

文章编号: 1673-1689(2011)05-0705-06

# *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1 几丁质酶的性质及在虾皮水解中的作用

郝之奎<sup>1,2</sup>, 蔡宇杰<sup>1</sup>, 廖祥儒<sup>\*1</sup>, 胡明明<sup>1</sup>,  
张海蓉<sup>1</sup>, 李娇阳<sup>1</sup>, 邢玉鹏<sup>1</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 安徽省阜阳市颍州区水产技术推广站, 安徽 阜阳 236000)

**摘要:** 以菌株产几丁质酶细菌 *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1 为材料, 对几丁质酶进行了分离纯化及酶学性质研究。通过硫酸铵沉淀、DEAE-cellulose 阴离子交换介质和 Sephadex G-100 分子筛层析柱处理其所产几丁质酶, 获取纯度为 95% 以上的几丁质酶。酶学性质表明, 该酶的最适温度为 40 °C, 最适 pH 值为 6.5, 在 50 °C 以下较为稳定, 在 pH 值为 5.0 时最稳定, β-巯基乙醇有利于防止半胱氨酸氧化而增加几丁质酶稳定性, EDTA 可增加该酶稳定性, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 对几丁质酶有明显的激活作用, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 对几丁质酶有较大的抑制作用。SYBG-H1 几丁质酶可把虾皮水解为 N-乙酰氨基葡萄糖, 水解率为 21.8%。

**关键词:** 几丁质酶; 热稳定性; β-巯基乙醇; EDTA; *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

## Enzyme Characterization of a New Strain of Chitinase

HAO Zhi-kui<sup>1,2</sup>, CAI Yu-jie<sup>1</sup>, LIAO Xiang-ru<sup>\*1</sup>, HU Ming-ming<sup>1</sup>,  
ZHANG Hai-rong<sup>1</sup>, LI Jiao-yang<sup>1</sup>, XING Yu-peng<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;  
2. Fishery Extension Station of Yingzhou District, Fuyang 236000 China)

**Abstract:** Chitinase from a new isolated strain *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1 was purified and characterized in this study. Chitinase of more than 95% purity was obtained after ammonium sulfate precipitation, DEAE-32 negative chromatography and Sephadex G-100 sieve chromatography. The results of enzyme properties indicated that its optimal pH and temperature was 40 °C and 6.5, respectively. Chitinase exposed to temperature lower than 50 °C was stable and it is most stable at pH 5.0. Its stability was promoted with the addition of mercaptoethanol and EDTA. Moreover, the chitinase activity was apparently stimulated by Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, while inhibited by Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup>. The shrimp crust was hydrolyzed into

收稿日期: 2010-12-27

基金项目: 国家 863 计划项目(2010AA101501); 科技部科技人员服务企业项目(2009GJ10038); 国家自然科学基金项目(21045007); 江苏省科技创新与成果转化(重大科技支撑与自主创新)专项引导资金项目(BY2010117); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP21120)。

作者简介: 郝之奎(1972-), 男, 安徽阜阳人, 发酵工程博士研究生。Email: haozhikuil23@126.com

\* 通讯作者: 廖祥儒(1963-), 男, 江西南康人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物与酶技术、基因工程与生物制药方面的研究。Email: Liaoxiangru@163.com

acetylglucosamine by Chitinase from SYBG-H1, and the hydrolysis rate achieved at 21.8%.

**Key words:** chitinase, thermal stability,  $\beta$ -mercaptoethanol, EDTA, Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBG-H1

几丁质是由 N-乙酰-D-氨基葡萄糖通过  $\beta$  1, 4 糖苷键聚合而形成的直链形聚合物, 主要存在于在真菌细胞壁、线虫的微纤微鞘、节肢动物的骨架及昆虫的胃肠膜等, 是自然界中分布极为广泛的且储量仅次于纤维素的可持续利用多糖。含量最高且较易利用的几丁质来源于虾蟹等甲壳动物的外骨骼, 其单体为 N-乙酰-D-氨基葡萄糖, 有  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 种类型。此外, 几丁质还是自然界中储量位于蛋白质之后的第二含氮有机化合物。几丁质酶 (E. C. 3.2.1.14) 能水解几丁质生成几丁寡糖、几丁二糖或 N-乙酰-D-氨基葡萄糖。根据其作用的部位, 可把几丁质酶分为外切几丁质酶 (exochitinase)、内切几丁质酶 (endochitinase) 和几丁质糖苷酶。外切几丁质酶作用于几丁质长链的非还原端端部, 每次切除产生一个几丁二糖; 内切几丁质酶可随机作用于几丁质长链的某一个糖苷键, 水解为几丁寡糖; 几丁质糖苷酶则可从非还原端开始水解几丁质生成 N-乙酰-D-氨基葡萄糖。产几丁质酶的微生物在自然界中分布十分广泛, 江河湖海, 丘陵山地, 即使一些极端环境中都有产几丁质酶的微生物分布, 涉及的微生物包括细菌、真菌、放线菌等。随着对几丁质研究的深入, 作为自然界中惟一的碱性多糖, 其单体或寡糖越来越多的特异性质被发现, 在食品、医药、生防、环保等诸多领域有着广泛的应用<sup>[1-2]</sup>。

根据中国水产学会资料, 仅 2006 年中国虾蟹产量就已达 149 万 t, 每年产生约 30 万 t 几丁质含量丰富的渔业废弃物, 如何在防止这些废弃物污染环境同时, 将其转化为附加值极高的几丁寡糖及 N-乙酰-D-氨基葡萄糖, 已受到越来越多的企业及科研单位的关注。传统工艺处理几丁质的方法是酸碱水解法, 其反应不易控制, 且对环境造成严重污染。生物法处理几丁质反应温和, 产品质量高, 对环境危害小, 是处理几丁质技术的发展方向。作者所在实验室从自然界筛选得到一株高产几丁质酶的细菌 *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1, 研究了其几丁质酶的酶学性质, 探讨了其几丁质酶水解虾皮产生 N-乙酰-D-氨基葡萄糖的可能性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 产几丁质酶菌种

由作者所在实验室分离筛选, 样本采自无锡梅园 (33°56' N, 120°18' E), 分离菌株依据伯杰氏系统细菌学手册进行生理生化鉴定<sup>[3]</sup> 和 16S rRNA 基因序列分析, 确定为一新属新种<sup>[4-5]</sup>, 定名为 *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1, 并保存于中国普通微生物菌种保藏中心 (CGMCC3438) 及美国模式菌种收集中心 (ATCC BAA-2140)。

### 1.2 培养基

种子培养基 (组分 g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7, MgSO<sub>4</sub> 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, FeSO<sub>4</sub> 0.002, 蛋白胨 4, 酵母浸出物 4, 葡萄糖 4。

发酵培养基 (组分 g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7, MgSO<sub>4</sub> 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, FeSO<sub>4</sub> 0.002, 粉粒几丁质 4, 尿素 4, 葡萄糖 1.2。

### 1.3 材料与试剂

BioFlo 110 型生物发酵罐: 美国 NBS 公司; Himac CR22G 高速冷冻离心机: 日本 Hitachi 公司; AKTA 纯化系统: GE 公司; 电泳系统: 美国 Bio-Rad 公司; 数显恒温磁力搅拌器: 金坛市杰瑞尔电器有限公司; 真空冷冻干燥机: 美国 LABCONCO 公司; 紫外分光光度计 UV-3000: 日本 HITACHI; 透析袋: 截留相对分子质量 3 500, 购于北京索莱宝科技有限公司; 蛋白质相对分子质量 Marker: 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 其它试剂均为分析纯。

### 1.4 几丁质酶发酵液的制备

制备种子培养液, 以体积分数 4% 的接种量接种至装有液态产酶培养基的 BioFlo 110 型生物发酵罐, 培养温度 30 °C, 转速为 200 r/min, 通气量与溶氧串级控制在 3~6 in/L 之间, 溶氧控制在 80% 左右, 定期测定发酵液中的各项指标, 72 h 结束发酵, 离心, 分离菌体, 收集发酵液, 4 °C 贮存备用。

### 1.5 几丁质酶样品的制备

在硫酸铵饱和度 40%~50% 时处理发酵液, 获取几丁质酶沉淀, 用 0.1 mmol/L 广泛缓冲液 (pH 6.5) 溶解并充分透析, 再分别通过 DEAE-cellulose 阴离子交换介质的层析柱 (2.0 cm × 30 cm) 和 Sephadex G-100 分子筛层析柱 (1.6 cm × 90 cm) 检

测几丁质酶酶活, SDS-PAGE 鉴定几丁质酶纯度, 0.22 μm 纤维素膜过滤, 4 °C 无菌环境贮存备用。

## 1.6 几丁质酶测定方法及酶活定义

采用 DNS 比色法 (3, 5-二硝基水杨酸) 法<sup>[5]</sup> 测还原糖 (以 N-乙酰葡萄糖胺计)。在已预热的 0.5 mL 0.5% 的胶体几丁质和 0.5 mL 0.2 mol/L 广泛缓冲液 (pH 7.0) 中加入 0.5 mL 酶液, 于 37 °C 温浴 30 min 后沸水浴 5 min, 中止反应后加入 1.5 mL DNS 试剂, 沸水浴 5 min, 冷却至室温, 离心后取上清液, 在波长 535 nm 下测吸光度, 以灭活的等量酶液作空白对照。

酶活定义为: 37 °C 下 1 min 转化底物胶体几丁质产生 1 μmol 还原糖所需的酶量规定为 1 个活力单位 (U)。

## 1.7 几丁质酶的性质

在不同反应温度下测几丁质酶活力, 研究几丁质酶的最适反应温度; 在不同 pH 值条件下测几丁质酶活力, 研究几丁质酶的最适 pH 值; 在 45 °C 下保温几丁质酶 1 h, 测几丁质酶剩余酶活力, 研究几丁质酶的热稳定性; 置不同 pH 值酶液于 20 °C 条件下存放 48 h, 测几丁质酶剩余酶活力。研究几丁质酶不同 pH 值条件下的稳定性; 不同的金属离子终浓度调为 50 mmol/L 时测几丁质酶活力。以没有金属离子的作对照, 研究金属离子对几丁质酶酶活的影响; 巯基乙醇终浓度为 50 mmol/L 的酶液样本置于 4 °C, 间隔 24 h 测剩余几丁质酶活力, 研究巯基乙醇对几丁质酶稳定性的影响; EDTA 终浓度为 50 mmol/L 的酶液样本置于 4 °C, 间隔 24 h 测剩余几丁质酶活力, 研究 EDTA 对几丁质酶稳定性的影响。

## 1.8 虾皮的酶促水解

**1.8.1 虾皮的处理** 收集水产废弃物虾皮, 去离子水浸泡 24 h 以上, 沸水蒸煮 1 h, 清除污物, 105 °C 烘干, 粉碎, 100 目过筛, 悬浮于 0.1 mmol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH 6.5) 中, 制成含 1 g/dL 虾皮的悬浊液, 灭菌备用。

**1.8.2 几丁质水解率** 按 1 g/dL 的虾皮悬浊液与 5 U/mL 几丁质酶液等比例混合, 于 37 °C、150 r/min 条件下无菌水解 20 h, 离心收集残留虾皮, 洗涤干燥至恒重后称量。以灭活的几丁质酶按同样方法操作作对照。

$$\frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\%$$

式中,  $W_1$  为对照中虾皮质量 (g);  $W_2$  为水解后反应混合物中残余虾皮质量 (g)。每个实验重复 3 次, 取平均值作为实验结果。

**1.8.3 水解产物的 HPLC 分析** 水解后的反应液离心取上清液用于 HPLC 分析。色谱柱: Shodex Asahipak NH2P-50N 柱 (4.6 mm × 250 mm), 流动相为乙腈: 水: 5 mol/L 醋酸缓冲液 = 70: 30: 0.25; 流速为 0.8 mL/min, 检测器为示差折光检测器, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。

## 2 结果与分析

### 2.1 几丁质酶最适反应温度

在不同反应温度下检测几丁质酶活力, 结果见图 1。SYBG-H1 几丁质酶的最适温度为 40 °C。随着温度的升高, 酶活力迅速降低, 在高于 43 °C 的时酶活力缓慢下降。

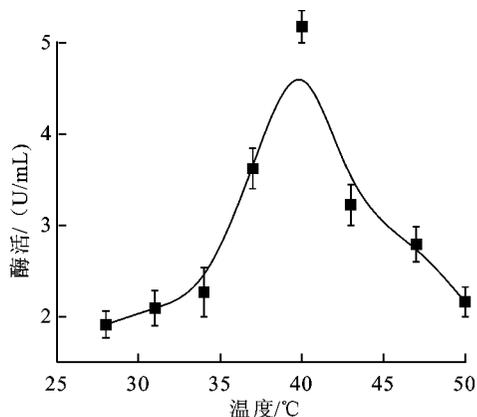


图 1 温度对几丁质酶活性的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the activity of chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1

### 2.2 几丁质酶的最适 pH 值的测定

在不同 pH 值下检测几丁质酶活力, 几丁质酶在不同 pH 值状态下的活性见图 2。SYBG-H1 所产几丁质酶的 pH 值活性范围较广, 在所测 3.5~9.0 范围内都有活性。最适 pH 值为 6.5。几丁质酶在不同的氢离子浓度下的解离程度不同, 其高级结构中 S—S 键、疏水键及氢键受到影响, 从而影响几丁质酶构像的变化而表现出不同的活性。微生物几丁质酶一般 pH 值在 3~11 范围内都有不同程度的酶活, 最适 pH 值大都在 6~7<sup>[6]</sup>。

### 2.3 温度对几丁质酶稳定性的影响

在不同温度下温浴样品 1 h, 测定几丁质酶剩余酶活, 结果见图 3。几丁质酶在 45 °C 下比较稳定, 超过 45 °C 稳定性开始下降, 55 °C 以上迅速下降。说明该酶在 55 °C 以上极不稳定。

### 2.4 巯基乙醇对几丁质酶稳定性的影响

巯基乙醇对几丁质酶的稳定性影响结果见图 4。含 50 mmol/L 巯基乙醇的几丁质酶 24 h 后活

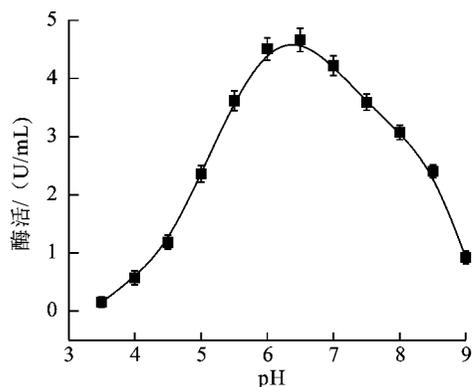


图2 pH值对几丁质酶酶活性的影响

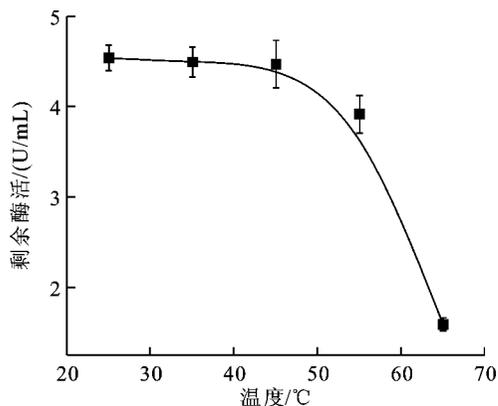
Fig. 2 Effects of pH on the activity of chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1

图3 温度对几丁质酶稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the stability of chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1

力高于实验前没有加入巯基乙醇样本,表明 $\beta$ 巯基乙醇起到了二硫键的还原作用,从而一定程度上恢复了几丁质酶活性,之后酶活开始衰退,其趋势与对照基本一致。120 h后对照样本酶活基本消失,而加有巯基乙醇的酶液酶活仍剩余42%,说明巯基乙醇对维持几丁质酶的稳定性作用明显。

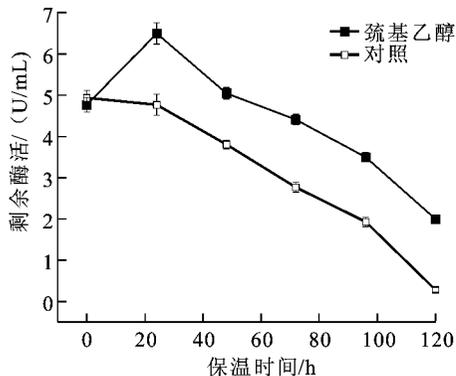


图4 巯基乙醇对几丁质酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of mercaptoethanol on the stability of chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1

## 2.5 EDTA对几丁质酶稳定性的影响

EDTA对几丁质酶的稳定性影响见图5。48 h之前几丁质酶稳定性与对照组相比几乎没有差异,之后对照组残留酶活迅速下降,而有EDTA的样本仍缓慢降低,说明EDTA对几丁质酶的稳定性有一定的作用。

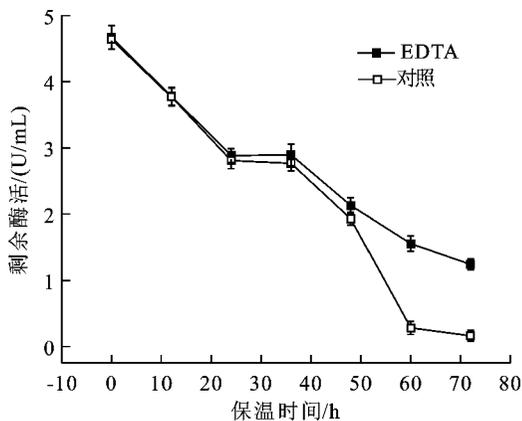


图5 EDTA几丁质酶稳定性的影响

Fig. 5 Effect of EDTA on the stability of chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1

## 2.6 pH值对几丁质酶稳定性的影响

在不同pH值状态下,60 h内几丁质酶的稳定性基本一致,之后,pH值为5时酶的稳定性相对较好,150 h后剩余酶活仍有21%,结果见图6。

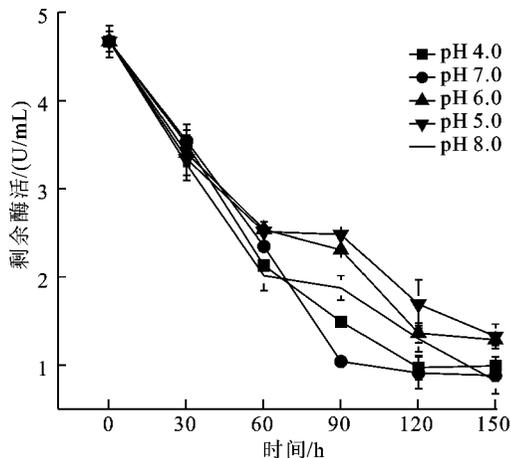


图6 pH对几丁质酶稳定性的影响

Fig. 6 Effect of pH on the stability of chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBC-H1

几丁质酶处于不同的pH值条件下,其蛋白质可解离基团发生不同程度的变化,导致蛋白质的构象发生改变以致影响几丁质酶的稳定性。几丁质酶在不同的氢离子浓度下的解离程度不同,其高级结构中S—S键、疏水键及氢键受到影响,从而影响几丁质酶构象的变化而表现出不同的活性。pH值在3~11范围内,微生物几丁质酶一般都具有不同程度的活性,最适pH值大都在6~7之间,相对

其他几丁质酶<sup>6)</sup>, SYBG-H1 所产几丁质酶的 pH 值活性范围稍小。

### 2.7 金属离子对几丁质酶活性的影响

反应体系中加入不同金属离子, 终浓度为 50 mmol/L, 不加金属离子的样本作对照, 检测其酶活, 结果见图 7。实验表明,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  对几丁质酶有不同程度的抑制作用,  $Na^+$ ,  $K^+$  对几丁质酶有激活作用。

### 2.8 虾皮水解率及水解产物鉴定

pH 值为 6.5, 水解温度 40 °C 条件下水解几丁质 20 h, 过滤烘干水解残留几丁质, 根据公式计算出几丁质水解率为 21.6%。水解产物的 HPLC 分析结果见图 8。结果显示, SYBG-H1 几丁质酶水解虾皮的主要产物是 N-乙酰氨基葡萄糖。

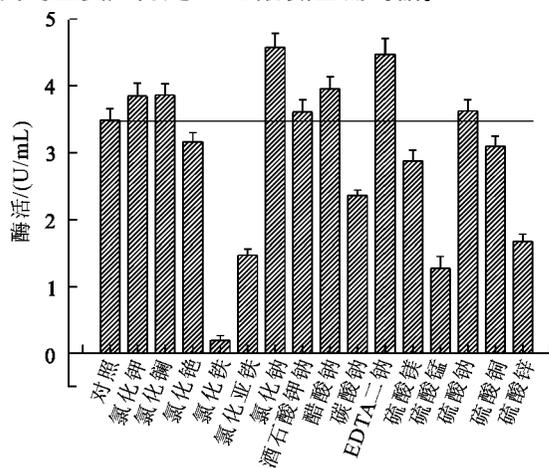


图7 金属离子对几丁质酶活性的影响

Fig.7 Effects of metalion on the activity of chitinase from *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1

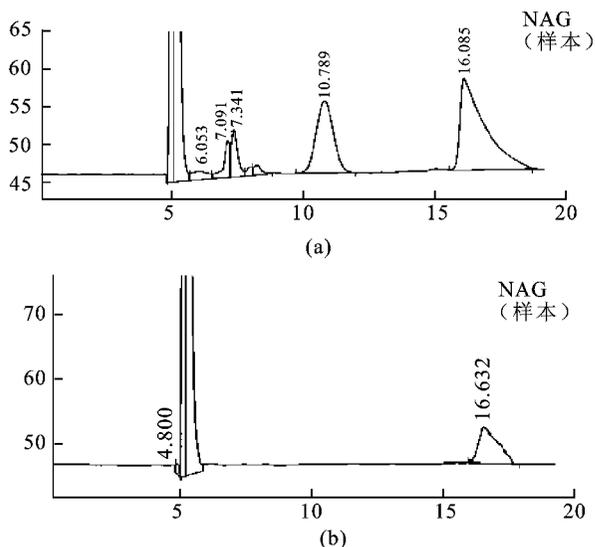


图8 虾皮水解产物样品(a)及N-乙酰氨基葡萄糖标准品(b)

Fig.8 HPLC Chromalogram for sample (a) and stand-ard preparation (b)

## 3 结 语

酶是生物有机体产生的一类特殊的蛋白质, 是生物催化剂。酶蛋白通常有五级结构, 其中有功能的是部分氨基酸残基形成的结构域, 包括底物结合部位和催化部位。首先底物结合部位与底物结合, 再由催化部位作用, 形成过渡态中间体, 然后使底物发生化学变化。本实验结果与资料报道的几丁质酶超过 50 °C 稳定性迅速下降基本一致, 见表 1。

一般认为, 几丁质酶的热稳定性与蛋白质的高级结构有关<sup>[7]</sup>, 受其高级结构中 S—S 键、疏水键及氢键的多寡影响, S—S 键、疏水键及氢键含量越高, 其稳定性越强。因此, 了解该酶的高级结构并设法改造是提高该酶的稳定性的有效手段。温度是影响酶高级结构的重要因素之一, 温度变化导致酶蛋白主链上被氢键所稳定的螺旋或折叠发生变化, 从而影响酶活性。几丁质酶具有多样性的特点, 不同来源的几丁质酶其性质差异显著。微生物所产几丁质酶适应温度的范围较广, 最适温度大多在 40~60 °C<sup>[8-9]</sup>。 *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1 几丁质酶的最适温度为 40 °C, 相对其他微生物所产的几丁质酶的最适温度相对偏低, 这个特点在利用该酶水解几丁质的应用中能够节约能源, 有一定优势。在 50 °C 以下, 一般几丁质酶较为稳定。在 45 °C 以下, *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1 几丁质酶相对其他微生物几丁质酶热稳定性稍差, 但不影响该酶的应用。

$\beta$  巯基乙醇对 *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1 几丁质酶活性及稳定性影响较大, 几丁质酶的高级结构常因二硫键的打开而破坏,  $\beta$  巯基乙醇起到了二硫键的还原作用。此外,  $\beta$  巯基乙醇保护蛋白质中自由的半胱氨酸巯基之间不能错误形成二硫键。可以利用  $\beta$  巯基乙醇的这种特性对 SYBG-H1 产几丁质酶进行改造, 以进一步提高该几丁质酶的性能。

金属阳离子也是影响酶蛋白高级结构的重要因素, 金属阳离子可与球蛋白中不稳定的部分结合, 尤其是与多肽链中弯曲处结合, 因不同程度地改变了蛋白质的立体结构, 从而改变了酶的催化活性, 表现出有的金属离子抑制几丁质酶的活性, 有的促进几丁质酶的活性。  $Na^+$ ,  $K^+$  对 SYBG-H1 所产几丁质酶有显著激活作用, 说明了  $Na^+$ ,  $K^+$  与几丁质酶球蛋白结合后, 其蛋白的立体结构向有利于催化几丁质的构象转化。

表1 *Chitinolyticbacter meiyuanensis* SYBG-H1 几丁质酶性质与其他几丁质酶性质的比较

Tab. 1 Comparison partial property of monofunctional chitinase from microorganisms

名称	最适 温度/ °C	最适 pH	温度 稳定性/ °C	pH 值 稳定性
<i>Chitinolyticbacter meiyuanensis</i> SYBG-H1	40	6.5	≤45	4.0-9.0
<i>Metarhizium anisopliae</i>	55	6.0	≤45	3.0-9.5
<i>Issatchenkia terricola</i>	50	7.0	≤50	5.0-9.0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	55	6.0	≤55	4.0-9.0
<i>Nomuraea rileyi</i>	50	6.0	≤40	5.5-6.5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	45	7.0	≤50	4.0-7.0
<i>Bacillus brevis</i> No. G1	60	8.0	≤40	6.0-10.0
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	55	4.5	≤60	3.0-9.0

## 参考文献(References):

- [1] Ruggiero A, Tricarico L, Olabi A, Weld-bead profile and costs optimisation of the CO<sub>2</sub> dissimilar laser welding process of low carbon steel and austenitic steel AISI316[J]. **Optics & Laser Technology**, 2010, 43: 82- 90.
- [2] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1974.
- [3] Sato K, Kato Y, Taguchi G. *Chitinophilus shinanonensis* gen. nov., sp nov., a novel chitin-degrading bacterium belonging to *Betaproteobacteria*[J]. **Journal of General and Applied Microbiology**, 2009, 55(2): 147- 153.
- [4] Woo C J, Yun U J, H D P. Isolation of chitin-utilizing bacterium and production of its extracellular chitinase[J]. **J Microbiol Biotechnol**, 1996, 6: 439- 444.
- [5] 王治伟, 刘志敏. 微生物几丁质酶研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 439- 442.  
WANG Zh+wei, LIU Zh+min. Advance in study and application on chitinase produced by microbes[J]. **Letters in Biotechnology**, 2006, 17(13): 439- 442. (in Chinese)
- [6] 陈明, 孙昌魁, 程剑锋, 等. 黏质沙雷氏菌 L15-2 几丁质酶的分离纯化与性质研究[J]. 生物加工过程, 2006, 4(2): 15- 19.  
CHEN Ming, SUN Chang-kui, CHENG Jian-feng, et al. Research on isolation and purification of chitinase produced by bacterium L 15-2 and its properties[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2006, 4(2): 15- 19. (in Chinese)
- [7] 李静, 刘建军, 赵祥颖. 微生物几丁质酶的研究概况[J]. 山东食品发酵, 2006, 1: 6- 8.  
LI Jing, LIU Jian-jun, ZHAO Xiang-ying. Development on chitinase of microbes[J]. **Shandong Food Fermentation**, 2006, 1: 6- 8. (in Chinese)
- [8] 吕淑霞, 于晓丹, 张彩霞, 等. 发酵条件对木霉菌株 T23 的菌丝生长及几丁质酶活性的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2003, 36(3): 332- 335.  
LU Shu-xia, YU Xiao-dan, ZHANG Cai-xia, et al. Influence of fermentation conditions on hyphae growth and chitinase activity of *Trichoderma* Strain of T23[J]. **Journal of Shenyang Agricultural University**, 2005, 36(3): 332- 335. (in Chinese)
- [9] 杨革, 陈洪章, 李佐虎. 绿僵菌几丁质酶的分离纯化及性质[J]. 化工学报, 2005, 56(4): 672- 676.  
YANG Ge, CHEN Hong-zhang, LI Zuo-hu. Purification and properties of chitinase from *Metarhizium anisopliae*[J]. **Journal of Chemical Industry and Engineering (China)**, 2005, 56(4): 672- 676. (in Chinese)