

产几丁质酶菌株 SWCH-6 的筛选、鉴定及其 产酶条件的优化研究

王海东 陈 彪 伦镜盛 王 成 胡 忠*

(汕头大学生物系 汕头 515063)

摘要: 从汕头海湾养殖区域的海底沉积物中分离到 1 株几丁质酶活性较高的菌株, 命名为 SWCH-6, 根据菌株的形态特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列, 确定该菌株为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophilla*)。采用单因素优化方法结合正交实验, 得到菌株 SWCH-6 产几丁质酶的最佳发酵条件: 胶体几丁质 25.0 g/L, 胰蛋白胨 10.0 g/L, 陈海水 1.0 L, pH 8.5, 32℃, 150 r/min 培养 72 h; 在该条件下酶活力达 0.39 U/mL。此外, 菌株所产几丁质酶的最适催化 pH 5.0; 最适催化温度为 40℃; Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 及表面活性剂 Tween-80 能增强该酶的催化活性; Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 及表面活性剂 SDS、洗衣粉对该酶的催化活性有抑制作用, 与其它几丁质酶存在着一些不同。

关键词: 几丁质酶, 嗜水气单胞菌, 优化

Screening, Identification of a Chitinolytic Bacterium Strain SWCH-6 and Its Optimal Chitinase Fermentation Conditions

WANG Hai-Dong CHEN Biao LUN Jing-Sheng WANG Cheng HU Zhong*

(Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063)

Abstract: A bacterium, having high chitinolytic activity, was isolated from sediment of Shantou Bay, named SWCH-6. According to its physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence, it was identified as *Aeromonas hydrophilla*. The optimal chitinase fermentation conditions of strain SWCH-6 were conformed by single-factor experiments and orthogonal experiments, they were colloidal chitin 25.0 g/L, tryptone 10.0 g/L, seawater 1 L, pH 8.5, 32℃, 150 r/min for 72 h. In these conditions, its chitinase activity reached 0.39 U/mL. In addition, at 40℃ and pH 5.0, its chitinase performed the highest catalytic activity and its chitinase activity could be enhanced by Cu^{2+} , Fe^{3+} and surfactant toween-80; weakened by Zn^{2+} , Mn^{2+} and surfactants SDS, detergent powder, and there were some differences from other chitinases.

Keywords: Chitinase, *Aeromonas hydrophilla*, Optimization

几丁质 (Chitin) 又称甲壳素、甲壳质, 是以 β -1,4-N-乙酰-D-氨基葡萄糖为基本单位的直链多聚物, 其含量在自然界中仅次于纤维素居第二位, 地

球上每年都会产生大量的几丁质, 产生的同时被微生物迅速降解^[1]。1905 年, Benecke 首次发现能够降解几丁质的贝内克氏菌 (*Beneckea chitinovora*)^[2], 随

后,人们相继发现许多细菌、放线菌、真菌都可以产生几丁质酶降解几丁质作为能量来源,并且,在病毒、植物、动物中也发现了几丁质酶^[3-6]。

几丁质酶(Chitinase EC3.2.1.14)是一种专一性降解几丁质的酶类,可以把几丁质降解为几丁单糖或几丁寡糖。根据几丁质酶氨基酸序列的同源性,将其分为18和19两个家族。其中,18家族几丁质酶广泛存在于病毒、微生物、植物和动物中,而19家族几丁质酶主要存在于植物中。另外,在链霉菌属和一些拟诺卡氏菌属的放线菌中,唐菖蒲伯克霍尔德氏菌和气单胞菌10S-2株中也发现了19家族几丁质酶,绝大多数的微生物19家族几丁质酶和植物的19家族几丁质酶在催化区有很高的同源性^[7-10]。

几丁质酶在多个领域有着广阔的应用前景。几丁质酶降解几丁质得到的中间产物被广泛的应用于医药、食品、化妆品、饲料和造纸等多个行业。目前,几丁质酶的重点研究领域在于筛选产酶量高,适合规模化生产的菌株,寻找合适的发酵工艺,构建几丁质酶表达系统应用于农作物病虫害的生物防治等方面,并且,已经成功的获得了一批几丁质酶转基因抗病农作物:烟草^[3]、大豆^[11]、棉花、水稻和玉米^[12]等。

本实验旨在寻找几丁质酶活力较高的菌株,实验室分离的1株高产几丁质酶菌株SWCH-6为嗜水气单胞菌,由于该菌是一种病原菌,对水产动物、畜禽和人都有致病性,所以,国内外对该菌的研究主要集中在其致病机理和防治方面,对其几丁质酶的研究国外已有相关的报道,而国内还较少见。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验室2006年12月在广东省汕头市汕头海湾养殖区采集的9份海底沉积物样品。

1.2 试剂

几丁质粉 Chitin(C₈H₁₃NO₅)_n, 胰蛋白胨(tryptone)购自广州威佳科技有限公司,其它均为国产分析纯试剂。

1.3 培养基

1.3.1 筛选培养基: 胶体几丁质 3.0 g/L, 胰蛋白胨 5.0 g/L, 琼脂 15.0 g/L, 陈海水 1.0 L, pH 7.0。

1.3.2 条件优化基础培养基: 胶体几丁质 3.0 g/L, 胰蛋白胨 3.0 g/L, 陈海水 1.0 L, pH 7.0, 50 mL 三角

瓶分装 20 mL 培养基。

1.3.3 2216E 培养基: 胰蛋白胨 5.0 g/L, 酵母提取物 1.0 g/mL, 18.6 g/L 的 K₂HPO₄ 溶液 4.0 mL, 1.0 g/L 的 Fe₂(SO₄)₃ 溶液 2.0 mL, pH 7.6~pH 7.8。

1.4 胶体几丁质溶液的制备

称取 10.0 g 几丁质粉加 176 mL 浓盐酸, 搅拌均匀, 4 ℃ 静置 24 h, 加去离子水 1.0 L, 9000 r/min 离心 5 min, 取沉淀, 去离子水反复洗至中性, 最后用陈海水溶解, 配制成浓度为 25.0 g/L 的胶体几丁质溶液, 1.05 MPa 灭菌 20 min, 室温保存备用^[13]。

1.5 DNS 溶液的配制

称取酒石酸钾钠 182.0 g, 加 500 mL 蒸馏水, 加热(50 ℃ 左右), 加入 3, 5-二硝基水杨酸(DNS) 6.3 g, 氢氧化钠 21.0 g, 苯酚 5.0 g, 搅拌至完全溶解, 冷却后加蒸馏水至 1.0 L, 放置 7 d 后使用。

1.6 菌株筛选方法

取 10.0 g 海底沉积物样品, 加入到含有玻璃珠和 100 mL 无菌水的 250 mL 摇瓶中, 25 ℃, 150 r/min, 3 h, 静置 30 min, 取上清液, 适当稀释, 取 0.1 mL 涂布平板, 25 ℃ 培养 4 d~7 d, 挑取产生透明圈比较明显的菌株。

1.7 菌种鉴定

1.7.1 生理生化实验: 按照伯杰氏手册和致病性嗜水气单胞菌检验方法的国家标准进行^[14, 15]。

1.7.2 Biolog 细菌鉴定系统鉴定: 按操作手册进行。

1.7.3 菌株 16S rDNA 鉴定: 基因序列的扩增采用细菌通用引物: 27F: 5'-AGAGTTTGATC(C/A)TG GCTCAG-3', 1492R: 5'-TACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT-3' 反应条件为: 95 ℃ 预变性 10 min; 94 ℃ 变性 1 min, 50 ℃ 复性 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。得到的 16S rDNA 基因片段, 连接 pUC-Tm 载体, 转化 DH5α 菌株, 由英骏生物技术有限公司(广州)测序, 提交 NCBI 数据库对比鉴定。

1.8 酶活力测定方法

取发酵液, 3000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 取 1.0 mL, 加入 1.0 mL 用磷酸缓冲液(pH 7.0)配制的 1.0% 胶体几丁质, 50 ℃ 水浴 30 min, 加 DNS 试剂 2.0 mL, 沸水浴 10 min, 迅速冷却至室温, 3000 r/min 离心 10 min。测定 OD₅₄₀, 跟据 N-乙酰-D-氨基葡萄糖标准曲线计算酶活力^[16-18]。

酶活单位定义(U): 在最适条件下, 1 min 催化产

生相当于 1 μmol 的 N-乙酰-D-氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量。

1.9 正交实验设计

实验采用 $L_9(3^4)$ 正交表, 4 个因素及其 3 个水平分别为: A: 胶体几丁质 15.0 g/L、20.0 g/L 和 25.0 g/L; B: 胰蛋白胨 10.0 g/L、15.0 g/L 和 20.0 g/L; C: pH 值 8.5、9.0 和 9.5; D: 温度 29、32 和 35。实验结果采用正交实验助手进行分析。

2 结果与分析

2.1 产酶菌株的筛选与鉴定

本实验分离到产透明圈较大的菌株 69 株, 选取产生透明圈最大、最稳定的一株命名为 SWCH-6, 其菌落呈圆形, 淡黄白色, 半透明, 中央凸起, 边缘整齐, 表面光滑湿润, 有淡淡的香味, 易于挑起(图 1)。用分析型扫描电镜观察, 该菌株呈短杆状, 大小在 1.5 μm 左右(图 2)。

菌株 SWCH-6 经过 Biolog 细菌鉴定系统鉴定与基因型嗜水气单胞菌最为接近, 其 16S rDNA 基

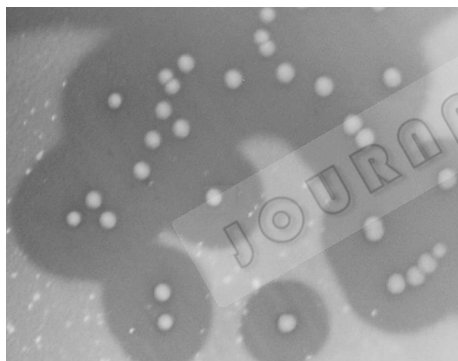


图 1 菌株 SWCH-6 的菌落形态及透明圈
Fig. 1 Colony shape and clear zones of SWCH-6

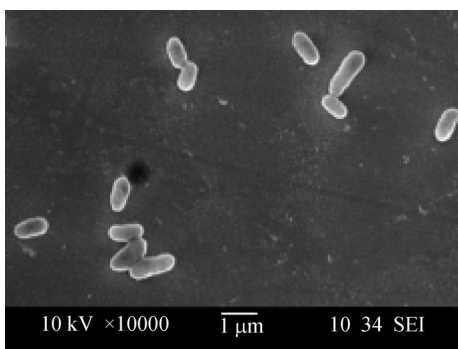


图 2 菌株 SWCH-6 在分析型扫描电镜下的形态
Fig. 2 Shape of SWCH-6 observed by analytical scanning electron microscope

因序列与嗜水气单胞菌的 16S rDNA 序列相似性达到 99%, 同时, 综合菌株的生理生化特征(表 1), 参照伯杰氏手册^[14]和致病性嗜水气单胞菌检验方法的国家标准^[15]确定该菌株为嗜水气单胞菌。

表 1 菌株 SWCH-6 的生理生化特征
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain SWCH-6

生理生化特征检测 Tests of physiological and biochemical characteristics	结果 Results	标准结果 Standard results
Gram stain	-	-
Indole test	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Glucose fermentation	+	+
Salicylaldehyde glycosides fermentation	+	+
Sucrose fermentation	+	+
Arab sugar fermentation	+	+
Aescinate glycosides fermentation	+	+
V-P	+	+

+: Positive reaction; -: Negative reaction

2.2 菌株 SWCH-6 几丁质酶发酵条件优化

实验采用单因素优化方法结合正交实验对菌株 SWCH-6 产酶的最佳碳源、氮源、起始 pH、温度和接种量等进行了优化研究, 每个实验 3 次平行。

挑取在 2216E 固体平板上活化的菌株 SWCH-6 的单菌落, 接种液体 2216E 培养基, 150 r/min, 37 培养 18 h, 2.0% 接种量重新接种新鲜培养基继续培养 8 h, 用做产酶条件优化的菌种。

实验发现接种量在 1.0%~5.0% 之间对菌株 SWCH-6 的产酶没有明显的影响, 所以, 后续研究接种量均按常规的 2.0%。

2.2.1 培养时间对产酶的影响及生长曲线: 接种基础培养基, 25, 150 r/min 培养, 从 36 h 开始, 每隔 12 h 取样品测酶活力, 涂平板计算活菌密度。由生长曲线可以看出菌株 SWCH-6 在 60 h 时密度达到最大值, 进入了稳定期, 而酶活力在 72 h 时才达到峰值, 表现出了滞后性; 随着培养时间的延长活菌密度迅速降低, 酶活力也相应的下降(图 3)。

2.2.2 培养温度对产酶的影响: 接种基础培养基, 分别在 22、27、32、37 和 42, 150 r/min 培养 72 h, 检测酶活。由图 4 可以看出, 菌株 SWCH-6 的最佳产酶温度为 32, 培养温度升高, 产酶量迅速降低, 表明菌株适合较低温度的产酶环境。

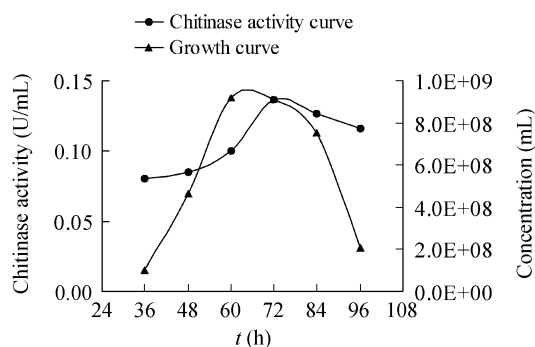


图3 培养时间对菌株 SWCH-6 产酶的影响及生长曲线
Fig. 3 Growth curve and effect of time on chitinase production

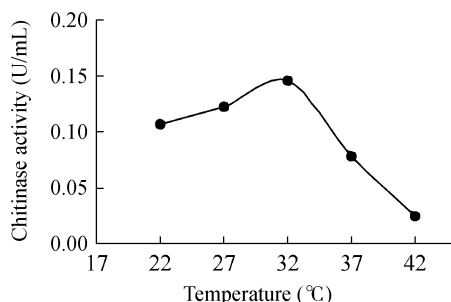


图4 培养温度对菌株 SWCH-6 产酶的影响
Fig. 4 Effect of temperature on chitinase production

2.2.3 起始 pH 值对产酶的影响: 接种 pH 分别为 8.0、8.5、9.0、9.5 和 10.0 的基础培养基, 32 ℃, 150 r/min 培养 72 h, 检测酶活。发现菌株 SWCH-6 在起始 pH 9.0 时酶活力最高, pH 10.0 时菌株依然能够产生大量的几丁质酶, 说明菌株比较适合碱性的产酶环境, 这可能与分离环境汕头海湾水域海水偏碱性(pH 8.0)有关(图 5)。

2.2.4 培养基装量对产酶的影响: 摇瓶中分别装与其体积比为 30%、40%、50%、60% 和 70% 的基础培养基, pH 9.0, 接种, 32 ℃, 150 r/min 培养 72 h, 检测酶活。发现培养基装量对菌株 SWCH-6 的产酶活力没有显著的影响, 在培养基装量为 40% 时的酶活力相对较高, 说明菌株在供氧充足和不充足的条件下均能很好的产酶(图 6)。

2.2.5 不同碳源对产酶的影响: 接种分别以胶体几丁质、粉末几丁质、羧甲基纤维素(CMC)、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、壳聚糖为碳源(浓度 3.0 g/L)的基础培养基, pH 9.0, 32 ℃, 150 r/min 培养 72 h, 检测酶活。由图 7 可以看出胶体几丁质是菌株 SWCH-6 较好的产酶碳源, 粉末几丁质和壳聚糖虽然也是几丁质, 但不如胶体几丁质在溶液中分散均匀, 不易

于诱导产生几丁质酶, 羧甲基纤维素和羧甲基纤维素钠基本上不能诱导产生几丁质酶, 说明菌株 SWCH-6 的几丁质酶底物特异性较强, 不具备纤维素酶活性。

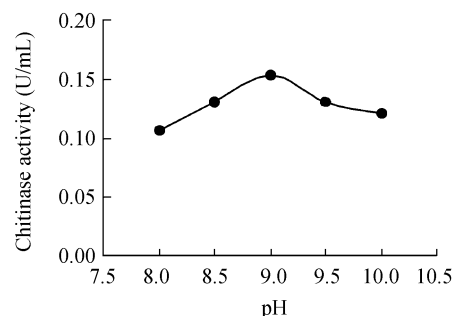


图5 起始 pH 值对菌株 SWCH-6 产酶的影响
Fig. 5 Effect of pH on chitinase production

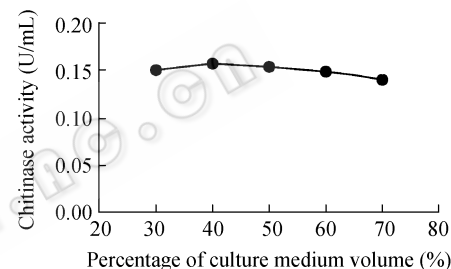


图6 培养基装量对菌株 SWCH-6 产酶的影响
Fig. 6 Effect of culture medium volume on chitinase production

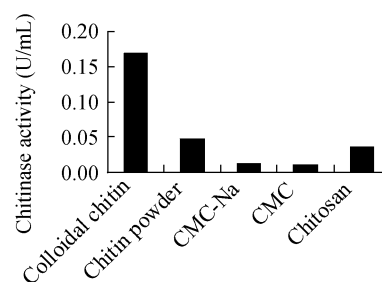


图7 不同碳源对菌株 SWCH-6 产酶的影响
Fig. 7 Effect of different carbon sources on chitinase production

2.2.6 不同氮源对产酶的影响: 接种分别以有机氮源酵母粉、胰蛋白胍和牛肉膏, 无机氮源硫酸铵、硝酸铵和尿素(浓度 3.0 g/L)为氮源的基础培养基, pH 9.0, 32 ℃, 150 r/min 培养 72 h, 检测酶活。发现胰蛋白胍是菌株 SWCH-6 较好的产酶氮源, 可能是因为胰蛋白胍这种有机氮源更容易被利用缘故; 另外, 尿素是比较好的无机氮源(图 8)。

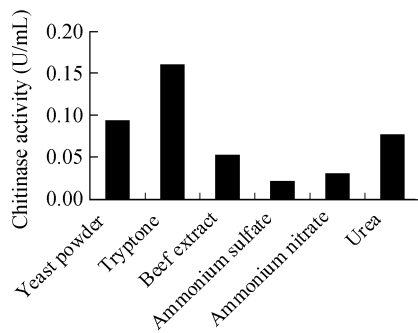


图 8 不同氮源对菌株 SWCH-6 产酶的影响

Fig. 8 Effect of different nitrogen sources on chitinase production

2.3 菌株 SWCH-6 的几丁质酶性质

2.3.1 最适催化温度: 1.0 mL 粗酶液, 加 1.0 mL 的 1.0% 的胶体几丁质, 分别在 4、30、40、50、60 和 70 反应 30 min, 检测酶活。结果显示酶的最适催化温度为 40, 随着温度的升高酶活力迅速下降(图 9)。

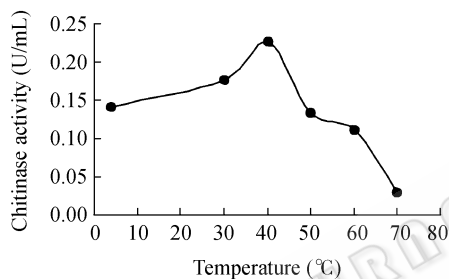


图 9 温度对菌株 SWCH-6 几丁质酶活力的影响

Fig. 9 Effect of temperature on chitinase activity

2.3.2 最适催化 pH: pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 的粗酶液 1.0 mL, 加入 1.0 mL 相应 pH 的 1.0% 胶体几丁质, 40 水浴 30 min, 检测酶活。发现酶的最适催化 pH 5.0, 在 pH 4.0~pH 8.0 范围内酶活力比较稳定, 不适合太酸或太碱的催化环境(图 10)。

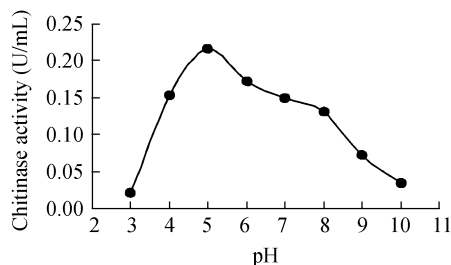


图 10 pH 对菌株 SWCH-6 几丁质酶活力的影响

Fig. 10 Effect of pH on chitinase activity

2.3.3 金属离子对酶活性的影响: 1.0 mL 的粗酶液分别添加终浓度为 1 mmol/L 的 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} , 加入 1.0 mL pH 5.0 的 1.0% 胶体几丁质溶液, 40 水浴 30 min, 检测酶活。数据显示 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 可以提高酶的催化活力, 其中 Cu^{2+} 最明显; Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 对粗酶的催化活性有抑制作用, 其中 Mn^{2+} 比较明显; Ba^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活力没有明显的影响(图 11)。

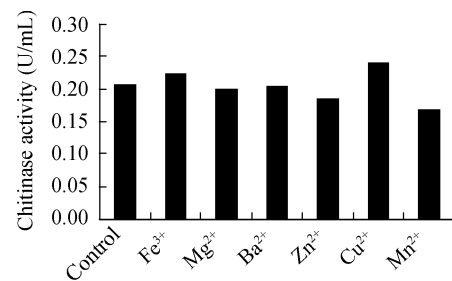


图 11 金属离子对酶催化活性的影响

Fig. 11 Effect of metal ions on chitinase activity

2.3.4 表面活性剂对酶活性的影响: 1.0 mL 的粗酶液分别添加终浓度为 0.2 g/L 的洗衣粉、Tween-20、Tween-80、SDS 和 Triton X-100, 加入 1.0 mL pH 5.0 的 1.0% 胶体几丁质溶液, 40 水浴 30 min, 检测酶活。由图 12 可以看出 Tween-80 可以微弱的提高酶催化活性; Tween-20 和 Triton-100 对酶催化活性没有明显的影响; SDS 和洗衣粉对酶催化活性有微弱的抑制作用。

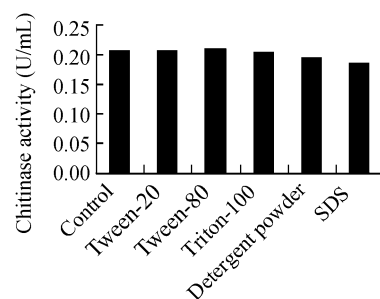


图 12 表面活性剂对粗酶催化活性的影响

Fig. 12 Effect of Surfactants on chitinase activity

2.4 正交实验

在单因素优化实验结果的基础上, 设计了 $L_9(3^4)$ 正交实验对最适产酶碳源胶体几丁质、氮源胰蛋白胨、起始 pH 和温度之间的交互作用做了进一步的研究。由于实验发现胶体几丁质和胰蛋白胨的浓度

越大,几丁质酶活力也会越高,但培养基也会变得越粘稠,不再适合摇瓶发酵,所以,实验选用了比较适中的胶体几丁质和胰蛋白胨浓度来做正交实验。实验得到了最佳的因素水平组合 A3B1C1D3,即胶体几丁质浓度 25.0 g/L,胰蛋白胨浓度 10.0 g/L, pH 8.5, 温度 35 ;R 值 A>D>B>C,则 A 为最显著因素,即胶体几丁质浓度对菌株 SWCH-6 产酶的影响最明显(表 2)。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果
Table 2 Results of orthogonal experiment $L_9(3^4)$

实验编号 Experiment No.	因素 A Factor A	因素 B Factor B	因素 C Factor C	因素 D Factor D	酶活 Chitinase activity (U/mL)
M1	1	1	1	1	0.16
M2	1	2	2	2	0.15
M3	1	3	3	3	0.17
M4	2	1	2	3	0.29
M5	2	2	3	1	0.19
M6	2	3	1	2	0.22
M7	3	1	3	2	0.31
M8	3	2	1	3	0.33
M9	3	3	2	1	0.26
	0.160	0.253	0.237	0.203	
	0.233	0.223	0.233	0.227	
	0.300	0.217	0.223	0.263	
R	0.140	0.036	0.014	0.060	

以菌株 SWCH-6 最佳的产酶条件发酵几丁质酶,即胶体几丁质 25.0 g/L,胰蛋白胨 10.0 g/L,陈海水 1.0 L, pH 8.5, 32 , 150 r/min 培养 72 h。取 1.0 mL 粗酶液加入 1.0 mL pH 5.0 的 1.0% 胶体几丁质溶液, 40 水浴 30 min, 检测酶活力达到 0.39 U/mL。

3 讨论

目前,报道的产几丁质酶菌株的酶活力高低各不相同,且由于测定酶活力的方法、选用的底物、酶活单位的定义和酶活力的表示方式等方面存在着比较大的差别,给菌株之间酶活力大小的比较带来不便。丁秀琼和李静等人曾分别对一株气单胞菌、一株细菌 C4^[19]和一株放线菌^[20]做了产几丁质酶条件优化的相关研究,换算后酶活力分别为 0.062 U/mL、0.099 U/mL 和 1.06 U/mL,不同的菌株酶活力的差别比较大。菌株 SWCH-6 的几丁质酶活力优化后可达到 0.39 U/mL,属于酶活力比较高的菌株。

一般情况下,几丁质酶对热比较稳定,在 4 ~ 60 之间都具有酶活性,激烈热球菌的几丁质酶在

100 时仍然能正常进行水解反应^[21],但大多数微生物几丁质酶的最适反应温度为 40 ~50 之间。菌株 SWCH-6 的几丁质酶最适催化温度为 40 ,伴随着温度的升高酶活力会迅速下降,属于不耐热的几丁质酶。

几丁质酶最适催化 pH 值的范围很大,一般在 pH 3.0~pH 11.0 之间,但绝大多数微生物几丁质酶最适催化 pH 值为 pH 4.0~pH 6.0 的偏酸环境,在 pH 3.0~pH 11.0 时通常都比较稳定。菌株 SWCH-6 的几丁质酶最适催化 pH 5.0,属于酸性几丁质酶,酶活力在 pH 4.0~pH 8.0 范围内比较稳定,具备一般几丁质酶的特点。

几丁质酶的活性还受到环境中金属离子的影响,如 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 等对几丁质酶活力都有不同程度的影响,几丁质酶的来源不同其抑制或激活的作用也不尽相同。一般情况下,如 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶的活性有较大的抑制作用,而 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 则有一定的激活作用^[22]。菌株 SWCH-6 的几丁质酶活力能够被 Fe^{3+} 所激活,被 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 所抑制, Mg^{2+} 对酶活力没有明显的影响,与一般几丁质酶存在着一定的差别。

几丁质酶一般都是诱导酶,它的产生往往需要几丁质或几丁质衍生物等底物的诱导,受葡萄糖和几丁质降解产物的抑制,菌株 SWCH-6 也是一样。但也有例外,如拟诺卡氏菌(*Nocardopsis prasina*) OPC-131 株表达几丁质酶的过程并不受葡萄糖的抑制。

国外对嗜水气单胞菌几丁质酶系编码基因也做过相应的探索, Mike 和 Fumio 等就曾分别对其一段 3 kb 左右的几丁质酶编码基因做过报道。在国内,厦门大学的肖湘等对一株豚鼠气单胞菌株 CB101 做了比较深入的研究^[23-30]。

本实验筛选到几丁质酶活力较高的嗜水气单胞菌株 SWCH-6,优化确定了其最佳的产酶条件,并对其几丁质酶的性质做了初步的研究,为下一步系统的研究其几丁质酶系及其编码基因做好了准备工作。

参考文献

- [1] Cottrell MT, Moore TA, Kirchman DL. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, 65(6): 2553-2557.
- [2] Benecke U. *Bacillus chitinovor* eien chitin zersetzenden spaltpilz. *Bot Ztg*, 1995, 63: 22.
- [3] Vierheilig M, Alt JM, Neuhaus T, et al. Colonization of

- transgenic *Nicotiana sylvestris* plant expressing different forms of *Nicotiana tobaccum* chitinase, by the root pathogen *Rhizoctonia solani* and by the mycorrhizal symbiont *Gomus mosseae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 1993, **6**(2): 261.
- [4] Benhamou NK, Chet BI, Broglie R. Cytology of infection of 35S bean chitinase transgenic canola plants by *Rhizoctonia solani*: cytochemical aspects of chitin breakdown *in vivo*. *Plant J*, 1993, **4**: 295.
- [5] Zhu Q, Maher EA, Masoud S, *et al*. Enhanced protection against fungal attack by constitutive expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio Technology*, 1994, **12**: 807.
- [6] Hiramatsu S, Fujie M, Usanfi S, *et al*. Two catalytic domains of chlorella virus CVR2 chitinase. *Journal of Bio-science and Bioengineering*, 2000, **89**(3): 252–257.
- [7] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1991, **280**: 309.
- [8] Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J*, 1993, **316**: 695.
- [9] Yousuke Y, Katsuichiro O. Purification and antifungal activity of recombinant chitinase from *Escherichia coli* carrying the family 19 chitinase gene of *Streptomyces* sp. J-13-3. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68**(10): 2193.
- [10] Mitsuhiro Ueda, Miki Kojima, Tomoye Yoshikawa. A novel type of family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24 Cloning, sequence, expression and the enzymatic properties. *Biochem*, 2003, **270**, 2513–2520.
- [11] Benhamou NK, Broglie I Chet, R Broglie . Cytology of infection of 35S-bean chitinase transgenic canola plants by *Rhizoctonia solani* : cytochemical aspects of chitin breakdown *in vivo*. *Plant J*, 1993, **4**: 295–305.
- [12] Zhu Q, Maller EA, Masoud S, *et al*. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio Technology*, 1994, **12**: 807–812.
- [13] Kang SC, Park S, Lee DG. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1999, **73**: 276–281.
- [14] Holt JG. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994, pp. 190–255.
- [15] GB/ T18652 - 2002. 致病性嗜水气单胞菌检验方法.
- [16] Antonio R, Utrich M, Roland B, *et al*. Chitinases of *streptomycesolivaceoviridis* and significance of processing for multiplicity. *J Bacteriol*, 1992, **174**(11): 3450–3459.
- [17] Masaru M, Akira O, Tamo F, *et al*. Action pattern of *Aeromonas hydrophila* chitinase on partially N-acetylated chitosan. *Agric Bio Chem*, 1990, **54**(4): 871–877.
- [18] Yamasaki Y, Hayashi I, Ohta Y, *et al*. Purification and mode of action of chitosanolytic enzyme from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, **57**(3): 444–449.
- [19] 丁秀琼, 张 莉, 刘世贵, 等. 几丁质酶产生菌 C4 发酵培养基优及其对 Bt 的增效作用研究. 四川大学学报, 2007, **44**(2): 425–429.
- [20] 李 静, 刘建军, 赵祥颖. 一株产几丁质酶菌株的筛选及其产酶条件的研究. 工业微生物, 2007, **37**(3): 44–47.
- [21] Jaques AK, Tamo F. Disruption of the gene encoding the Chib1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. *Microbiology*, 2003, **149**: 2931.
- [22] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1991, **280**: 309.
- [23] 肖 湘, 周 樱, 王凤平, 等. 高效几丁质降解菌 CB101 的分离鉴定及其几丁质酶系的研究. 海洋学报, 2003, **25**(1): 138–142.
- [24] Xiqian Lan, Xin Zhang, Makoto Shimosaka, *et al*. Cloning, Expression, and Characterization of a Chitinase from the Chitinolytic Bacterium *Aeromonas hydrophila* Strain SUWA-9. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, **70**(10): 2437–2442.
- [25] Mike K, Nagamatsu A, Shioya M, *et al*. Purification, characterization, and gene cloning of 46kD chitinase (Chi46) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its expression in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**: 294–301.
- [26] Wang SL, Chang WT. Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and shell powder medium. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, **63**(2): 380–386.
- [27] Tanaka T, Fujiwara S, Nishiori S, *et al*. A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the *hyperthermophilic archaeon pyrococcus kodakarensis* KOD1. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, **65**(12): 5338–5344.
- [28] Chen Jenpin, Fumio N, Chang Mingchung. Cloning and expression of a chitinase gene from *Aeromonas hydrophila* in *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, 1991, **57**(8): 2426–2428.
- [29] Wu Meili, Chuang Yinchang, Chen Jenpin. Identification and characterization of the three chitin-binding domains within the multidomain chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* JP101. *Applied Environmental Microbiology*, 2001, **67**(11): 5100–5106.
- [30] Li Qiang, Wang Fengping, Zhou Ying. Putative exposed aromatic and hydroxyl residues on the surface of the N-terminal domains of Chi1 from *Aeromonas caviae* CB101 are essential for chitin binding and hydrolysis. *Applied Environmental Microbiology*, 2005, **71**(11): 7559–7561.