

复合诱变选育壳聚糖酶高产菌种及产酶条件优化

王俊芳, 张震, 申梦雨, 王刚

(河南大学 生命科学院, 河南 开封 475004)

摘要: 以具有产壳聚糖酶能力的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) G10为出发菌, 利用紫外和微波对菌株G10进行复合诱变, 选育壳聚糖酶高产菌株, 并采用正交试验设计对突变株产酶条件进行优化。结果选育出一株产酶活相对较高的突变株W1-32, 优化后的产酶条件为果糖1.3%, 胶体壳聚糖0.5%, 酵母粉2.0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3%, 初始pH 7.2, 温度28℃, 转速200 r/min。在此优化条件下, 菌株W1-32产壳聚糖酶活为11.82 U/mL, 是出发菌株G10的6.9倍。该研究为菌种的选育和进一步研究应用提供理论依据。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 壳聚糖酶; 选育; 紫外诱变; 微波诱变

中图分类号: TQ920.6

文章编号: 0254-5071(2021)05-0108-05

doi: 10.11882/j.issn.0254-5071.2021.05.020

引文格式: 王俊芳, 张震, 申梦雨, 等. 复合诱变选育壳聚糖酶高产菌种及产酶条件优化[J]. 中国酿造, 2021, 40(5): 108-112.

Breeding of high-yield chitosanase strain by compound mutation and optimization of enzyme production conditions

WANG Junfang, ZHANG Zhen, SHEN Mengyu, WANG Gang

(College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: Using *Bacillus subtilis* strain G10 with chitosanase-producing ability as the starting strain, the high-yield chitosanase strain was bred by ultraviolet mutagenesis and microwave mutagenesis, and the culture conditions of the mutant strain producing chitosanase were optimized by orthogonal tests design. The mutant strain W1-32 with relatively high chitosanase activity was screened, and the optimized culture conditions for high-yield chitosanase were fructose 1.3%, colloidal chitosan 0.5%, yeast powder 2.0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3%, initial pH 7.2, temperature 28℃ and rotation speed 200 r/min. Under the optimal conditions, the chitosan activity produced by strain W1-32 was 11.82 U/ml, which was 6.9 times of that of the starting strain G10. The study provided a theoretical basis for the breeding of strains and further application study.

Key words: *Bacillus subtilis*; chitosanase; breed; ultraviolet mutagenesis; microwave mutagenesis

壳聚糖酶通常被认为是一类对壳聚糖有专一水解性, 以内切方式在部分乙酰化壳聚糖中催化水解 β -1,4糖苷键生成壳寡糖的酶。壳寡糖(chitooligosaccharides, COS)是壳聚糖的水解产物, 是一种由 β -(1,4)-2-氨基-D-氨基葡萄糖和 β -(1,4)-2-乙酰氨基-D-氨基葡萄糖单元组成的多聚糖。COS聚合度一般为2~10, 易溶于水, 黏度低, 易被吸收, 生物活性丰富, 在食品和生物医药领域得到广泛应用^[1-3]; 具有抗肿瘤、抑菌、杀菌、抗氧化、增强免疫力和吸附重金属等重要机能^[4-7]。目前, COS产品制备方法有化学法、酶法、高能冲击和基因工程重组等方法^[8-9]。其中酶法具有产物特异性强、安全、环保和副产物少等特点。

壳聚糖酶主要由微生物(真菌、细菌和放线菌)和植物产生, 该酶在微生物和植物的对外防御和营养功能上起着重要的作用^[10-15]。壳聚糖酶的应用除COS制备, 还应用于植物真菌病原菌生防治、真菌原生质体的制备和甲壳类废物的生物转化等。近年来, 随着应用加剧使壳聚糖酶的研究备受关注^[16-18]。虽已筛选出了大量产壳聚糖酶菌株, 但经研

究发现, 不同壳聚糖酶产生菌降解壳聚糖的产物、降解方式和适宜的酶解条件不尽相同^[19-22], 而且野生菌的酶活性普遍较低, 难以大规模工业化生产, 壳聚糖酶来源有限, 使得商品化的壳聚糖酶价格较高, 生产成本难以下降, 致使酶法制备COS造价较高, 限制了该法的推广应用。因此, 需要开发更多类型、适应条件广的壳聚糖酶降解菌来满足工业化需求, 通过壳聚糖酶产生菌的作用, 有助于COS的开发应用。

该试验分离获得一株产壳聚糖酶菌株G10, 研究旨在利用紫外和微波复合诱变技术对野生型菌株进行改造, 选育壳聚糖酶产量高、酶活性强的突变菌株, 并通过正交试验优化酶活发酵工艺条件, 以为壳聚糖酶的进一步研究和应用提供理论基础, 为大幅提高COS的应用技术能力提供一些技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 供试菌株

收稿日期: 2020-12-03

修回日期: 2021-01-27

基金项目: 河南省科技厅基础与前沿研究计划项目(152300410063)

作者简介: 王俊芳(1973-), 女, 高级实验师, 硕士, 研究方向为资源微生物应用。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) G10: 河南大学微生物实验室。

1.1.2 试剂

3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)(分析纯): 上海国药试剂集团; 壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$): 广州化工集团。

1.1.3 培养基

液体LB培养基^[23]: 蛋白胨1%, 酵母提取物0.5%, NaCl 1%, pH7.2; 固体LB培养基: 液体LB培养基添加琼脂1.8%。121℃灭菌20 min。

液体金氏培养基B(King's B medium, KBM)^[24]: 蛋白胨2.0%, 甘油1.0%, K_2HPO_4 0.15%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, pH7.2; 固体KBM培养基: 液体KBM培养基添加琼脂2.0%。121℃灭菌20 min。

初筛液体发酵培养基: 液体KBM培养基添加0.1%胶体壳聚糖; 复筛液体发酵培养基: 液体KBM培养基添加0.5%胶体壳聚糖。

1.2 仪器与设备

BIO-RAD iMark酶标仪: 美国伯乐公司; 5424R高速冷冻离心机: 德国Eppendorf公司; QHZ-98A全温度振荡培养箱: 上海百典仪器设备公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种诱变

菌株的活化: 以斜面培养16~18 h的菌株G10为出发菌, 接种于LB液体培养基, 28℃、180 r/min振荡培养16 h, 使细胞处于对数生长期; 将上述培养物置于4~7℃储藏1 h, 诱导同步生长, 然后冰浴10 min。4℃条件下, 将菌悬液12 000 r/min离心, 去上清, 重悬浮菌体细胞, 将细胞浓度调整至 10^8 CFU/mL^[25]。

紫外诱变: 取上述菌液均匀涂布于LB固体培养基平板, 使培养皿底部离紫外灯管约30 cm, 打开皿盖, 分别对平板进行不同时间的紫外照射, 照射时间为0 s、5 s、10 s、20 s、30 s、40 s、50 s、60 s、70 s、80 s和90 s, 照射结束后28℃黑暗培养48 h。以不照射的菌液为对照, 计算致死率。

微波诱变: 对紫外诱变获得的正突变株中遗传稳定的菌株进行微波诱变。取600 μ L菌悬液置于1.5 mL离心管中, 并将离心管置于装满冷水的烧杯中, 微波炉中辐照。辐照档位功率为700 W, 脉冲频率2 540 MHz, 每隔10 s换水一次, 冷却降温。辐照时间为0 s、10 s、20 s、30 s、50 s、60 s、80 s、90 s、110 s和120 s, 辐照结束, 将菌液均匀涂布于LB固体培养基平板上, 28℃培养48 h。以不照射的菌液为对照, 计算致死率。

1.3.2 突变菌株的筛选

突变菌株的初筛: 根据致死曲线, 在最佳紫外和微波时长诱变条件下, 挑取诱变后生长速度快的单菌落, 接种于

LB液体培养基, 180 r/min振荡培养, 28℃恒温培养16 h。然后将菌液分别定量点接于胶体壳聚糖平板上, 28℃恒温培养72 h。以菌株G10为对照菌株, 挑取透明圈相对大的菌落。

突变菌株的复筛: 将初筛的菌株接种于复筛培养基, 进行摇瓶培养, 28℃恒温培养40 h。分别测定不同菌株发酵液壳聚糖酶活, 根据酶活大小筛选高产菌株。以菌株G10为对照菌株。

菌株遗传稳定性: 经过初筛和复筛后, 将待测菌株进行连续10代培养, 接种复筛液体培养基振荡培养, 分别测定其壳聚糖酶活力。

1.3.3 壳聚糖酶产酶条件优化单因素试验

培养条件的优化: 菌体培养条件优化前的培养温度为30℃, 转速180 r/min, 培养基初始pH值7.2, 装液量为30 mL/250 mL。以此条件为参照, 将活化的菌种接入装有30 mL复筛液体培养基的250 mL三角瓶, 分别对培养转速(150 r/min、180 r/min、200 r/min、220 r/min和240 r/min)、初始pH值(6.8、7.0、7.2、7.4和7.6)、培养温度(25℃、28℃、30℃、34℃和37℃)进行优化, 培养24 h。利用DNS法测定发酵液壳聚糖酶活。

培养基成分的优化: 以加有0.5%胶体壳聚糖的KBM培养基为基础培养基, 分别用1%的葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖和甘露醇替代甘油; 分别用2%的酵母粉、胰蛋白胨、牛肉膏、 NH_4Cl 和尿素替代蛋白胨; 分别用0.3%的 $FeCl_3$ 、 K_2HPO_4 、 $LiSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnSO_4$ 和NaCl替代 $MgSO_4 \cdot 7H_2O + K_2HPO_4$; 考察不同碳源、氮源、无机盐对壳聚糖酶活的影响。按1.3.2优化后的培养条件培养24 h。分别测定发酵液壳聚糖酶活。

1.3.4 壳聚糖酶产酶培养基优化正交试验

通过单因素试验初步考查 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (A)、果糖(B)和酵母粉(C)添加量对菌株W1-32产壳聚糖酶的影响。在单因素试验的基础上, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 优化菌株W1-32产壳聚糖酶发酵培养基。

1.3.5 壳聚糖酶活力测定

取待测发酵液3 mL, 于4℃条件下8 000 r/min离心10 min, 得上清即为粗酶液。取1 mL粗酶液, 加0.1%的胶体壳聚糖1 mL, 30℃水浴保温15 min; 加入2 mol/L的NaOH溶液0.2 mL终止反应, 5 000 r/min离心5 min, 取上清液1 mL与1 mL的DNS试剂混合, 沸水浴5 min, 冷却, 加入蒸馏水, 定容至10 mL, 酶标仪测定 OD_{520nm} 值。

取粗酶液1 mL与1 mL的DNS试剂混合, 沸水浴5 min, 冷却后加入蒸馏水, 定容至10 mL, 酶标仪测定 OD_{520nm} 值, 以此为空白对照。根据氨基葡萄糖标准曲线和酶活力单位定义, 计算壳聚糖酶活力^[26]。

壳聚糖酶活力单位定义为: 在30℃条件下, 1 mL酶液每分钟产生相当于1 μ mol氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量为一个壳聚糖酶活力单位(U/mL)。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变条件的确定

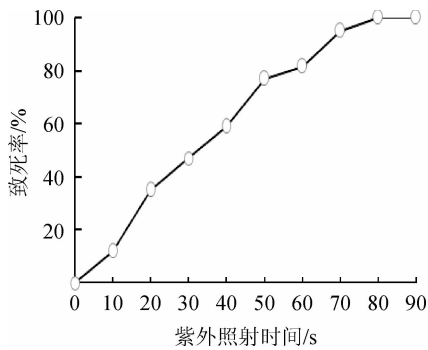


图1 紫外照射时间对菌体致死率的影响
Fig. 1 Effect of UV irradiation time on strain lethality

由图1可知,随着照射时间的延长,菌体致死率逐渐提高,60 s、70 s和80 s照射时间时菌体致死率分别为81.5%、95%和100%。通过对紫外线、微波、烷化剂等诱变剂的诱变结果统计发现,突变株正向突变多出现在菌体致死率为80%~90%时^[27]。因此,选择紫外诱变照射时间为60 s。

2.2 微波诱变条件确定

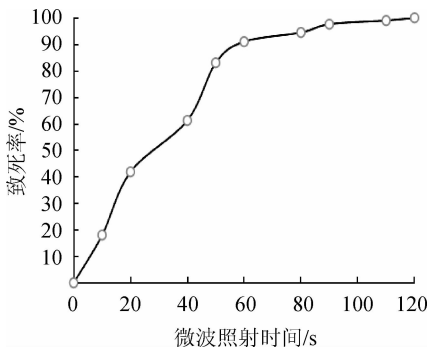


图2 微波照射时间对菌体致死率的影响
Fig. 2 Effect of microwave irradiation time on strain lethality

由图2可知,辐射时间为50 s时致死率为83%,辐射时间为60 s时致死率为91%。由于诱变致死率80%~90%之间突变菌株发生正突变概率高^[27]。因此,选择微波照射时间为50 s。

2.3 壳聚糖酶高产菌株的初筛及复筛

紫外诱变结果:菌株G10经紫外诱变后,初筛出72株高产壳聚糖酶菌株。利用摇瓶培养法进行高产菌复筛,筛选到一株壳聚糖酶活相对较高的突变菌株,编号为Z1-15。经测定,出发菌株G10产壳聚糖酶酶活为1.72 U/mL,菌株Z1-15产壳聚糖酶酶活为3.35 U/mL。

微波照射诱变结果:对紫外诱变筛选出的壳聚糖酶高产菌Z1-15进行微波照射诱变。筛选出102株突变株,经摇瓶发酵复筛测其壳聚糖酶活,选出一株产壳聚糖酶活较高的菌株W1-32,其产壳聚糖酶酶活为6.53 U/mL。

2.4 菌株W1-32产壳聚糖酶稳定性测定

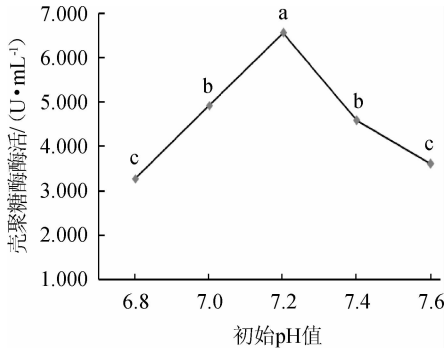
菌株W1-32经过10次传代和摇瓶培养,对其壳聚糖酶活分别进行测定,结果见表1。由表1可知,该菌株传代10次后产壳聚糖酶酶活为6.531 U/mL,产壳聚糖酶稳定。

表1 菌株W1-32不同传代次数壳聚糖酶活
Table 1 Chitosanase activity of different passages of strain W1-32

传代次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
壳聚糖酶活/(U·mL ⁻¹)	6.530	6.508	6.523	6.528	6.524	6.515	6.522	6.516	6.518	6.531

2.5 培养条件对菌株W1-32产壳聚糖酶酶活的影响

2.5.1 初始pH对菌株W1-32产壳聚糖酶酶活的影响



小写字母表示差异显著 ($P<0.05$);大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。下同。

图3 初始pH对菌株W1-32产壳聚糖酶酶活的影响

Fig. 3 Effect of initial pH on chitosanase activity produced by strain W1-32

由图3可知,随培养基初始pH的升高,菌株W1-32产壳聚糖酶酶活呈先增大后减小的趋势;培养基初始pH值为7.2时,菌株W1-32产壳聚糖酶酶活最高,为6.552 U/mL。因此,选择菌株W1-32产壳聚糖酶培养基的最佳初始pH值为7.2。

2.5.2 转速对菌株W1-32产壳聚糖酶活的影响

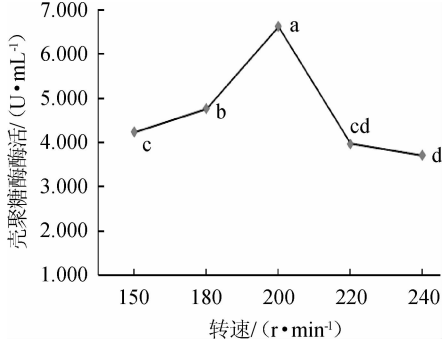


图4 转速对菌株W1-32产壳聚糖酶活的影响

Fig. 4 Effect of rotational speed on chitosanase activity produced by strain W1-32

由图4可知,随着培养转速的提高,菌株产壳聚糖酶活呈先升高后下降的趋势;转速为200 r/min时,菌株发酵液相对酶活最高,酶活为6.613 U/mL。因此,选择菌株W1-32产壳聚糖酶培养的最佳转速为200 r/min。

2.5.3 温度对菌株W1-32产壳聚糖酶活的影响

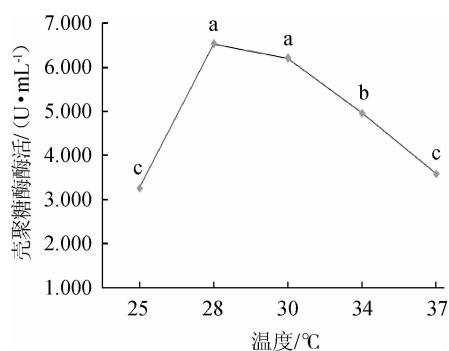


图5 温度对菌株W1-32产壳聚糖酶活的影响

Fig. 5 Effect of temperature on chitosanase activity produced by strain W1-32

由图5可知,随着培养温度升高,菌株W1-32产壳聚糖酶活呈先升高后降低的趋势;结果表明温度为28℃时,菌株W1-32产壳聚糖酶活性最高,酶活为6.530 U/mL。因此,选择菌株W1-32产壳聚糖酶的最佳培养温度为28℃。

2.6 培养基配方优化单因素试验

碳源、氮源、无机盐对菌株W1-32产壳聚糖酶活的影响见图6~图8。

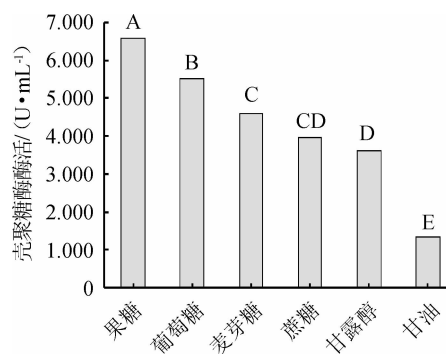


图6 碳源对菌株W1-32产壳聚糖酶活的影响

Fig. 6 Effect of carbon source on chitosanase activity produced by strain W1-32

由图6可知,不同碳源条件下酶活差异极显著($P<0.01$);结果显示以果糖为碳源时,该菌株产壳聚糖酶活最高,酶活为6.563 U/mL。因此最佳碳源为果糖。

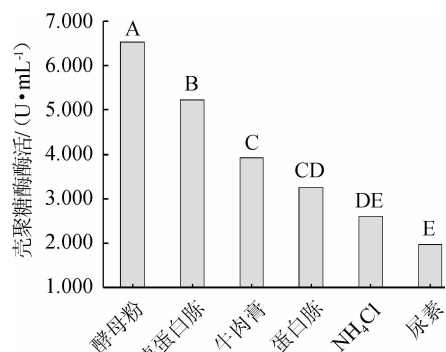


图7 氮源对菌株W1-32产壳聚糖酶活的影响

Fig. 7 Effect of nitrogen source on chitosanase activity produced by strain W1-32

由图7可知,不同氮源条件下菌株W1-32产壳聚糖酶活差异极显著($P<0.01$);结果表明以酵母粉为氮源时,菌株W1-32产壳聚糖酶活最高,酶活为6.532 U/mL。因此,选择菌株W1-32产壳聚糖酶的最佳氮源为酵母粉。

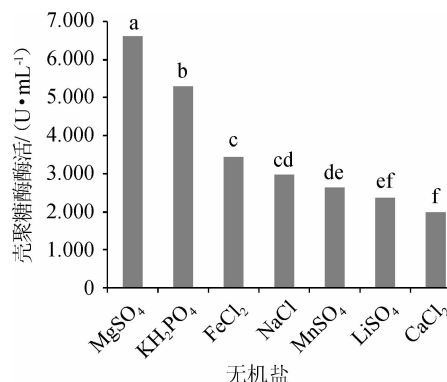


图8 无机盐对菌株W1-32产壳聚糖酶活的影响

Fig. 8 Effect of inorganic salts on chitosanase activity produced by strain W1-32

由图8可知,不同无机盐条件下菌株W1-32产壳聚糖酶活差异极显著($P<0.01$);结果显示所选的七种不同的盐中,添加MgSO₄·7H₂O时,菌株W1-32产壳聚糖酶活最高,酶活为6.612 U/mL。因此,选择菌株W1-32产壳聚糖酶的最佳无机盐为MgSO₄·7H₂O。

2.7 培养基配方优化正交试验

表2 菌株W1-32产壳聚糖酶培养基配方优化正交试验结果与分析
Table 2 Results and analysis of orthogonal experiments for medium formula optimization of chitosanase produced by strain W1-32

试验号	A	B	C	酶活力/(U·mL ⁻¹)
1	1 (0.2%)	1 (0.7%)	1 (1.5%)	7.105
2	1	2 (1.0%)	2 (2.0%)	11.293
3	1	3 (1.3%)	3 (2.5%)	8.232
4	2 (0.3%)	1	2	7.563
5	2	2	3	8.096
6	2	3	1	11.406
7	3 (0.4%)	1	3	7.643
8	3	2	1	8.645
9	3	3	2	9.532
k ₁	8.88	7.44	9.05	
k ₂	9.02	9.34	9.46	
k ₃	8.61	9.72	7.99	
R	1.25	6.86	4.42	
优水平组合	A ₂	B ₃	C ₂	
主次顺序	B>C>A			
优组合	A ₂ B ₃ C ₂			

由表2可知,3个因素对菌株W1-32产壳聚糖酶酶活影响大小顺序为 $R_B>R_C>R_A$,即果糖添加量影响最大,酵母粉添加量次之,MgSO₄·7H₂O添加量影响最小。综合各因素

培养基优水平组合为 $A_2B_3C_2$, 即 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3%, 果糖 1.3%, 酵母粉2.0%。

2.8 优化条件下菌株W1-32的壳聚糖酶活

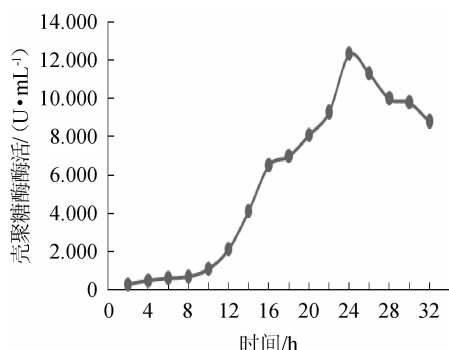


图9 菌株W1-32产壳聚糖酶活力曲线

Fig. 9 Curve of chitosanase activity produced by strain W1-32

由图9可知,在优化培养条件及培养基条件下,8 h前酶活增长缓慢;10~18 h酶活快速增长,24 h时酶活达最高11.82 U/mL,超过30 h后,酶活逐渐下降。

3 结论

以具有产壳聚糖酶能力的枯草芽孢杆菌G10为出发菌株,利用紫外和微波复合诱变法,选育高产壳聚糖酶突变株。筛选出一株酶活相对较高突变菌株W1-32菌株。通过对培养条件的优化,最佳产酶条件为:培养基初始pH值为7.2,最适宜培养转速200 r/min,温度28 ℃,最佳产酶培养基成分为:果糖1.3%、胶体壳聚糖0.5%,酵母粉2.0%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3%;优化后菌株W1-32产壳聚糖酶酶活为11.82 U/mL,是出发菌株的6.9倍。

参考文献:

- [1] JU Y Y, HUANG Y Y, XIAO M T, et al. Hypolipidaemic and antioxidant activities of chitoooligosaccharides in hyperlipidemic rats induced by high-fat diet[J]. *Int J Sci Technol*, 2019, 13(1): 72-81.
- [2] LI T, NA R, YU P, et al. Effects of dietary supplementation of chitosan on immune antioxidative function in beef cattle[J]. *Czech J Animal Sci*, 2015, 63(2): 38-44.
- [3] MOHAMED F H, ELSISSI A F, ISMAIL S A, et al. The potentiality of using chitosan and its enzymatic depolymerized derivative chito-oligosaccharides as immunomodulators[J]. *J Appl Pharmaceut Sci*, 2018, 8 (12): 132-139.
- [4] LYU Q Q, SHI Y H, WANG S, et al. Structural and biochemical insights into the degradation mechanism of chitosan by chitosannase OU01[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(9): 1953-1961.
- [5] QIN Z, LUO S, LI Y, et al. Biochemical properties of a novel chitosanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its use in membrane reactor[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2018, 97(11): 9-16.
- [6] GEREZ J R, BUCK L Y, MARUTANI V H B, et al. Effects of chito-oligosaccharide on piglet jejunal explants: an histological approach[J]. *Animal Consort*, 2018, 13(2): 1-6.

- [7] GUAN G P, ABUL KALAM AZAD M D, LIN Y S, et al. Biological effects and applications of chitosan and chito-oligosaccharides[J]. *Front Physiol*, 2019, 10(5): 1-10.
- [8] 焦富颖, 李小龙, 李宁. H_2O_2 法氧化降解壳聚糖制备壳寡糖[J]. *高分子通报*, 2018 (4): 88-94.
- [9] LI Y M, XU J C, XU Z M. A study of the structural properties and thermal stability of chitosanases EAG1 by molecular dynamics simulations[J]. *Biomed Sci Eng*, 2018, 11(11): 320-326.
- [10] 赵华, 樊龙星, 张朝正. 响应面法优化组成型壳聚糖酶酶解条件[J]. *中国酿造*, 2020, 39 (1): 165-169.
- [11] 章晔敏, 邵一凡, 熊妍妍, 等. 响应面法优化鹿皮曲霉 ZJOU-AC1 产壳聚糖酶的发酵条件[J]. *中国酿造*, 2016, 35 (11): 93-98.
- [12] SEO D J, LEE J H, SONG Y S, et al. Expression patterns of chitinase and chitosanase produced from *Bacillus cereus* in suppression of phytopathogen[J]. *Microbial Pathogen*, 2014, 73(8): 31-36.
- [13] 王琦, 崔阳, 刘进宝, 等. 壳聚糖酶的基因克隆表达及酶学性质研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38 (1): 147-155.
- [14] AFFES S, ARANAZ I, HAMDI M, et al. Preparation of a crude chitosanase from blue crab viscera as well as its application in the production of biologically active chito-oligosaccharides from shrimp shells chitosan[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 139(7): 558-569.
- [15] SAMROT A V, SHOBANA N, SURESH KUMAR S, et al. Production, optimization and characterisation of chitosanase of *Bacillus* sp. and its applications in nanotechnology[J]. *J Clust Sci*, 2019, 30(5): 607-620.
- [16] SU P C, HSUEH W C, CHANG W S, et al. Enhancement of chitosanase secretion by *Bacillus subtilis* for production chitosan oligosaccharides[J]. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2017, 79(10): 49-54.
- [17] ZHONG F, LI H, GONG J S, et al. Screening and characterization of a highly active chitosanase based on metagenomic technology[J]. *J Mol Catal B*, 2015, 111: 29-35.
- [18] MIROSHNIK A S, SLOZHENKINA M I, GORLOV I F, et al. The use of biologically active supplements as an alternative for application of antibiotics in production of pork[J]. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 2021, 677(3): 032009.
- [19] SINHA S, CHAND S, TTRIPATHI P. Recent progress in chitosanase production of monomer-free chitoooligosaccharides: bioprocess strategies and future applications[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 180(5): 883-899.
- [20] IISMAIL S A. Microbial valorization of shrimp byproducts via the production of thermostable chitosanase and antioxidant chitoooligosaccharides[J]. *Biocatal Agr Biotechnol*, 2019, 20(7): 1-10.
- [21] SONG Y S, SEO D J, JUNG W J. Characterization and antifungal activity of chitosanase produced by *Pedobacter* sp. PR-M6T[J]. *Microbial Pathogen*, 2019, 129(2): 277-283.
- [23] 沈萍, 陈向东. 微生物学试验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2015: 327-328.
- [24] 王俊芳, 王淼, 赵建波, 等. 芝麻立枯病拮抗菌的筛选方案优化[J]. *北方园艺*, 2011 (20): 55-57.
- [25] 诸葛健, 李华钟. 微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 292-295.
- [26] 张颖, 王俊芳. 芝麻立枯病生防菌 G10 菌株生防特性分析[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46 (9): 87-90.
- [27] 诸葛健, 李华钟, 王正祥. 微生物遗传育种学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016: 79-89.