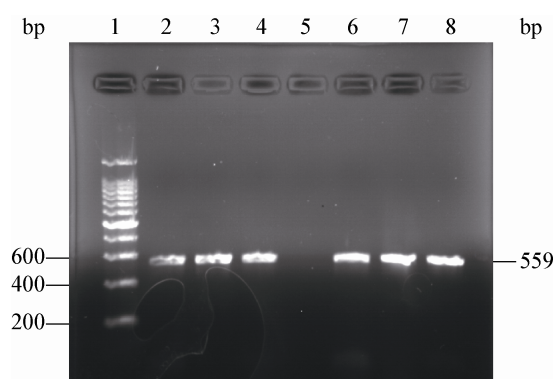


图 4 菌株 A1 的 rDNA ITS 序列的 PCR 扩增产物凝胶电泳图谱

Figure 4 Gel electrophoretogram of PCR products amplified from rDNA ITS of strains A1

注：1：Marker；2-4 和 6-8：菌株 A1 样品孔；5：阴性对照。

Note: 1: Marker; 2-4 and 6-8: A1 sample; 5: Negative control.

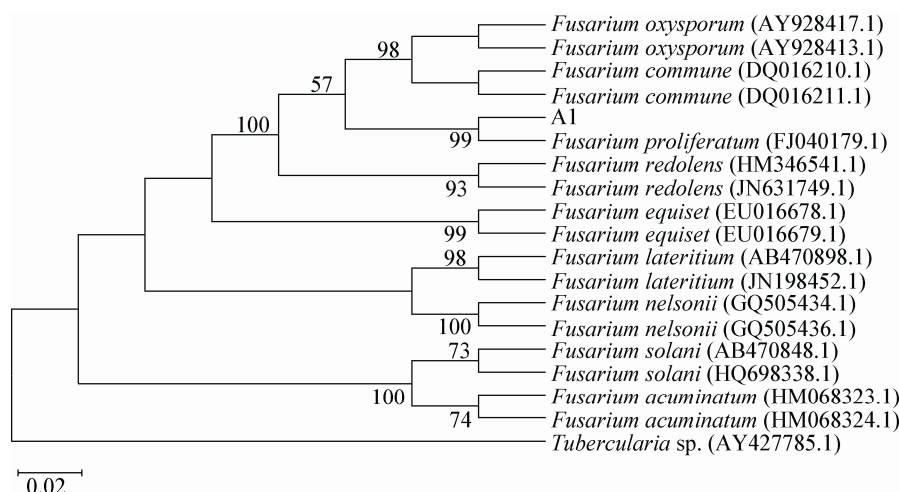


图 5 根据 rDNA ITS 序列构建的系统发育进化树

Figure 5 Phylogenetic tree based on rDNA ITS sequences with MEGA 5 software

注：括号内的数字为 GenBank 序列号；结点处数字为 Bootstrap 值。

Notes: Numbers in parenthesis represented the sequences' accession number in GenBank; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values.

3 讨论

目前国内外已有较多产 CDA 菌株的报道。Araki 和 Ito (1974)较早从接合菌纲(Zygomycetes)的 *Mucor rouxii* 中发现了 CDA^[13]。1982 年, Kauss 等从植物病原体 *Colletotrichum lindemuthianum* 中提取到 CDA 并进行了部分纯化, 这是从非接合菌中发现该酶的最早报道^[14]。后来许多真菌如 *Absidia coerulea*、*Absidia glauca*、*Mucor racemosus*、*Mucor miehei*、*Mucor circinelloides*、*Penicillium monoverticillium*、*Rhizopus nigricans*、*Aspergillus nidulans*、*Fusarium oxysporum*、*Colletotrichum lagenarium*、*Colletotrichum lindemuthianum*、*Cunninghamella bertholletiae* 等相继被报道可产生 CDA^[15-18]。另外, 新近还发现某些细菌也具有产 CDA 的能力, 如解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)^[10]、红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)^[19]、日本根霉(*Rhizopus japonicus*)^[20]和被孢霉菌(*Mortierella* sp. DY-52)^[7,21]等。

总体来看, 产 CDA 菌株大多为接合菌纲的真菌。本文通过 4'-硝基乙酰苯胺显色法, 较直观、快捷地从湖南湘江河岸长沙段的近岸土壤中筛选到 30 株可产 CDA 的菌株, 其中 4 株具有高产 CDA 的潜力, 菌株 A1 变色圈的颜色变化十分显著, 且发酵产酶活力最强, 是一株高产 CDA 的优良菌株, 进一步对其进行了形态及分子生物学鉴定, 初步确定其为层生镰孢(*Fusarium proliferatum*)菌株。但没有对该菌株发酵生产 CDA 进行研究。CDA 的酶活和产量是影响其生产化应用的关键因素, 当前以产 CDA 菌株为对象, 开展产酶发酵技术研究是 CDA 研究的热点领域。Zhang 等以日本根霉(*Rhizopus japonicus*)为出发菌株, 通过发酵优化可得 CDA 酶活为 547.38 U/L (以甲壳素为底物测定酶活)^[20]。Suresh 等^[8]研究了两种产 CDA 的霉菌(*Penicillium monoverticillium* 和 *Fusarium oxysporum*)在固体发酵过程中产 CDA 的技术。两菌种 CDA 的酶活均可达到 300 U/g 培养料(以乙二醇甲壳素为底物测定酶

活)^[8]。本文主要筛选和鉴定了产 CDA 菌株 A1, 通过菌株菌落边缘产生的强烈显色圈可直观证明其所产 CDA 的酶活较强, 液体发酵产酶复筛试验也证明该菌株具有较强的产酶能力, 其胞外 CDA 酶活高达 13.21 U/mL (13 210 U/L) (以对硝基乙酰苯胺为底物测定酶活)。刘丽萍等^[10]采用同样底物和检测方法报道了 10 株菌产 CDA 的性能, 最高酶活为 114.34 U/L, 远低于本试验所得菌株的酶活。今后将进一步对菌株 A1 开展发酵产酶技术研究, 并从发酵液中分离纯化 CDA, 对其酶学性质和催化甲壳素的性能等进行深入研究, 为今后工业化生产提供技术支撑。

参 考 文 献

- [1] Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications[J]. Reactive and Functional Polymers, 2000, 46(1): 1-27
- [2] Cai J, Yang JH, Du YM, et al. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 65(2): 211-217
- [3] Wang XL. Advances in application of Chitin and chitosan in food industry[J]. Food Research and Development, 2007, 28(10): 163-166 (in Chinese)
王晓玲. 甲壳素和壳聚糖在食品工业中应用的新进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(10): 163-166
- [4] Xi Y, Pan PL, Ye YX, et al. Chitin deacetylase family genes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)[J]. Insect Molecular Biology, 2014, 23(6): 695-705
- [5] Han GY, Li XM, Zhang T, et al. Cloning and tissue-specific expression of a chitin deacetylase gene from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: noctuidae) and its response to *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Insect Science, 2015, 15(1). DOI: 10.1093/jisesa/iev076
- [6] Kafetzopoulos D, Martinou A, Bouriots V. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(7): 2564-2568
- [7] Kim YJ, Zhao Y, Oh KT, et al. Enzymatic deacetylation of chitin by extracellular chitin deacetylase from a newly screened *Mortierella* sp. DY-52[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(4): 759-766
- [8] Suresh PV, Sakhare PZ, Sachindra NM, et al. Extracellular chitin deacetylase production in solid state fermentation by native soil isolates of *Penicillium monoverticillium* and *Fusarium oxysporum*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(8): 1594-1599
- [9] Zhou GY, Zhang HY, He YH, et al. Identification of a chitin deacetylase producing bacteria isolated from soil and its fermentation optimization[J]. African Journal of Microbiology Research, 2010, 4(23): 2597-2603
- [10] Liu LP, Zhao XY, Liu JJ, et al. A simple and rapid method for screening chitin deacetylase producing strains[J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(1): 65-68 (in Chinese)
刘丽萍, 赵祥瑞, 刘建军, 等. 一种简易、高效产几丁质脱乙酰酶菌种的筛选方法[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(1): 65-68

- [11] Wei JC. Handbook of Fungal Identification[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 1-186 (in Chinese)
魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 1-186
- [12] Chen HK, Wang GC. Record of Zhejiang *Fusarium*[M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1992: 1-72 (in Chinese)
陈鸿逵, 王拱辰. 浙江镰刀菌志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1992: 1-72
- [13] Araki Y, Ito E. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: enzymatic deacetylation of chitin[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1974, 56(3): 669-675
- [14] Kauss H, Jeblick W, Young DH. Chitin deacetylase from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*[J]. Plant Science Letters, 1983, 28(2): 231-236
- [15] Amorim RVS, Ledingham WM, Fukushima K, et al. Screening of chitin deacetylase from *Mucoralean* strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, 32(1): 19-23
- [16] Martinou A, Koutsoulis D, Bouriotis V. Cloning and expression of a chitin deacetylase gene (CDA2) from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*: purification and characterization of the cobalt-dependent recombinant enzyme[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(6): 757-763
- [17] Suresh PV, Sachindra NM, Bhaskar N. Solid state fermentation production of chitin deacetylase by *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates[J]. Journal of Food Science and Technology, 2011, 48(3): 349-356
- [18] Shrestha B, Blondeau K, Stevens WF, et al. Expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 38(2): 196-204
- [19] Sun YY, Zhang JQ, Wu SJ, et al. Statistical optimization for production of chitin deacetylase from *Rhodococcus erythropolis* HG05[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102: 649-652
- [20] Zhang HC, Yang SF, Fang JY, et al. Optimization of the fermentation conditions of *Rhizopus japonicus* M193 for the production of chitin deacetylase and chitosan[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 57-67
- [21] Zhao Y, Jo GH, Ju WT, et al. A highly N-glycosylated chitin deacetylase derived from a novel strain of *Mortierella* sp. DY-52[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2011, 75(5): 960-965

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,月刊,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计,本刊2012、2013、2014年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续获得“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选300种“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。2014年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助;2015年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2016年每册定价58元,全年696元,我们将免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413