

腐皮镰孢菌壳聚糖酶的酶学性质研究及其在酿酒酵母工业菌株中的表达

刘怀伟, 鲍晓明*

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要: 【目的】本研究旨在了解腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani*) 壳聚糖酶的基本酶学性质及其在壳寡糖生产中的应用, 构建能高效分泌表达壳聚糖酶的酿酒酵母工业菌株。【方法】采用 RT-PCR 扩增腐皮镰孢菌壳聚糖酶的 cDNA 序列, 通过组氨酸标签, 纯化得到 *E. coli* 表达的重组壳聚糖酶, 并进行基本酶学性质研究; 以薄层层析、高效液相色谱等技术对该酶的酶解产物进行分析; 通过马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 菊粉酶信号肽 (INU1A) 实现壳聚糖酶在酿酒酵母工业菌株 N-27 中的分泌表达, 得到高效分泌壳聚糖酶的重组工业菌株 N-27C。【结果】所得到的壳聚糖酶 cDNA 序列 (GenBank, EU263917) 含有一个长为 903 bp 的开放阅读框, 编码 300 个氨基酸残基。*E. coli* 重组壳聚糖酶的最适温度为 50°C, 最适 pH 值为 5.6, K_m 值为 0.063 mg/mL, 该酶的水解产物中不含单糖, 10 糖以下组分占 75% 以上。酶活测定结果表明壳聚糖酶基因能在酿酒酵母中分泌表达, 体积酶活达到 50.2 mU/mL。【结论】腐皮镰孢菌壳聚糖酶是一种内切型壳聚糖酶, 在功能性壳寡糖的生产中具有良好的应用前景, 分泌型表达该酶的酿酒酵母工业菌株对于该酶的规模化生产具有潜在用途。

关键词: 壳聚糖酶; 壳寡糖; 腐皮镰孢菌; 酿酒酵母

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 12-1607-06

壳寡糖 (Chitoooligosaccharides) 是一种重要的功能性寡糖, 具有强化免疫、抑制癌细胞、调节生理机能等多种功能, 广泛应用于医药、食品、农业等领域^[1]。壳寡糖主要由壳聚糖 (Chitosan) 水解产生。壳聚糖是氨基葡萄糖的多聚物, 是几丁质 (Chitin) 脱乙酰基的形式^[2], 天然存在于半知菌、接合菌等真菌的细胞壁中。目前, 壳寡糖的制备主要是通过水解从几丁质含量高的蟹壳、虾壳等原料脱乙酰基得到壳聚糖, 常用的方法主要有化学和酶解法。酶解法具有反应条件温和、寡糖得率高、环境污染小等特点, 具有较好的发展前景。壳寡糖的酶法制备又分为专一性酶法和非专一性酶法, 非专一性酶法主要是混合利用各种水解酶类, 包括纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶等, 降

解壳聚糖产生不同聚合度的壳寡糖。但该方法用酶量大, 成本高, 且产物成分组成难以控制。壳聚糖酶 (E.C.3.2.1.132) 是专一性水解壳聚糖生成壳寡糖的酶, 利用壳聚糖酶制备壳寡糖的方法称为壳寡糖的专一性酶法制备。目前已在多种微生物和植物中发现壳聚糖酶, 但由于酶活较低, 产酶量小等特点, 还未有产业化的报道^[3-5]。

前期工作中, 我们筛选到一株壳聚糖酶产生菌—腐皮镰孢菌 (*F. solani*) 0114^[6], 克隆得到了壳聚糖酶的基因组 DNA 序列, 并通过根瘤农杆菌介导转化技术 (ATMT) 实现其在腐皮镰孢菌中的超表达^[7], 但腐皮镰孢菌是一种植物病原菌, 不适合用于壳聚糖酶的规模化生产。在本研究中, 我们克隆了该酶

* 通信作者。Tel : + 86-531-88365826 ; Fax : + 86-531-88365826 ; E-mail : bxm@sdu.edu.cn

作者简介: 刘怀伟 (1980 -) 男, 山东人, 博士研究生, 从事微生物分子生物学研究。E-mail : Huaiwei.liu@Hotmail.com

收稿日期: 2009-08-10 ; 修回日期: 2009-08-27

的 cDNA 序列,并通过组氨酸标签 纯化得到 *E. coli* 表达的重组壳聚糖酶,进行了基本酶学性质研究。在此基础上,利用食品安全的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为受体菌,构建了高效分泌表达壳聚糖酶的酿酒酵母工程菌株。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 腐皮镰孢菌 *F. solani* 0114,酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 工业菌株 N-27 (Qn,野生型),大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3),*E. coli* DH5 α 均为本实验室保存。其中,*E. coli* BL21 (DE3) 为壳聚糖酶 cDNA 大量表达和蛋白纯化的宿主菌,*E. coli* DH5 α 为用

表 1 本研究所用 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')	Objective
P1	ATGCGCGACGTTCCGGCCAAT	Clone the chitinase cDNA from total mRNA of <i>F. solani</i> 0114
P2	GGTGGAGCGCAGCACTTGCCGTTGCT	
EP1	CAGCCATATGCGCGACGTTCCGGCCAATGTCAAGAGC	Express the chitinase cDNA in <i>E. coli</i> DE3
EP2	CAGTGGATCCTCATGGAGCGCAGCACTTGCCGTTGCT	
SP1	CATTGGATCCATGAAGTTCGCATACTCCCTCTTGCTTCC <u>ATTGCCAGGACTGACT</u>	
SP2	<u>GCTCTTGACATTGGCCGGAACGTCGCGTCTCTTGTAAATTGATCA</u> CTGAAGCACTGACTCTCT	Fuse the INUIA signal sequence to the chitinase cDNA and express in <i>S. cerevisiae</i> N-27
SP3	CAGTAGATCTGCTGGAGCGCAGCACTTGCCGTTGCT	

Solid underlines indicate the complementary sequences between SP1 and SP2. Double underline indicates the complementary sequence with the *csn* cDNA.

1.3 腐皮镰孢菌的液体培养

活化及产酶培养参照 Liu^[7]。产酶培养基中 25℃ 培养 65 h 后,6 层纱布过滤收集菌体,DNA 及 RNA 的抽提参照 Garber^[8]和 Ehrenshaft^[9]。

1.4 壳聚糖酶 cDNA 序列的克隆及在 *E. coli* 中的表达、纯化及复性

利用上下游引物 P1、P2,以 *F. solani* 0114 总 RNA 为模板,通过反转录 PCR (RT-PCR) 的方法扩增壳聚糖酶基因 (*csn*) 全长 cDNA 序列,扩增片段与 PMD-20T 载体连接后测序。

以克隆到的 *csn* cDNA 为模板,通过引物 EP1 与 EP2 扩增不含 N 端 19 个氨基酸残基信号肽的 *csn* ORF 片段。扩增片段经 *Nde* I 和 *Bam* H I 双酶切后与 pET-15b 载体连接并转化 *E. coli* BL21 (DE3)。转化子在 LB 液体培养基中 37℃ 培养至对数中期,按 5% 接种量转移至新鲜培养基中,加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h,8000 r/min 离心收集细胞,超声波破碎,得到的包含体溶于溶液 A 中 (8 mol/L 尿素,50 mol/L Tris-HCl,200 mmol/L NaCl,0.1 mmol/L PMSF,1 mmol/L β -巯基乙醇,pH 8.0),变性蛋白经

于质粒构建的宿主菌。

1.1.2 主要试剂:质粒小提试剂盒,购自北京百泰克生物技术有限公司。凝胶回收及 DNA 纯化试剂盒,购自美国 Omega 公司。镍柱填料,购自美国 Invitrogen 公司。AMV 反转录试剂盒购自日本 Takara 公司,引物序列均由上海博亚生物技术有限公司合成。氨基葡萄糖 (Glucosamine),壳三糖 (Chitotriose) 及 85% 脱乙酰度壳聚糖,均购自美国 Sigma 公司。

1.2 PCR 引物

根据 *F. solani* 0114 的壳聚糖酶基因组序列 (EU267671) 及实验目的设计不同的 PCR 引物 (表 1),所有引物均由上海博亚生物技术有限公司合成。

Ni-NTA 纯化系统纯化。

纯化后的蛋白经透析缓慢复性,依次在溶液 B (4 mol/L 尿素,50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.5) 中透析 4 h,溶液 C (2 mol/L 尿素,50 mmol/L 乙酸钠缓冲液,pH 6.5) 中透析 12 h,溶液 D (1 mol/L 尿素,50 mmol/L 乙酸钠缓冲液,pH 5.6) 中透析 12 h,50 mmol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 5.6) 中透析 12 h。

1.5 壳聚糖酶活测定及酶学性质分析

酶活测定参照 Shimosaka^[10]。以 85% 脱乙酰度壳聚糖为底物,反应体系为:浓度为 1 mg/mL 的底物 0.5 mL,酶液 1 mL,0.2 mol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 5.6) 0.5 mL,混匀后 37℃ 反应 15 min,DNS 法测还原糖量。1 酶活单位 (U) 定义为每分钟释放 1 μ mol 还原糖所需的酶量,以氨基葡萄糖作标准曲线。蛋白浓度测定采用 Lowry 法^[11],以牛血清蛋白作标准曲线。酶促反应动力学参数测定采用双倒数作图法 (1/V 对 1/S),以不同浓度的壳聚糖 (0.1 ~ 0.5 mg/mL) 为底物,反应体系参照酶活测定。

1.6 酶解产物分析

壳聚糖的酶解反应体系参照酶活测定,混匀后

50℃ 反应 4 h。产物分析采用高效液相色谱法 (HPLC) 和薄层层析法 (TLC)^[2]。HPLC 法分析时以 TSK-G3000_{pw} 柱分离产物, 示差检测器检测, 以普鲁兰糖和壳五糖为作为分子量标准。薄层层析的标准品为氨基葡萄糖 (Glucosamine) 及壳三糖 (Chitotriose)。

1.7 酿酒酵母表达载体的构建

根据马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*) 菊粉酶

信号肽 (INU1A) 序列^[3], 设计合成两条寡核苷酸单链 SP1 和 SP2 (表 1), 并通过两轮 PCR 过程与壳聚糖酶 cDNA 序列融合 (图 1-A)。融合序列连接酿酒酵母表达质粒 pYMIKP^[4], 重组质粒命名为 pYMIKP-csn (图 1-B)。采用 LiAc 法^[5] 转化酿酒酵母工业菌株 N-27, 在含高浓度 G418 (30 mg/mL) 的 YPED 固体培养基上筛选转化子。

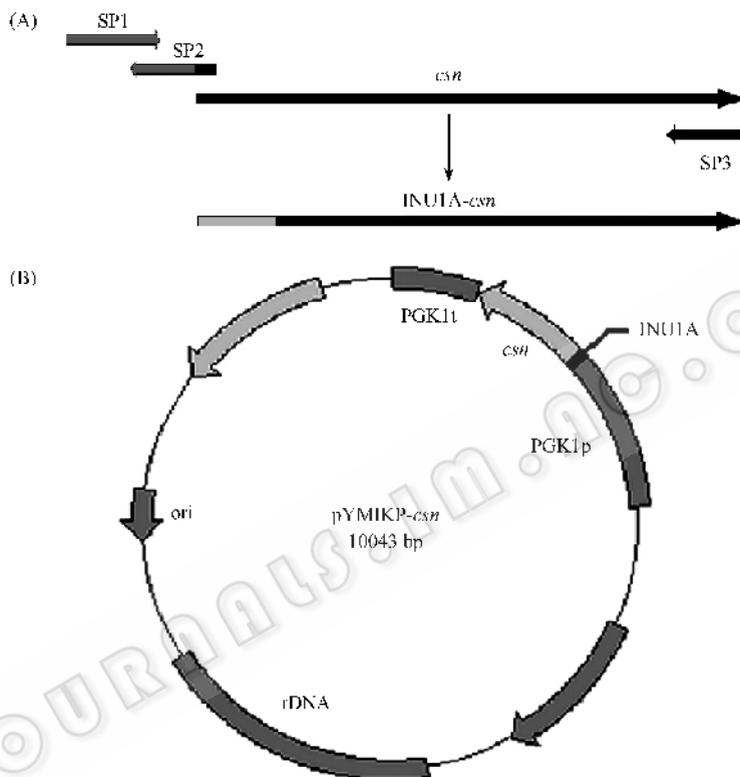


图 1 INU1A 信号肽与壳聚糖酶的融合 (A) 和 pYMIKP-csn 质粒物理图谱 (B)

Fig. 1 The fusion of INU1A signal sequence to csn (A) and physical map of the yeast expression vector pYMIKP-csn (B).

2 结果

2.1 *F. solani* 0114 壳聚糖酶基因 cDNA 的克隆

通过对我们前期克隆到的 *F. solani* 0114 壳聚糖酶基因 DNA 序列 (GenBank, EU267671) 的外显子分析, 根据开放读码框上下游序列设计引物 P1、P2 (表 1)。根据我们前期的酶活研究结果^[6], 提取培养 65 小时的菌体总 RNA, 通过 RT-PCR 克隆得到了该酶的全长 cDNA 片段, 测序结果表明其开放读码框为 903 bp, 编码 300 个氨基酸残基。该序列已并提交至 GenBank, 登录号为 EU263917。将其氨基酸序列与 GenBank 中收录的两个 *F. solani* 壳聚糖酶蛋白序列 (D85388, AB090326) 比对, 同源性分别为 89% 和 92%, 属于种间差异。

2.2 壳聚糖酶基因在 *E. coli* 中的表达

以壳聚糖酶 cDNA 序列为模板, EP1 与 EP2 (表 1) 为引物, 扩增不含自身信号肽的 cDNA 片段, 所得产物与 pET-15b 表达载体连接后转化 *E. coli* BL21 (DE3) 转化子细胞经 IPTG 诱导表达后, 超声破碎, 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析细胞裂解液, 结果表明壳聚糖酶在 *E. coli* 中形成了包含体 (data not shown)。包含体经 8 mol/L 尿素变性, 镍柱纯化及梯度透析复性后, 得到了纯化的壳聚糖酶, SDS-PAGE 分析表明该酶的分子量约 30 kDa (图 2), 酶活测定表明纯酶的比酶活为 2.5 ± 0.1 U/mg。

2.3 壳聚糖酶最适 pH、温度及酶促反应动力学参数测定

pH、温度对壳聚糖酶酶活的影响见图 3。该酶

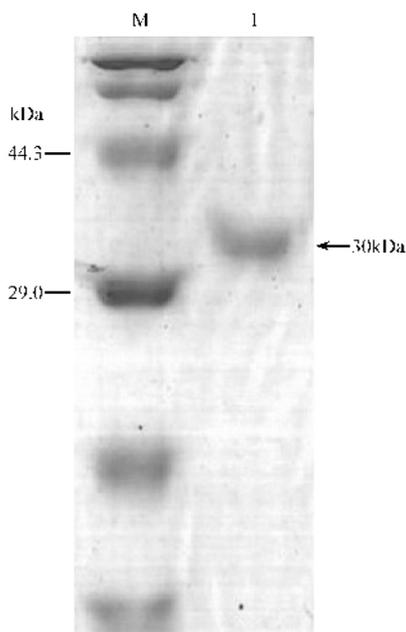


Fig.2 Analysis of the purified protein by SDS-PAGE. Lane M, protein marker. Lane 1, purified protein.

2 纯化壳聚糖酶的 SDS-PAGE 分析

的最适 pH 值为 5.6, 最适温度为 50℃。前期我们对 *F. solani* 0114 发酵产生的壳聚糖酶粗酶液进行了研究, 测得粗酶液的最适 pH 值为 5.4, 最适温度为 50℃^[6] 表明重组酶与初始酶的性质基本一致。另外, 温度对该酶的影响与 *F. solani f. sp. Phaseoli* 来源的壳聚糖酶 (D85388) 不同, *F. solani f. sp. Phaseoli* 的壳聚糖酶最适温度为 40℃, 超过 50℃ 基本没有活性^[10]。酶促反应动力学参数 K_m 及 V_{max} 测定见图 4, 以 85% 脱乙酰度壳聚糖 (Sigma) 为底物时, 该酶的 K_m 值为 0.063 mg/mL, $V_{max} = 126.58 \mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 。

2.4 HPLC 法对酶解产物的分析

HPLC 分析显示, 壳聚糖酶酶解产物中分子量小于 1.8 kDa 的组分占 78.9%, 不含单糖 (图 5), 表明水解产物中大部分为聚合度 2~10 的壳寡糖。

2.5 分泌型表达壳聚糖酶酿酒酵母工程菌株的构建

将重组质粒 pYMIKP-*csn* 转化酿酒酵母工程菌株 N-27, 在含高浓度 G418 (30 mg/mL) 的 YPED 平板

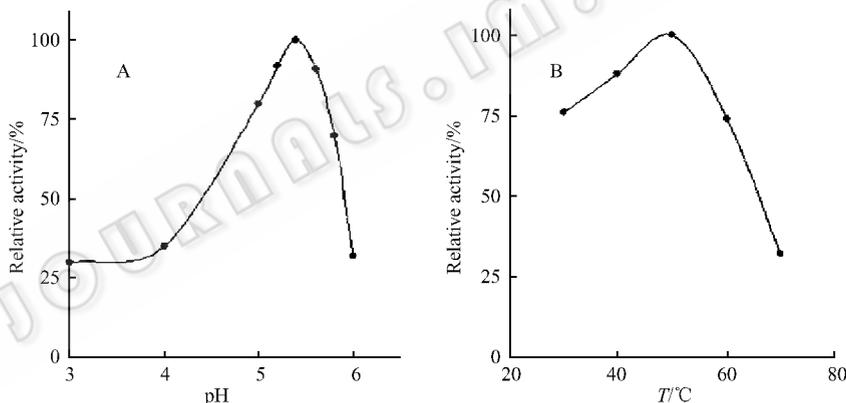


图 3 pH 及温度对于壳聚糖酶活性的影响

Fig.3 Influence of pH (A) and temperature (B) on chitosanase activity.

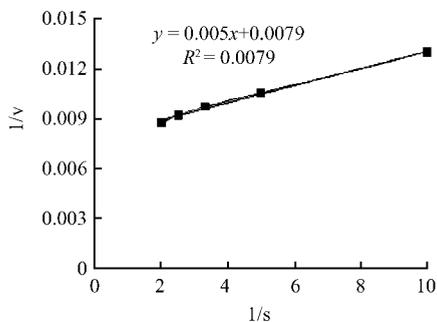


图 4 壳聚糖酶酶促反应动力学常数测定

Fig.4 Kinetic analysis of the purified chitosanase.

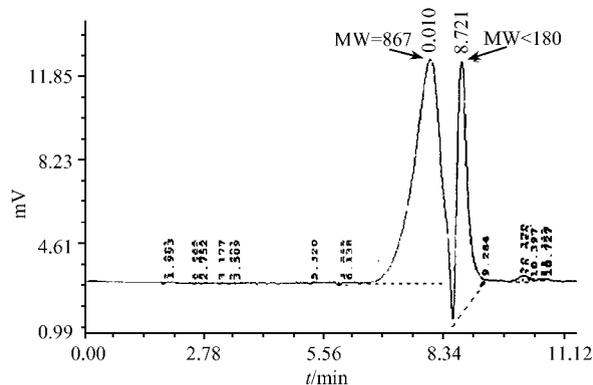


图 5 酶解产物的 HPLC 分析

Fig.5 HPLC analysis of the enzymatic hydrolysates.

上筛选多拷贝插入的转化子, 转化菌株命名为 N-27C。以分批培养的方式测定 N-27C 的壳聚糖酶产

量 结果表明酶活峰值出现在 36 h, 体积酶活为

50.2 mU/mL。与 *F. solani* 0114 (76.4 mU/mL) 相比, 虽然 N-27C 的壳聚糖酶产量较低, 但 *F. solani* 0114 的发酵时间为 72 h。因此, N-27C 的发酵性能整体上要优于 *F. solani* 0114 (表 2), 更适合用于壳聚糖酶的生产。酶活测定结果表明 N-27C 所分泌的壳聚糖酶与大肠杆菌重组酶的最适 pH 及温度一致, TLC 结果表明其酶解特性与重组酶及 *F. solani* 0114 所产初始酶相一致 (图 6)。

表 2 N-27C 与 *F. solani* 0114 发酵性能对比

Table 2 Comparison of fermentation performance between N-27C and *F. solani* 0114

Strains	Fermentation time/h	Chitosanase yield/ (mU/mL)	Chitosanase synthesis rate/ (U/L·h)
N-27C	36	50.2 ± 3.4	1.4 ± 0.2
<i>F. solani</i> 0114	72	76.4 ± 5.0	1.1 ± 0.1

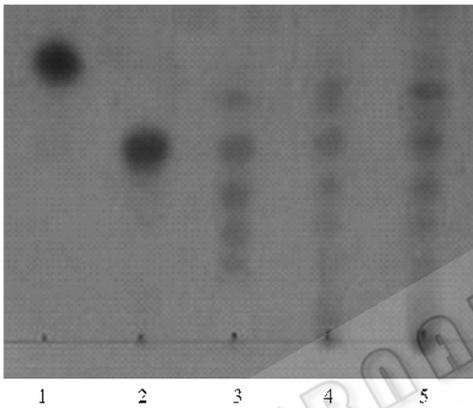


图 6 酶解产物的 TLC 分析

Fig. 6 TLC analysis of enzymatic hydrolysates. Lane 1, glucosamine (GlcN). Lane 2, chitotriose (GlcN)₃. Lane 3, hydrolysates of renatured, purified chitosanase extracted from *E. coli*. Lane 4, hydrolysates of crude chitosanase from *S. cerevisiae* N27C. Lane 5, hydrolysates of crude chitosanase from *F. solani* 0114.

3 讨论

聚合度在 2 ~ 10 的壳寡糖被认为是较好的功能性壳寡糖产品。虽然采用多种水解酶类如纤维素酶、果胶酶、脂肪酶等复合作用也能水解壳聚糖产生壳寡糖, 但此方法的水解产物较为混杂。壳聚糖酶具有底物特异性强、水解产物易于控制等优点, 在功能性壳寡糖的生产中具有较好的应用前景。本研究我们克隆了腐皮镰孢菌 *F. solani* 0114 的壳聚糖酶 cDNA, 并在大肠杆菌中成功表达, 对纯酶的酶学性质、水解特性进行了研究。实验结果表明该酶能高效催化壳聚糖的水解, 水解产物中 2 ~ 10 糖组分占 80% 左右, 不含单糖, 推断该酶是一种内切型壳聚糖

酶。其水解产物有效成分高, 适合用于壳寡糖的生产。另外, 该酶的最适温度与 *F. solani* f. sp. *Phaseoli* 来源的壳聚糖酶不同, *F. solani* f. sp. *Phaseoli* 的壳聚糖酶最适温度为 40°C, 超过 50°C 基本没有活性^[6], 而 *F. solani* 0114 壳聚糖酶的最适温度为 50°C, 且在该温度下酶活性能稳定 4 h 以上。二者的蛋白序列同源性高达 89%, 可能两个蛋白在高级结构上存在着某些差异。

腐皮镰孢菌是一种植物病原菌, 能产生多种霉菌毒素, 对植物及人畜都有潜在的危害^[6], 用其所产的壳聚糖酶粗酶液进行功能性壳寡糖的生产可能会带来安全性问题。而酿酒酵母由于培养条件简单、生长迅速, 且是公认的生物安全菌 (GRAS), 已广泛用于真核生物基因的异源表达。菊粉酶信号肽 (INU1A) 在酿酒酵母中可以有效指导较大分子量蛋白的分泌^[7], 本研究我们将壳聚糖酶基因与 INU1A 序列融合并导入酿酒酵母工程菌株 N-27 中, 实现了壳聚糖酶的分泌表达, 对于该酶的规模化生产奠定了基础。

参考文献

- [1] Roncal T, Oviedo A, de Armentia IL, et al. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. *Carbohydrate Research*, 2007, 342: 2750 - 2756.
- [2] 戴芸, 朱旭芬. 微生物壳聚糖酶的研究概况. 浙江大学学报 (Journal of Zhejiang University), 2004, 30 (2): 229 - 236.
- [3] Zhang J, Sun Y. Molecular cloning, expression and characterization of a chitosanase from *Microbacterium* sp. *Biotechnology Letters*, 2007, 29: 1221 - 1226.
- [4] Kim PI, Kang TH, Chung KJ, et al. Purification of a constitutive chitosanase produced by *Bacillus* sp. MET 1299 with cloning and expression of the gene. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 240: 31 - 40.
- [5] Tanabe T, Morinaga K, Fukamizo T, et al. Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2003, 67: 354 - 364.
- [6] 李风平, 何潇, 鲍晓明. 壳聚糖酶产生菌的筛选及其酶解产物的初步研究. 山东大学学报 (Journal of Shandong University), 2003, 38: 96 - 98.
- [7] Liu H, Bao X. Overexpression of the chitosanase gene in *Fusarium solani* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Current Microbiology*, 2009, 58 (3): 279 - 282.

- [8] Garber RC, Yoder OC. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal, and plasmid components. *Analytical Biochemistry*, 1983, 135:416–422.
- [9] Ehrenschaft M, Upchurch RG. Isolation of lightenhanced cDNAs of *Cercospora kikuchii*. *Applied Environmental Microbiology*, 1991, 57:2671–2676.
- [10] Shimosaka M, Nogawa M, Ohno Y, et al. Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*—purification and some properties. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1993, 57:231–235.
- [11] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193:265–275.
- [12] Yoon HG. Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. Strain CK4: its purification, characterization, and reaction patterns. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2001, 65:802–809.
- [13] Laloux O, Cassart JP, Delcour J, et al. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. *FEBS Letters*, 1991, 289:64–72.
- [14] 刘向勇 沈煜 鲍晓明等. rDNA 介导的多拷贝整合表达载体的构建及其在酿酒酵母工业菌株中的应用. 山东大学学报 (Journal of Shandong University), 2005, 40:105–109.
- [15] Sherman F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, 1991, 194:3–21.
- [16] Caracuel Z, Roncero MI, Espeso EA, et al. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology*, 2003 48:765–779.
- [17] Li J, Xu H, Bentley WE, et al. Impediments to secretion of green fluorescent protein and its fusion from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 2002, 18:831–839.

Characterization of a chitosanase from *Fusarium solani* and its expression in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*

Huaiwei Liu, Xiaoming Bao*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract : [Objective] To investigate the biochemical characteristics of the chitosanase from *Fusarium solani*, and its application in chitoooligosaccharides production, and express the chitosanase gene (*csn*) in a *Saccharomyces cerevisiae* industrial strain.

Methods] The chitosanase cDNA (EU263917) was amplified by reverse transcription-mediated PCR (RT-PCR). A His-chitosanase fusion protein was expressed in *E. coli* DE3. This protein was purified and characterized. Thin-layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to analyze the hydrolysates of this enzyme when it acted on 85% deacetylated chitosan. In addition, the *csn* cDNA was also fused to the inulinase (INU1A) signal sequence from *Kluyveromyces marxianus*. The fusion sequence was transferred into *S. cerevisiae* industrial strain N-27.

Results] The purified chitosanase had a specific activity of 2.5 U/mg. The enzyme showed the maximum activity at 50°C, which was different from the first reported chitosanase that from *F. solani* f. sp. *Phaseoli*. TLC and HPLC results indicated that most of the hydrolysis products were chitoooligosaccharides with a polymerization below 10, and no monomers were detected. Furthermore, chitosanase activity was detected in the culture medium of the recombinant *S. cerevisiae* cultures, and the volume activity reached 50.2 mU/mL. This result indicated that the recombinant protein was secretively expressed in *S. cerevisiae*.

Conclusion] The chitosanase from *F. solani* 0114 is an endochitosanase. Because of its special characteristics, this enzyme is very useful in chitoooligosaccharides production, and the construction of recombinant *S. cerevisiae* made a step towards the large-scale production of this enzyme.

Keywords : Chitosanase ; chitoooligosaccharide ; *Fusarium solani* ; *Saccharomyces cerevisiae*

(本文责编 张晓丽)

* Corresponding author. Tel/Fax : +86-531-88365826 ; E-mail : bxm@sdu.edu.cn