

壳聚糖酶的研究进展

黄惠莉,朱利平

(华侨大学化工学院,福建厦门 361021)

摘要:壳聚糖酶(Chitosanase, EC 3.2.1.99)是一种对壳聚糖具有分解作用的专一性酶,可以特异性的水解壳聚糖,得到特异分子量范围的壳寡糖。壳寡糖是目前仅知的唯一的碱性寡糖,具有独特的生物活性。本文概述了近年来壳聚糖酶的研究进展,包括酶来源及性质、纯化方法的研究、分子水平的研究、作用方式及功能、应用及展望等方面,并探讨了壳聚糖酶研究中尚存在的主要问题及今后的研究方向。

关键词:壳聚糖酶,壳聚糖,壳寡糖,综述

Progress of research on chitosanase

HUANG Hui-li, ZHU Li-ping

(Chemical Engineering College, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Chitosanases (EC 3.2.1.99), which represent a specificity class of hydrolytic enzymes. It could catalyze the hydrolytic degradation of chitosan, and obtain specific molecular weight of chitooligosaccharides, which have outstanding biological properties. This review presented the outcome of studies carried out in different papers on chitosanases, including resources, properties, purification, characterization, molecular, mode of action, function, application and prospect. Meanwhile, we also had a discussion on the problems and future of chitosanase.

Key words: chitosanase; chitosan; chitooligosaccharides; review

中图分类号:TS201.2⁺⁵

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)06-0439-05

壳聚糖是甲壳素脱去乙酰基后的产物,是自然界中唯一存在的碱性多糖,具有生物可降解、对动物无毒害、可溶于酸性溶液、可获得多种物理形式并且更容易处理等特点。壳聚糖在多种领域都有应用,但是一般制得的壳聚糖的分子量很大,只能溶于某些酸性溶液之中,而且某些特殊功能只有将壳聚糖降解成壳寡糖后才能表现出来。壳寡糖(Chitosan oligosaccharide/Chitooligosaccharide, COS),又称低聚葡萄糖胺、低聚氨基葡萄糖等,是壳聚糖的降解产物,是目前仅知的唯一的碱性寡糖,具有独特的生物活性^[1]。壳寡糖的分子量较壳聚糖有所降低,溶解性大大提高,具有许多特殊的理化性质,例如与生物体细胞具有良好的生物兼容性,无毒性、环境友好型、易被生物体分解等,广泛的应用于医药卫生、保健食品、食品加工、化妆品、纺织、环保、农业、饲料等领域。尤其是在医药和食品方面,研究显示壳寡糖具有提高食品质量和人体健康的重要功效^[2]。壳聚糖酶(Chitosanase, EC3.2.1.99)是1973年Monaghan等^[3]首先提出来的,它是一种对线性壳聚糖具有分解作用的专一性酶,可以选择性地、特异地切断壳聚糖的β-(1-4)-糖苷键,得到特异分子量范围的壳寡糖^[4]。在1992年国际酶学命名会议上,被系统命名。

2004年,国际酶委员会对壳聚糖酶进行了重新定义:以内切的方式催化水解部分乙酰化壳聚糖中的β-(1-4)-氨基葡萄糖苷键的酶。

1 壳聚糖酶来源及性质

1973年,Monaghan等^[3]在研究水解酶降解病原性真菌的细胞壁时,发现有25种真菌和15种细菌的培养液具有不同的降解性能,于是就提出了一种新的酶——壳聚糖酶,它是一种可以水解完全脱乙酰化的壳聚糖,被认为是专一性水解线性壳聚糖的酶。后续研究者对多种来源的壳聚糖酶进行了研究,壳聚糖酶主要存在于真菌和细菌的细胞中,包括细菌、放线菌、真菌等,另外在一些植物的叶子、种子和果实中也存在壳聚糖酶,这是植物生长发育所必需的。一些主要的壳聚糖酶的来源和部分酶学性质如表1所示。

由表1可知,绝大多数的壳聚糖酶都是诱导型酶,分子量在50 000以下。但是由于不同壳聚糖酶的来源菌属不同,各自的性质具有一定的差异。酶的最适pH一般都小于7,即在偏酸性的环境下有利于酶对壳聚糖底物的降解,这是由于壳聚糖底物不溶于中性和碱性环境,只能溶于酸性溶液,所以进行酶降解实验必须在酸性环境下进行。酶最适反应温度为40~60℃,低于40℃的反应条件,不能满足酶催化所需要的活化能,反应不够迅速;过高的温度则会加快酶空间结构的破坏,导致酶反应速率的下降。

收稿日期:2011-04-26

作者简介:黄惠莉(1962-),女,教授,研究方向:海洋资源开发利用。

基金项目:福建省自然科学重点项目基金(2007T010)。

表 1 壳聚糖酶的来源和部分酶学性质

Table 1 Source and enzymology character of chitosanase

产酶微生物	相对分子量 (ku)	产酶方式	最适 pH	最适温度 (℃)	最适底物 (脱乙酰度)	K _m (mg/mL)	参考文献
<i>Serratia marcescens</i> TKU011	Gel-filtration 18, SDS-PAGE 21	诱导	5	50	Chitosan (DD95%)		[5]
<i>Pseudomonas</i> sp. TKU015	30	诱导	4	50	Chitosan		[6]
<i>Microbacterium</i> sp. OU01	ChiX 81 ChiN 30	诱导	ChiX 6.6 ChiN 6.2	ChiX 60 ChiN 50	ChiX DD86-100 ChiN DD95-100	ChiX 1.9 ChiN 5	[7]
<i>Gongronella</i> sp.JG	28	诱导	5.6	55~60	Chitosan	8.86	[8]
<i>trichoderma viride</i>	66	-	5.2	60	Chitosan DD75	10	[9]
<i>Bacillus cereus</i> D-11	41	诱导	6.0	60	Chitosan DD86	7.5	[10]
产壳聚糖酶 YJ02	66.2	诱导	6.0	50	Chitosan	64mmol/L	[11]
<i>Penicillium</i> sp.ZD-Z1	A 43 B 115	诱导	A 5.0 B 5.5	A 65 B 60	Chitosan		[12]
<i>Bacillus</i> sp.AA5	38.1	诱导	7.0	43	Chitosan DD90		[13]
<i>Bacillus</i> sp LS	30.9	诱导	5.0	55	Chitosan	2.5	[14]

2 壳聚糖酶纯化方法的研究

部分壳聚糖酶的纯化方法如表 2 所示。壳聚糖酶的纯化方法与一般酶的纯化方法一致,一般先经过硫酸铵盐析,然后通过各种离子或者凝胶柱进行亲和层析或者过滤,达到纯化的目的,最后通过 SDS-PAGE 的方法进行检测纯化后的蛋白是否达到电泳纯。

Tae Kyoung Eom 等^[18]将发酵液直接冻干,然后通过 DE52 和 S-Sepharose FF 离子交换柱,最后利用 Superdex 75 HR 10/30 进行凝胶层析,没有利用硫酸铵沉淀壳聚糖酶,同样取得了良好的效果。Xing-Ai Gao 等^[10]同样没有利用硫酸铵沉淀蛋白,研究者直接将发酵液冻干后的粗酶进行 Sephadex G-150 的凝胶分离,然后再利用 CM-Sephadex 进行亲和层析,最终达到纯化壳聚糖酶的目的。王平平等^[19]利用 30% 的冰丙酮沉淀蛋白后,通过两种凝胶柱 Sephadex G-25 和 Sephadex G-100 进行分离蛋白,最终纯化壳聚糖酶至电泳纯,并且取得了很高的回收率(45.11%)。

由表 2 可知,不同菌属的壳聚糖酶,利用不同的纯化方法,最终的收率、纯化倍数和纯酶的比活力差距甚大。这充分说明不同来源的壳聚糖酶具有不同的性质,虽然都可以水解壳聚糖,但是水解效率、自身反应条件的要求等都具有较大的差异和较为严格的要求,这也为壳聚糖酶的工业化应用提出了难题,同时也为各种其他来源的壳聚糖酶的寻找提供了契机。

3 壳聚糖酶分子水平的研究

随着技术的发展,壳聚糖酶分子水平的研究引起研究者的广泛关注,其中主要包括壳聚糖酶蛋白分子的研究和壳聚糖酶基因工程^[22]的研究,后者也是这些年壳聚糖酶研究的热点问题,研究者都在试图寻找一种可以快速生产壳聚糖酶的方法,为工业化应用壳聚糖酶打下良好的基础。

壳聚糖酶氨基酸序列的保守性不强,不同壳聚糖酶分子蛋白序列之间存在较大的差异,只有少数

保守区域,这些保守区域被认为与壳聚糖酶的催化活性或者稳定性相关。Ho Geun Yoon 等^[23]为了验证氨基酸残基保守区域对酶活力的作用,对一种新型的热稳定型壳聚糖酶(TCH-2)中保守的氨基酸残基(Leu64, Glu80, Glu94, Asp98, 和 Gly108)进行了 Aspartate 和 Glutamine 或者 Asparagine 和 Glutamate 的定点突变,通过突变后酶的 K_m 和 k_{cat} 的变化发现 Leu64 残基直接涉及 TCH-2 的酶催化活性的变化。Makoto Shimosaka 等^[24]通过 *Fusarium solani* 产壳聚糖酶分子的蛋白序列与其他壳聚糖酶氨基酸残基序列相似性对比,发现有三个氨基酸残基是保守性的,通过定点突变技术对 *Fusarium solani* 的壳聚糖基因进行处理,再利用基因工程的方法转导至 *Saccharomyces cerevisiae* 中表达,分析发现突变的壳聚糖酶与野生型的壳聚糖酶的二级结构相似,通过突变后壳聚糖酶的活力与野生型壳聚糖酶活力的对比发现 Asp-175 和 Glu-188 是壳聚糖酶催化活性所必需的氨基酸残基。

不同壳聚糖酶本身性质的差异以及菌属产酶的差异,促使研究者利用基因工程的手段对原始菌株进行不断的改进以及利用分子克隆的手段将壳聚糖酶基因导入其他模式菌种中进行大量表达,近年来国内关于此方面的研究也越来越频繁^[25-27]。

同时随着数据库的建立和生物信息学的发展,很多研究者开始利用筛选出来的产壳聚糖酶菌株的基因信息,通过数据库的比对,设计各种壳聚糖酶基因克隆的引物,进行壳聚糖酶基因的克隆表达。Songlin Li 等^[28]利用基因工程的手段,将 *Aspergillus* sp.CJ22-326 内切型壳聚糖酶基因克隆后,转导至大肠杆菌中表达, IPTG 诱导细胞产酶,通过 Ni-NTA 对含有组蛋白尾的重组蛋白进行纯化,酶活的测定结果显示重组蛋白的酶活高于原壳聚糖酶活力。Huawei Liu 等^[29]筛选的一株 *F.solani* 0114 产壳聚糖酶的活力较低(73.5mU/mL),研究人员在 pCAMBLA 1300 的基础上建立了一个新的载体,将壳聚糖基因导入 *E.coli* DH5 α 中进行大量表达,结果显示重组后

表2 部分壳聚糖酶的纯化方法
Table 2 Methods of portion Chitosanase purification

产酶微生物	纯化步骤 (方法)	检测纯度的方法	收率 (%)	纯化倍数	纯酶比活力 (U/mg)	参考文献
<i>Aspergillus</i> sp. CJ22-326	(NH ₄) ₂ SO ₄ , CM-Sepharose FF chromatography, Sephadex S-200 gel filtration.	SDS-PAGE	ChiA 7.4, ChiB 37.0	ChiA 4.01, ChiB 11.34	ChiA 6.46, ChiB 18.26	[15]
<i>Penicillium chrysogenum</i> AS51D	HiTrap SP HP, HiLoad 26/60 Superdex 75	SDS-PAGE	-	-	-	[16]
<i>Serratia marcescens</i> TKU011	(NH ₄) ₂ SO ₄ , DEAE-Sepharose, Sephadex S-100	Gel-filtration, SDS-PAGE	24	50	0.1	[17]
<i>Pseudomonas</i> sp. TKU015	(NH ₄) ₂ SO ₄ , DEAE-Sepharose, Phenyl-Sepharose	SDS-PAGE	13	6.4	59.1	[6]
<i>Microbacterium</i> sp. OU01	0~80% (NH ₄) ₂ SO ₄ , Q-Sepharose FF, Sephadex G-75	SDS-PAGE	ChiX 5 ChiN 35	ChiX 8 ChiN 25	ChiX 330 ChiN 1060	[7]
<i>Gongronella</i> sp.JG	CM-Sepharose FF, Superdex 200, SP-Sepharose FF	SDS-PAGE	-	-	-	[8]
<i>Aspergillus fumigatus</i> KB-1	Freeze-dried, DE52 anionic exchange column, S-Sepharose FF, Superdex 75 HR 10/30	SDS-PAGE, MALDI-TOF-MS	-	-	-	[18]
<i>Bacillus cereus</i> D-11	Lyophilization, dialysis, Sephadex G-150, CM-Sephadex	SDS-PAGE	3.9	8.8	347.8	[10]
产壳聚糖酶 YJ02	(NH ₄) ₂ SO ₄ , Q-Sepharose FF, Sephadex S-100	SDS-PAGE	47.6	28.9	1336	[11]
<i>Pseudomonas</i>	30% acetone, Sephadex G-25, Sephadex G-100	SDS-PAGE	45.11	6.84	160.90	[19]
<i>Penicillium</i> sp.ZD-Z1	超滤,冰乙醇, HiPrep 16/10 SP XL, Sephadex G50	SDS-PAGE	A 30.8 B 22.4	A 8.1 B 2.9	A 185.8 B 67.5	[12]
黑曲霉	丙酮分级沉淀,交联壳聚糖树脂亲和层析, DEAE-Sepharose FF	SDS-PAGE			71.24	[20]
<i>Bacillus</i> sp.AA5	20%~80% (NH ₄) ₂ SO ₄ , DEAE-cellulose,	SDS-PAGE	38.5	30.9	423.1	[13]
<i>Bacillus</i> sp LS	(NH ₄) ₂ SO ₄ , DEAE-Sephadex A25, Sephadex G-100	SDS-PAGE	34.2	22.4	421.1	[14]
<i>Beta proteobacterium</i> sp.T1	20%~70% (NH ₄) ₂ SO ₄ , DEAE Cellulose 52, Sephadex G-100	SDS-PAGE	44.3	26.32		[21]

壳聚糖酶活力达到 156.2mU/mL, 为原来酶活力的 2.1 倍, 这也说明了基因工程手段具有应用于壳聚糖酶的工业化生产的可行性。

4 壳聚糖酶的作用方式及功能

真菌细胞壁本身就包含了甲壳素和壳聚糖两种物质。不同的发育时间,不同的酶对菌体的生理周期进行调节,关于这种调节的具体过程和产生调节的机制的研究一直都在进行。并且随着技术的革新,对壳聚糖酶本身作用的深入了解,很多研究者开始着眼于壳聚糖酶的空间结构^[30]以及它与菌体自身壳聚糖作用之间的微观联系,以期达到对壳聚糖酶更全面的了解。

吴绵斌等^[31]假设里氏木霉产壳聚糖酶具有唯一的内切作用方式,然后通过一系列的假设和简化,建立了里氏木霉壳聚糖酶降解的水解进攻动力学模型(Random Attacking Model),通过模型的计算结果,提出该动力学模型可以合理的描述和解释壳聚糖酶法降解的过程,对生产特定聚合度的壳寡糖具有一定的指导意义。陈小娥等^[32]测定两种壳聚糖酶反应后

酶解液体系的粘度,并对其酶解产物进行了 TLC 和 HPLC 的分析,对两种壳聚糖酶组分(ChiB, ChiA)的水解模式进行了研究。发现酶 ChiB 是一种内切型的壳聚糖酶,能够作用于壳聚糖分子链的内部,水解 GlcN-GlcNAc、GlcNAc-GlcN、GlcN-GlcN 糖苷键,使反应体系的粘度快速下降。酶 ChiA 是一种外切氨基葡萄糖酶,主要是从壳聚糖或甲壳低聚糖分子非还原端一次性裂解氨基葡萄糖残基,其只作用于 GlcN-GlcN 和 GlcNAc 糖苷键。这说明不同的壳聚糖酶之间的作用方式具有一定的区别,对于壳聚糖酶作用方式不同有待进一步深入研究。

在植物体中壳聚糖酶可以抵制植物病原菌的侵染,抑制致病菌的生长,所以壳聚糖酶被认为是一种植物抗病毒性相关蛋白,所以很多研究人员设想利用基因工程手段改造植物,使其自身产壳聚糖酶,或者利用生物防治的方法,即利用产壳聚糖酶的微生物进行病原性真菌的抑制。Huawei Liu 等^[33]通过 RNA 沉默法对 *Fusarium solani* 产的胞外壳聚糖酶基因进行改造,然后再导回 *Fusarium solani* 0114 中,转化后的 CSN1 沉默株对菌丝的生长和孢子的形成没

有影响,但是对豆荚和幼苗的生理测定结果显示,沉默株的毒性比野生型菌株和CSN1大量表达菌株的毒性更高,这说明 *Fusarium solani* 壳聚糖酶对真菌的致病性起抑制性效果,这与植物本身产壳聚糖酶抑制真菌生长的结论不谋而合。

5 壳聚糖酶的应用及展望

壳聚糖酶的应用与其自身性质密切相关,关于壳聚糖酶的应用也是多种多样,主要在以下方面进行研究:a.制备真菌原生质体:壳聚糖酶专一性的降解壳聚糖^[4],有研究者利用壳聚糖酶进行真菌原生质体的产生,直接应用于菌种的遗传学杂交实验,特别对那些细胞壁成分是脱乙酰几丁质的接合菌更有效。b.抑制植物病原菌:大多数真菌细胞壁的主要成分是壳聚糖,研究发现可利用壳聚糖酶降解植物病原真菌的细胞壁,分析病原真菌的细胞壁组成,推测一些真菌对植物病的发病机理,进一步有效防治致病菌危害,提高农作物尤其是一些经济作物的产量。c.壳寡糖的制备:壳聚糖酶另一个主要的应用是降解壳聚糖,产生有巨大经济效益、特定聚合度的壳寡糖^[34],壳寡糖不仅有水溶性好、易吸收等优点,还具有抗细菌、真菌、调节机体免疫及抗癌等功能,在功能食品、保健药品等行业具有广泛的应用。

由于壳聚糖自身的稳定性限制了壳聚糖酶大规模的应用,所以壳聚糖酶的应用研究主要是围绕两个方面展开的,一是提高壳聚糖酶本身的催化活性,二是提高壳聚糖酶的稳定性。提高壳聚糖酶催化活性主要包括菌株的改良和壳聚糖重组酶的构建^[35]两个方面。关于壳聚糖酶稳定性研究主要是利用固定化技术对壳聚糖酶进行固定化处理。Kien Xuan Ngo等^[36]发现了一种新型的生物催化法,将壳聚糖酶固定在脂质体上,壳聚糖酶活力和稳定性大大提高。Takashi Kuroiwa^[37]和Yu-Wei Lin^[38]等都对壳聚糖酶的固定化进行了尝试,固定化后的酶比原酶的稳定性都有了很大地提高。另通过基因水平酶的改造也可以提高酶的产量和稳定性,这也是很多研究者努力的方向。

壳聚糖来源广泛,壳聚糖酶的研究必将进一步地扩大壳聚糖的应用范围,产生不可估量的经济价值。同时对壳聚糖酶来源、性质和产量等的研究也可扩大壳聚糖酶在科研、医药、卫生、农业和材料等多领域的应用。

6 壳聚糖酶研究中存在的主要问题

近年来发现了许多来自于自然界中产壳聚糖酶的微生物菌株^[39-41],但总体来说,酶活力还普遍较低,而真正产酶量大、适用于工业化大规模生产的菌株很少,导致商品壳聚糖酶价格居高不下,继续寻找不同微生物来源的壳聚糖酶,以得到具有工业化潜在应用价值的酶源,越来越受到关注。

壳聚糖酶纯化成本较高,导致壳聚糖酶纯品价格高昂,限制了壳聚糖酶的应用,工业上很多都是利用多糖水解酶、脂肪酶、蛋白酶等造价比较低廉的酶进行生产加工。

参考文献

- [1] J Simunek, I Koppova, L Filip, et al. The antimicrobial action of low - molar - mass chitosan, chitosan derivatives and chitooligosaccharides on bifidobacteria [J]. *Folia Microbiologica*, 2010, 55(4):379-382.
- [2] N Y Yoon, D N Ngo, S K Kim. Acetylcholinesterase inhibitory activity of novel chitooligosaccharide derivatives [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78(4):869-872.
- [3] R L Monaghan, D E Eveleigh, R P Tewari, et al. Chitosanase, a novel enzyme [J]. *Nat New Biol*, 1973, 245:78-80.
- [4] D Somashekhar, R Joseph. Chitosanases - properties and applications: A review [J]. *Bioresour Technol*, 1996, 55 (1): 35-45.
- [5] S L Wang, J H Peng, T W Liang, et al. Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011 [J]. *Carbohydr Res*, 2008, 343(8):1316-1323.
- [6] S L Wang, S J Chen, C L Wang. Purification and characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp TKU015 using shrimp shells as a substrate [J]. *Carbohydrate Research*, 2008, 343(7):1171-1179.
- [7] Y Y Sun, W S Liu, B Q Han, et al. Purification and characterization of two types of chitosanase from a *Microbacterium* sp. [J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(17):1393-1399.
- [8] J Wang, W Zhou, H Yuan, et al. Characterization of a novel fungal chitosanase Csn2 from *Gongronella* sp JG [J]. *Carbohydrate Research*, 2008, 343(15):2583-2588.
- [9] J Liu, W S Xia. Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulase [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 30(1):82-87.
- [10] X A Gao, W T Ju, W J Jung, et al. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11 [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72(3):513-520.
- [11] 韩宝芹,杨菊林,刘万顺,等.壳聚糖酶的分离纯化及性质研究[J].中国海洋大学学报:自然科学版,2006,36(2):255-260.
- [12] 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(5):814-819.
- [13] 李雪琴,苗笑亮,郝莉花.*Bacillus* sp.AA5所产壳聚糖酶的纯化及性质研究[J].食品科技,2006,31(7):52-55.
- [14] 周念波,李轶群,涂绍勇.*Bacillus* sp.LS壳聚糖酶的分离纯化及性质研究[J].食品科技,2008,33(2):4-8.
- [15] X Chen, W S Xia, X B Yu. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus* sp CJ22-326 [J]. *Food Research International*, 2005, 38(3):315-322.
- [16] A Rodriguez - Martin, R Acosta, S Liddell, et al. Characterization of the novel antifungal chitosanase PgChP and the encoding gene from *Penicillium chrysogenum* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(2):519-528.
- [17] S L Wang, J H Peng, T W Liang, et al. Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011 [J]. *Carbohydrate Research*, 2008, 343(8):1316-1323.

- [18] T K Eom, K M Lee. Characteristics of chitosanases from *Aspergillus fumigatus* KB-1 [J]. Archives of Pharmacal Research, 2003, 26(12): 1036-1041.
- [19] 王平平, 周培根, 王艳, 等. 假单胞菌产壳聚糖酶的纯化和特性[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(2): 184-188.
- [20] 吴爱祥. 固态发酵黑曲霉产壳聚糖酶的纯化及其性质研究[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(1): 106-108.
- [21] 黄益, 吕淑霞. Beta *proteobacterium* sp.T1 菌株产壳聚糖酶的分离纯化[J]. 生物技术, 2008, 18(1): 69-70.
- [22] A Zuo, P Sun, D Liang, et al. Improved transfection efficiency of CS/DNA complex by co-transfected chitosanase gene [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 352 (1-2): 302-308.
- [23] H G Yoon, S W Yang, H Y Kim, et al. Analysis of essential leucine residue for catalytic activity of novel thermostable chitosanase by site-directed mutagenesis [J]. Journal of Protein Chemistry, 2000, 19(7): 621-630.
- [24] M Shimosaka, K Sato, N Nishiwaki, et al. Analysis of essential carboxylic amino acid residues for catalytic activity of fungal chitosanases by site-directed mutagenesis [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(5): 545-550.
- [25] 梁东春, 左爱军, 郭刚, 等. 烟曲霉菌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.
- [26] 孙玉英, 张继泉, 王淑军. 芽孢杆菌 *Bacillus* sp.S-1 壳聚糖酶基因的克隆与序列分析[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(5): 72-77.
- [27] 马镝, 赵秀香, 吴元华. 壳聚糖酶基因的克隆与序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(4): 727-728.
- [28] S L Li, L Chen, C Wang, et al. Expression, purification and characterization of endo-type chitosanase of *Aspergillus* sp CJ22-326 from *Escherichia coli* [J]. Carbohydrate Research, 2008, 343(17): 3001-3004.
- [29] H W Liu, X M Bao. Overexpression of the chitosanase gene in *fusarium solani* via agrobacterium tumefaciens-mediated transformation [J]. Current Microbiology, 2009, 58(3): 279-282.
- [30] A L van Bueren, M G Ghinet, K Gregg, et al. The structural basis of substrate recognition in an exo-beta-D-glucosaminidase involved in chitosan hydrolysis [J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 385(1): 131-139.
- [31] 吴绵斌, 夏黎明. 壳聚糖酶解的随机进攻动力学模型[J]. 高校化学工程学报, 2001, 15(6): 552-556.
- [32] 陈小娥, 方旭波, 余辉, 等. 曲霉产壳聚糖酶的水解作用模式[J]. 过程工程学报, 2008, 8(2): 350-354.
- [33] H W Liu, B Zhang, C S Li, et al. Knock down of chitosanase expression in phytopathogenic fungus *fusarium solani* and its effect on pathogenicity [J]. Current Genetics, 2010, 56(3): 275-281.
- [34] 吴晓宗, 王岁楼, 郝莉花. 壳聚糖酶的分类及其功能应用现状[J]. 食品工业科技, 2005, 26(8): 189-192.
- [35] Y L Liu, S Jiang, Z M Ke, et al. Recombinant expression of a chitosanase and its application in chitosan oligosaccharide production [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(6): 815-819.
- [36] K X Ngo, H Umakoshi, T Shimanouchi, et al. Chitosanase displayed on liposome can increase its activity and stability [J]. Journal of Biotechnology, 2010, 146(3): 105-113.
- [37] T Kuroiwa, H Izuta, H Nabetani, et al. Selective and stable production of physiologically active chitosan oligosaccharides using an enzymatic membrane bioreactor [J]. Process Biochemistry, 2009, 44(3): 283-287.
- [38] Y W Lin, Y C Hsiao, B H Chiang. Production of high degree polymerized chito-oligosaccharides in a membrane reactor using purified chitosanase from *Bacillus cereus* [J]. Food Research International, 2009, 42(9): 1355-1361.
- [39] 陈小娥, 夏文水, 余晓斌. 壳聚糖酶高产菌株的筛选及酶解产物的定性[J]. 食品与发酵工业, 2004(2): 57-61.
- [40] 邱乐泉, 施杨芳, 朱玮玮. 假单胞菌 h3 壳聚糖酶的纯化及部分酶学性质[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(5): 49-52.
- [41] 彭喜春, 彭志英, 段杉. 无花果沙雷氏菌 (*Serratia ficaria*) CH—0203 产壳聚糖酶发酵条件的研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(6): 20-22.
- (上接第 438 页)
- [32] Saiga A, Okumura T, Makihara T, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract [J]. Agric Food Chem, 2003, 51: 1741-1745.
- [33] Jung W K, Mendis E, Je J Y, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats [J]. Food Chemistry, 2006, 94: 26-32.
- [34] 安桂香, 庄桂东, 徐振凯, 等. 食物中血管紧张素转化酶抑制肽的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(6): 173-175.
- [35] Zhipeng Yu, Wenzhu Zhao, Jingbo Liu, et al. QIGLF, a novel angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide from egg white protein [J]. J Sci Food Agric, 2011, 91: 921-926.
- [36] Nakagomi K, Yamada R, Ebisu H, et al. Isolation of acein-2, a novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from a tryptic hydrolysate off human plasma [J]. FEBS Letters, 2000, 467: 235-238.
- [37] Nakagomi K, Ebisu H, Sadakane Y, et al. Properties and human origin of two angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides isolated from a tryptic hydrolysate of human serum albumin [J]. Biological Pharmaceutical Bulletin, 2000, 23: 879-883.
- [38] Kuba M, Tanaka K, Tawata S, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides isolated from fermented soybean [J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 2003, 67: 1278-1283.
- [39] Satake M, Enjoh M, Nakamura Y, et al. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66: 378-384.
- [40] Wim Maes, John Van Camp, et al. Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells [J]. Regulatory Peptides, 2004, 118: 105-109.