高产无色素普鲁兰糖突变菌株 P1012 的选育及发酵性能研究

万翠香[1]，王贤卓[1]，郭建军[2]，袁林[2]

（1.南昌大学中德联合研究院，江西南昌 330029）（2.江西省科学院微生物研究所，江西南昌 330096）

摘要：本研究旨在选育出高产普鲁兰多糖且黑色素分泌缺失的菌株，为普鲁兰的发酵生产提供宝贵的菌种资源。研究采用三种诱变剂（紫外线(UV)、亚硝基胍(NTG)、硫酸二乙酯(DES)）对出发菌株茁芽短梗霉 P23 进行多轮诱变处理。通过从 PDA 平板上挑选出色素低且黏度大的菌落作为候选菌株，并经红外光谱（FT-IR）分析其胞外多糖的构型。结果筛选出 13 株候选菌株，其中菌株 P1012 于 PDA 平板上培养 7 d 形成的菌落为白色，96 h 发酵液呈乳白色，且吸光值（$OD_{654\,nm}$ 表示色素的相对含量）达到 0.048，其胞外多糖经红外光谱检测可初步分析为普鲁兰多糖，与出发菌株 P23 相比，菌株 P1012 主要表现在细胞合成色素上的缺失。发酵培养后，测得普鲁兰产量为 28.01 g/L，糖转化率达到 56.02%，糖转化率比出发菌株高出 28.8%。表明菌株 P1012 可以作为生产普鲁兰多糖的候选菌株。

关键词：茁芽短梗霉；诱变；普鲁兰；黑色素

文章篇号：1673-9078(2015)1-101-106 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.019

Screening of Non-pigmented *Aureobasidium pullulans* Strain P1012 for High-yield Pullulan Production

WAN Cui-xiang[1], WANG Xian-zhuo[1], GUO Jian-jun[2], YUAN Ling[2]

(1.Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330029, China)

(2.Institute of Microbiology, Jiang Xi Academy of Sciences, Nan Chang 330096, China)

Abstract: The purpose of this study was to screen for a strain with a high pullulan yield without production of the black cell pigment, which would be a valuable strain for pullulan production. *Aureobasidium pullulans* strain P23 was mutated several times using three mutagens: ultraviolet (UV) light, 1-methyl-3-nitro-1-nitroso-guanidine (NTG), and diethyl sulfate (DES). Strains with high viscosity and low pigmentation were selected on potato dextrose agar (PDA) plates. The structure of exopolysaccharides produced by the selected strains was analyzed by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Based on the results, 13 candidate strains were selected and one mutant strain, P1012, formed white colonies on PDA plates incubated for seven days; in broth, the growth appeared ivory-white after 96 h with light absorbance (OD_{654nm}, to demonstrate relative pigment content) at 0.048. The exopolysaccharide produced by strain P1012 was identified as pullulan by FT-IR. Compared with P23, P1012 showed a lack of cellular pigmentation. The pullulan yield via fermentation by strain P1012 was 28.01 g/L and the sugar conversion rate was 56.02%, 28.8% higher than that of the original strain P23. This study showed that strain P1012 could be a candidate strain for industrial production of pullulan.

Key words: *Aureobasidium pullulans*; mutagenesis; pullulan; melanin

茁芽短梗霉（*Aureobasidium pullulans*）属于半知菌类短梗霉属，因其产黑色素，所以又称为黑酵母。茁芽短梗霉是一种腐生菌，分布广泛，如土壤、水、叶面其他植物性材料等。其分泌的胞外多糖—普鲁兰，具有良好的成膜性、可塑性、保湿性、可降解性等优点，现已被广泛地运用于医药、食品、环境保护等行业中[1]。由于未解读调控普鲁兰及黑色素分泌的相关基因，因此目前仍然采用传统育种方法，如自然分离、物理诱变、化学诱变等[2]。1866 年，DeBary 首次分离出茁芽短梗霉。此后，许多学者筛选出许多各种性能的菌株。Szymanska 等[3]采用紫外线(UV)照射野生菌株，获得两突变菌株 M-u1、M-u2，其多糖产量提高到 10 g/L，色素减少。朱一晖等[4]通过 ^{60}Co 辐射诱变

收稿日期：2014-05-24

基金项目：江西省重大科技创新项目（20124ACF01100）；江西省科技支撑计划项目(20112BBF60045；20122BB)

作者简介：万翠香（1977-），女，博士，副教授，研究方向为应用微生物学

通讯作者：袁林（1980-），男，博士，副研究员，研究方向为应用微生物学

处理*A .pullulans* B-1，获得一株诱变菌株，其黑色素分泌水平明显降低，普鲁兰多糖的产量略微下降。Kang 等[5]通过对出发菌株 *A.pullulans* N3.387 进行三轮基因组改组(genome shuffling)处理，获得菌株 F3-2，其普鲁兰产量达到 20.7 g/L。Choudhury 等[6]从 Caesuliaaxillaris 的花朵中分离得到 *A.pullulans*RBF-4A3，普鲁兰的产量为 26.35 g/L。许多技术问题阻碍普鲁兰多糖行业的发展，如黑色素的分泌、普鲁兰产量低、发酵后期培养液粘度大等。解决以上技术难题的方法很多，如培养基优化、发酵条件控制，但诱变育种是一种最经济的方法[7]。本课题组前期分离筛选一株产普鲁兰多糖的茁芽短梗霉 P23，但其黑色素水平高，达不到发酵生产的要求，因此需对其进行菌种改良。经多轮复合诱变处理，结合发酵参数测定以及红外光谱分析多糖的分子构型，以期获得高产无色素普鲁兰的菌株。比较分析出发菌株、候选菌株在菌落形态、细胞形态、产普鲁兰能力等方面的异同性，并绘制候选菌株的发酵曲线。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

茁芽短梗菌株（*Aureobasidium pullulans*）P23 由本实验室分离于鄱阳湖湿地公园草地土壤。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA) (g/L)：马铃薯 200，琼脂 20,葡萄糖 20。

斜面培养基：PDA 配方，添加 0.2%的酵母粉。

种子培养基（g/L)：酵母粉 5，蔗糖 20，pH 6.5。

发酵培养基（g/L)：蔗糖 50，K_2HPO_4 2，NaCl 1，$(NH_4)_2SO_4$ 0.4，$MgSO_4·7H_2O$ 0.6，酵母粉 2，pH 6.5。

琼脂粉购自北京索莱宝科技有限公司；1-丁基-3-硝基-1-亚硝基胍（NTG）购自 sigma 公司；硫酸二乙酯（DES）购自国药试剂化学有限公司；其他试剂为国产分析纯。

1.3 菌种活化及菌液的制备

从斜面（菌株 P23）上挑取一环种子于试管中，27 ℃、180 r/min 摇床培养 48 h。按 2:100 的接种量，将活化的菌种接种于 250 mL 三角瓶培养基中，27 ℃、180 r/min 摇床培养 48 h。

1.4 复合诱变的条件优化

1.4.1 紫外线(UV)照射时间的确定

取 100 μL 菌液（调整浓度为 10^6 cfu/mL）均匀涂布于 PDA 平板，将平板置于紫外灯下（40 W)照射，照射距离为 25 cm，照射时间为(min)：1、2、3、4、5、6。每个处理使用三个平板，以未经 UV 照射处理为对照组。处理后立即放入暗室，27 ℃，培养 48 h。统计每个平板上菌落的数量，绘制致死率曲线。

1.4.2 亚硝基胍（NTG)最佳浓度的确定

取适量 NTG 母液加入菌液（调整浓度为 10^6 cfu/mL）中，使得 NTG 的终浓度达到(mg/mL)：0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6。三个平行实验组，以未加入 NTG 为对照组。混匀后，于 180 r/min、28 ℃摇床震荡 50 min。处理完毕后，取 100 μL 处理液涂布于 PDA 平板上，27 ℃，培养 48 h。统计每个平板上菌落的数量，绘制致死率曲线。

1.4.3 硫酸二乙酯（DES)的最佳浓度确定

取适量 DES 母液加入菌液（调整浓度为 10^6 cfu/mL）中，使得 DES 的终浓度达到(%)：0.2、0.4、0.6、0.8、1、2。混匀后，于 180 r/min、28 ℃摇床震荡 50 min。处理完毕后，取 100 μL 处理液涂布于 PDA 平板上，27 ℃，培养 48 h。统计每个平板上菌落的数量，绘制致死率曲线[3]。

致死率=1-(对照组活菌数-实验组活菌数)/(对照组活菌数)×100%

1.5 复合诱变

1.5.1 复合诱变的处理方法

每一轮诱变处理过程首先采用 NTG 或者 DES 诱变处理菌液，方法参考文中 1.4。处理完毕后，使用 0.1 mol/L PBS 缓冲液（pH 6.0）洗涤菌体 3 遍并悬浮，再用于紫外照射(UV)诱变处理。此后，重复每一轮诱变处理过程，且交替使用化学诱变剂 NTG、DES。

1.5.2 筛选诱变菌株

挑取 PDA 平板上色素低、表面粘稠的单菌落，划线培养纯化至三代。挑取单菌落接种于试管，27 ℃、180 r/min 培养至 7 d。挑选颜色较浅、较粘稠的菌液，作为下一轮诱变处理过程的出发菌液。

1.6 候选菌株与出发菌株菌落形态、细胞形态比较

将候选和出发菌株接种于 PDA 平板上，27 ℃，倒置培养 3 d。肉眼观察菌落形态并拍照，使用奥林巴斯 BX53 显微镜观察细胞形态并采用 cellsens standard 软件拍照处理。

1.7 候选菌株与出发菌株产普鲁兰比较

按 2:100 的接种量，将候选菌株和出发菌株的菌液接种于发酵培养基，28 ℃，180 r/min，培养 4 d。观察发酵液的颜色，测定其吸光值(OD_{654nm})，乙醇粗提取普鲁兰。

1.8 候选菌株发酵曲线的测定

按 2:100 的接种量，将候选菌株的菌液接种于摇瓶（装有 250 mL 的发酵培养基）中，28 ℃，120 r/min 培养 120 h。期间，每隔 12 h 取样，冻存于-80℃超低温冰箱中。发酵完毕后，取出所有的发酵液样品，测定相关发酵数据（取每实验组的平均值），如其吸光值(OD_{654nm})、生物量、普鲁兰的产量。

1.9 数据分析

1.9.1 生物量的测定

无菌水洗涤菌体沉淀离心 2~3 次，于烘箱 105 ℃或冷冻真空干燥过夜，用称重法测定菌体的质量[2]。

1.9.2 普鲁兰产量的测定

取发酵液上清液，加入两倍体积的无水乙醇混合，室温下静置 3 h；12000 r/min 离心 10 min，离心后收集沉淀，于烘箱 105 ℃或冷冻真空干燥过夜，称重法测定普鲁兰的质量[3]。

糖转化率＝(普鲁兰产量/培养液起始蔗糖含量)×100%

1.9.3 吸光值(OD_{654nm})

取发酵液于 8000 r/min 下离心 15 min。使用 721 分光光度计，取上清液于波长 654 nm 处测吸光值，以 OD_{654nm} 值表示色素的相对含量[8]。

1.9.4 pH 值测定

使用 BPHSCAN 30 防水笔型 pH 计。

1.9.5 普鲁兰的红外光谱(FT-IR)分析

在红外灯烘烤下，将按照质量含量 10%左右胞外多糖将与溴化钾(KBr)晶片混合，研磨成粉末。然后在 10~15 MPa 的压力下压片。然后在在 FT-IR 下，扫描测试吸收与透过特征峰[9]。

1.9.6 发酵曲线的绘制

采用 sigmaplot 12.0 软件制作。

2 结果与分析

2.1 复合诱变条件优化结果

据图 1 可知，出发菌株 P23 对诱变剂（UV、NTG、DES）都比较敏感，随着诱变剂量的增加，菌株的致死率也越大。根据现代育种理论，当被诱变的微生物致死率在 75%~80%时，正向突率较高[10]。因此，本研究采用的复合诱变条件为：UV 照射时间为 4 min，致死率为 75.20%；NTG 的终浓度为 4 mg/mL，致死率为 75.20%；DES 终浓度为 0.80%，致死率为 76.20%。

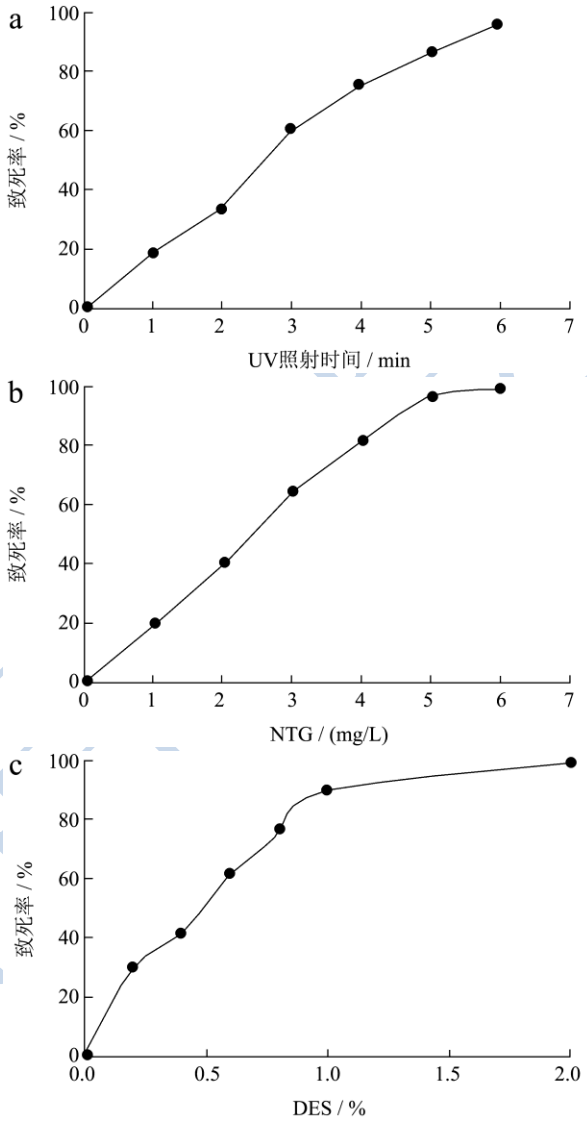


图 1 诱变剂量与致死率关系

Fig.1 Correlation between mutagen dose and lethality

2.2 复合诱变结果

考虑诱变中产生正向突变率可能比较低，因此，我们采取多轮不同处理的复合诱变，以期获得一株高产无色素普鲁兰菌株。

13 株候选菌株于 PDA 上培养，形成的菌落呈白色、粘稠状。据表 1 可知，所有候选菌株的发酵液终 pH 范围在 6~7 之间，其中菌株 P1009 的 pH 最高，达到 6.83。菌株 P1012 的普鲁兰产量最高达到 10.24 g/L，是出发菌株 P23 的 2.29 倍，但出发菌株 P23 的生物量最大，达到 4.01 g/L，可推测普鲁兰的产量和生物量之间没有必然的联系。大部分候选菌株的糖转化率范围在 10~30%，发酵液颜色均为乳白色，吸光值(OD_{654nm})较低。综合考虑，选取菌株 P1012 为生产普

鲁兰的候选菌株，普鲁兰的产量为 10.24 g/L，糖的转化率为 51.20%，OD_{654nm} 值为 0.048，发酵液为乳白色。

表 1 复合诱变的结果

Table 1 Results of combination mutagenesis

菌株号	pH	生物量/(g/L)	普鲁兰/(g/L)	糖的转化率/%	吸光值(OD_{654nm})
P23	6.72	4.01	4.48	22.40	0.899
P1001	5.93	2.87	5.95	29.75	0.094
P1002	6.36	3.39	5.31	26.55	0.090
P1003	6.91	2.62	2.18	10.90	0.044
P1004	5.87	2.94	4.21	21.05	0.098
P1005	5.89	2.79	6.62	33.10	0.115
P1006	6.25	2.17	2.98	14.90	0.078
P1007	5.87	2.27	3.61	18.05	0.086
P1008	6.66	3.20	3.38	16.90	0.096
P1009	6.83	1.91	2.85	47.50	0.034
P1012	6.61	2.39	10.24	51.20	0.048
P1014	6.66	1.67	3.60	18.00	0.027
P1015	6.76	1.55	5.96	29.80	0.035
P1020	6.41	2.89	1.80	9.00	0.070

2.3 茁芽短梗霉 P1012 与茁芽短梗霉 P23 菌落形态、细胞形态比较

候选菌株 P1012 的菌落颜色为纯白色，呈乳头状凸起，边缘为放射状菌丝，易挑取(图 2a)。而出发菌株 P23 菌落颜色为黑色，呈圆形，中心凸起，不易挑取，生长后期有菌丝体产生(图 2b)[11]。

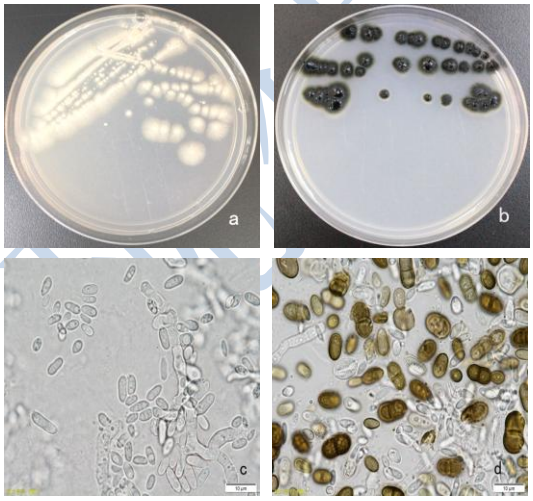


图 2 茁芽短梗霉 P1012 与茁芽短梗霉 P23 在 PDA 平板培养基上培养 3d 的菌落照片及显微照片(10×40，比例尺为 10 μm)

Fig2. Photographs of microbial colonies and cells (10 × 40, scale: 10μm) of *Aureobasidium pullulans* strains P1012 and P23, cultured for three days on PDA plates

显微观察细胞形态，发现候选菌株 P1012、出发菌株 P23 都具有酵母态、菌丝体、厚垣孢子等多种细胞形态（图 2c、d）。候选菌株 P1012 的酵母态细胞数量占所有细胞形态的比例高达 80-90%。有研究表明酵母态的细胞更倾向于产普鲁兰，且酵母态细胞的数量与普鲁兰产量具有正相关性，我们推测候选菌株 P1012 普鲁兰产量与酵母态细胞数量有很大的关联[12]。

2.4 茁芽短梗霉 P1012 与茁芽短梗霉 P23 产普鲁兰比较

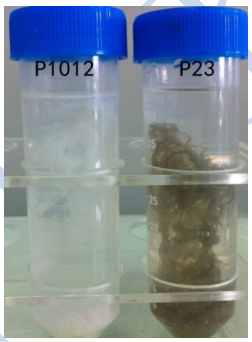


图 3 茁芽短梗霉 P1012 与茁芽短梗霉 P23 产普鲁兰粗品对比

Fig.3 Comparison of crude pullulan produced by *Aureobasidium pullulans* strains P1012 and P23

候选菌株 P1012 的发酵液呈乳白色，吸光值(OD_{654nm})值为 0.05，而出发菌株 P23 呈深绿色或墨绿色，吸光值(OD_{654nm})值高达 0.89。乙醇粗提取普鲁兰多糖，结果显示候选菌株 P1012、出发菌株 P23 的普鲁兰颜色分别呈白色、黑色。因此认为候选菌株 P1012 不分泌黑色素。

2.5 红外光谱分析

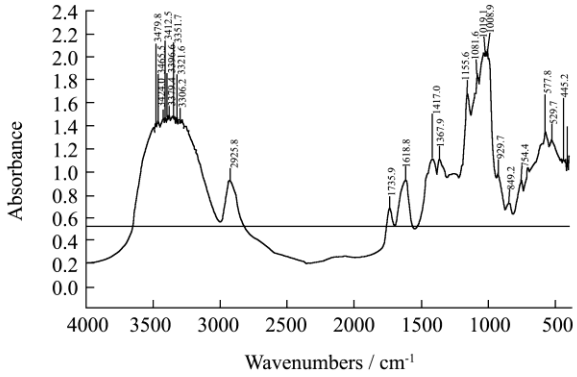


图 4 茁芽短梗霉 P1012 的胞外多糖红外光谱图

Fig.4 FT-IR spectrographs of polysaccharide samples produced by *Aureobasidium pullulans* strain P1012

据红外光谱图(FT-IR)，可知菌株 P1012 胞外多糖的光谱范围为 4000~400 cm^{-1}，大致可分为五个部分：

(1) 3600~3200 cm^{-1} 出现一宽峰,由糖类存在着的分子间或分子内的氢键的 O-H 伸缩振动产生的；(2) 3000~2800 cm^{-1} 存在吸收较弱的 O-H 吸收峰，在这区域的两组吸收峰是糖类的特征峰；(3) 1400~1200 cm^{-1} 的吸收峰，是由两个 C-O 伸缩振动引起，其中一种属于 C-O-H，另一种是糖环 C-O-C；(4) 1000~700 cm^{-1} 包含着糖类特征吸收峰，在 844 cm^{-1} 处有一强吸收峰，891 cm^{-1} 处无吸收峰，表明该多糖的糖苷键构型为 α 型，再根据普鲁兰的特征吸收峰，特别是 929.7 cm^{-1} 处的强吸收峰,可初步分析菌株 P1012 的胞外多糖为普鲁兰[13]。

2.6 茁芽短梗霉 P1012 的发酵曲线

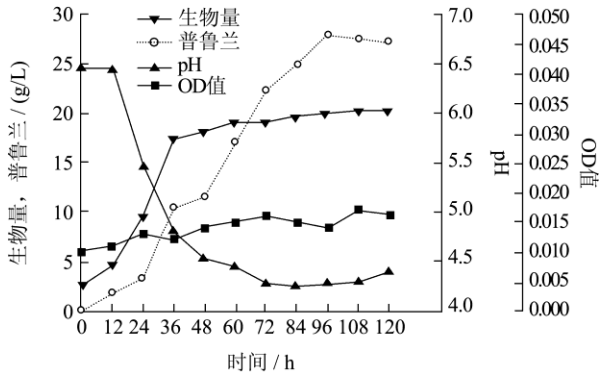


图 5 茁芽短梗霉 P1012 的发酵曲线图

Fig.5 Fermentation curve of *Aureobasidium pullulans* strain P1012

由图 5 可知，菌株 P1012 的生物量、普鲁兰产量随着时间延长而增加，而发酵液的 pH 却不断下降，吸光值(OD_{654nm})变化不大。菌体快速增长发生在 0~48 h，此时处于对数生长期，此后菌体增长缓慢，最高达到 20.23 g/L。普鲁兰的积累过程处于 0~96 h，成直线性增长，在 96 h 达到 28.01 g/L，糖转化率达到 56.02%。发酵液的 pH 值在 0~48 h 内迅速下降，达到 4.39 后维持较低水平。在整个发酵过程中，发酵液的 OD_{654nm} 值一直维持在 0.15 左右较低水平，可见菌株 P1012 不分泌黑色素。因此，候选菌株的发酵周期应控制在 96 h 左右,此时普鲁兰的产量最高，发酵液 pH 值较低。

3 讨论

茁芽短梗霉（*Aureobasidium pullulans*）可生产多种有价值的产物，如多聚糖、酶、抗真菌素等，尤其是普鲁兰。普鲁兰具有可塑性、无毒等生物特性，广泛运用于食品加工、环境保护等行业，是具有很大市场前景的生物制品[14]。本研究选育出的产普鲁兰菌株 P1012，有望成为普鲁兰的工业化生产及大规模应用的优良菌种。

在未优化培养基及发酵条件的前提下，摇瓶液体培养 P1012，测其普鲁兰产量达到 28.01g/L，糖转化率达到 56.02%。相较于靳建忠等[15]报道紫外诱变出的菌株普鲁兰糖产量为 10.56 g/L，转化率 52.78%，以及 Ma 等[2]报道从红树林系统分离出的 P16，普鲁兰产量为 65.30 g/L，糖转化率为 43.53%而言，菌株 P1012 产普鲁兰的能力更优。为提高菌株 P1012 的产糖能力，后续的试验应对其培养基组分及发酵条件进行优化，再次深入研究普鲁兰合成的机理，为普鲁兰的生产提供技术支持。

普鲁兰的生产过程中,茁芽短梗霉会产生黑色素，增加纯化成本。解决黑色素的产生问题，最直接、经济的方法是选育出不分泌黑色素的菌株。许多学者虽筛选出一些性能提高的菌株，但大多数是片面的追求提高普鲁兰产量，忽略了黑色素分泌问题。如 Szymanska 等[3]筛选出菌株的普鲁兰产量提高到 70 g/L，但黑色素依然产生。国内，靳建忠等首次报道出采用紫外线诱变处理，选育出一株白色菌株。本研究选育出的菌株 P1012，于 PDA 平板上形成的菌落呈白色，液体培养前后 OD_{654nm} 值变化非常小，提取的普鲁兰粗品为白色，说明其也不产生黑色素。普鲁兰的生产还面临其他问题，如发酵后期，培养基粘稠，限制了溶氧等，这值得我们深入研究。

4 结论

本研究以菌株 P23 为出发菌株，经过多轮复合诱变处理，成功选育出一株高产普鲁兰且黑色素合成缺失的菌株 P1012。菌株 P1012 于生长过程中不分泌黑色素，其胞外粗多糖产量达到 28.01 g/L，糖转化率达到 56.02%，红外光谱分析胞外多糖为普鲁兰。该菌株是一株很好的工业发酵生产候选菌株，为将来降低普鲁兰多糖发酵生产成本提供了可能，促进国内普鲁兰行业的发展。

参考文献

[1] Woolridge E. Mixed enzyme systems for delignification of lignocellulosic biomass [J]. Catalysts, 2014, 4(1): 1-35

[2] Ma Z, Fu W, Liu G, et al. High-level pullulan production by *Aureobasidium pullulans var*. melanogenium P16 isolated from mangrove system [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(11): 1-9

[3] Tarabasz-Szymanska L, Galas E. Two-step mutagenesis of *Pullularia pullulans* leading to clones producing pure pullulan with high yield [J]. Enzyme Microb Technol, 1993, 15(4): 317-320

[4] 朱一晖,张丽敏,詹晓北.出芽短梗霉产色素能力弱化菌株的筛选[J].无锡轻工大学学报,2003,22(1):16-20
ZHU Yi-hui, ZHANG Li-min, ZHAN Xiao-bei. Isolation of *Aureobasidium pullulans* 60Co mutagensis strainsthat produce pullulan with reduced pigmentation [J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2003, 22(1): 16-20

[5] Kang J, Chen X, Chen W, et al. Enhanced production of pullulan in *Aureobasidium pullulans* by a new process of genome shuffling [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(3): 792-795

[6] Choudhury A R, Saluja P, Prasad G S. Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flowers of caesulia axillaris [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(4): 1547-1552

[7] Prajapati V D, Jani G K, Khanda S M. Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95(1): 540-549

[8] Ravella S R, Qui Ones T S ÌR, Retter A, et al. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(3): 728-732

[9] 欧昌荣,汤海青,殷居易,等.近红外光谱法快速测定饮料酒中酒精度[J].现代食品科技,2014,1:180-184
OU Chang-rong, TANG Hai-qing, YIN Ju-yi, et al. Rapid test of alcoholicity in alcoholic beverages by near infrared spectroscopy [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 1: 180-184

[10] Wu S, Chen J, Pan S. Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud and its characterization [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2): 1696-1700

[11] Schena L, Nigro F, Pentimone I, et al. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans* [J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 30(3): 209-220

[12] Heald P J, Kristiansen B. Synthesis of polysaccharide by yeast-like forms of *Aureobasidium pullulans* [J]. Biotechnol Bioeng, 1985, 27(10): 1516-1519

[13] 方宣钧,洪少良.应用FT-IR和NMR研究短梗霉多糖分子结构[J].中国生物化学与分子生物学报,1999,15(1):109-113
FANG Xuan-jun, HONG Shao-liang. Studies on structure of pullulan from *Aureobasidium pullulans* by FT-IR and NMR [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 15(1): 109-113

[14] 汪东风,张一妹,徐莹,等.壳聚糖复合膜处理对蓝莓保鲜效果的影响[J].现代食品科技,2014,2:62-65
WANG Dong-feng, ZHANG Yi-mei, XU Ying, et al. Effect of chitosan complex coatting treatment on fresh-keeping of blueberry fruit [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 2: 62-65

[15] 靳建忠,王慧娟,孔维甲,等.紫外诱变选育出芽短梗霉高产普鲁兰糖白化突变菌株[J].食品科学,2011,32(11):187-191
JIN Jian-zhong, WANG Hui-juan, KONG Wei-jia, et al. Breeding of a high pullulan-producing non-pigmented mutant of *Aureobasidium pullulans* by UV-induced mutagenesis [J]. Food Science, 2011, 32(11): 187-191