

玉米芯诱导米根霉生成葡萄糖淀粉酶的研究

崔莉^{1,2}, 朱海军³, 李大婧^{1,2}, 高小女⁴, 郁萌⁴, 刘春泉^{1,2}

(1. 江苏省农业科学院农产品加工所, 江苏南京 210014) (2. 国家农业科技华东(江苏)创新中心农产品加工工程技术研究中心, 江苏南京 210014) (3. 江苏省农业科学院园艺研究所, 江苏南京 210014)
(4. 南京师范大学金陵女子学院, 江苏南京 210097)

摘要: 本研究发现, 玉米芯能够使菌株 CL-6 生成葡萄糖淀粉酶的时间缩短为原来的 1/3。于是, 对菌株 CL-6 进行鉴定, 并分析了玉米芯中的糖类成分以探究其中诱导因子的化学成分。菌株的鉴定采用形态学和 ITS 序列分子鉴定方法, 葡萄糖淀粉酶酶活测定方法采用葡萄糖氧化酶法, 发酵体系采用液体摇瓶发酵法, 玉米芯中糖类成分的测定采用薄层层析和高效液相示差折光检测法。结果表明, 菌株 CL-6 为米根霉属。玉米芯中水溶性成分中的糖类成分为蔗糖、葡萄糖、果糖和麦芽糖, 其含量为 520.33、242.67、228.67、30.33 mg/2.5 g 湿基。通过分析在米根霉 CL-6 液体发酵体系中加入玉米芯、玉米芯水溶性成分、玉米芯水溶性成分中的糖类成分以及玉米芯水溶性成分中分子量高于 8~14.4 kDa 成分对其葡萄糖淀粉酶酶活的影响, 本研究推测, 玉米芯中的诱导因子为分子量高于 8~14.4 kDa 的水溶性物质而非糖类成分。

关键词: 葡萄糖淀粉酶; 玉米芯; 糖; 米根霉; 诱导

文章编号: 1673-9078(2013)12-2865-2869

Rapid Induction of Glucoamylase by *Rhizopus oryzae* on Corncob

CUI Li^{1,2}, ZHU Hai-jun³, LI Da-jing^{1,2}, GAO Xiao-nv⁴, YU Yin⁴, LIU Chun-quan^{1,2}

(1. Institute of Farm Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)
(2. Engineering Research Center for Agricultural Products Processing, National Agricultural Science and Technology Innovation Center in East China, Nanjing 210014, China) (3. Jiangsu Horticulture Research Institute of Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China) (4. Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The glucoamylase produced by strain CL-6 was two-fold hastened when the organism was grown on media containing corncob. Strain CL-6 isolated from sweet starter was identified by morphological observation and ITS sequence analysis and indicated as *Rhizopus oryzae*. The enzymatic activity was measured by glucose oxidase-peroxide enzyme (GOD-POD). The sugar components in comcob were determined by thin-layer chromatography (TLC) and HPLC-RID. The sugars in the water-soluble components of the corncob were as follows: sucrose(520.33 mg/2.5 g wet resin), glucose (242.67 mg/2.5 g wet resin), fructose(228.67 mg/2.5 g wet resin) and maltose(30.33 mg/2.5 g wet resin). The effect of separately adding corncob, soluble fractions of corncob, sugar components and soluble fractions with molecular weight higher than 8~14.4 kDa on the activity of glucoamylase were analyzed. It was showed that glucoamylase formation was not enhanced when the organisms grew on media containing the four sugars, and the components with molecular weight exceeding 8~14.4 kDa in the water-soluble parts of corncob was the important factor in stimulating glucoamylase production by *Rhizopus oryzae* CL-6.

Key words: glucoamylase; corncob; sugar; *Rhizopus oryzae*; induction

葡萄糖淀粉酶又称淀粉葡萄糖苷酶或 γ -淀粉酶, 简称糖化酶。它是水解淀粉产生葡萄糖的主要酶类, 因此广泛应用在食品、医药、发酵等工业, 具有很高的商业价值。该酶可以由多种微生物产生: 如酵母属 (*Saccharmyces*), 曲霉属 (*Aspergillus*), 根霉属 (*Rhizopus*) 等, 但目前工业上广泛用于糖化酶的酶

制剂生产菌株仅来自于曲霉和根霉, 由于二者的转糖苷酶活性较低, 几乎能够将淀粉完全转化为葡萄糖^[1]。

目前, 国内外提高葡萄糖淀粉酶产量的方法主要集中在对于曲霉属和根霉属的基因调控, 即将葡萄糖淀粉酶的基因转化到细菌^[2]和酵母菌^[3-4], 以获得高效表达。但用于工业化生产仍存在许多问题, 如: 糖化酶在受体菌中的表达水平仍有限, 构建的表达载体不稳定等, 因此, 研究人员仍在寻求提高葡萄糖淀粉酶表达量的新途径。

葡萄糖淀粉酶是一种诱导酶, 与其它的诱导合成

收稿日期: 2013-10-11

作者简介: 崔莉 (1978-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事食品生物技术研究; 朱海军为并列第一作者

通讯作者: 刘春泉 (1959-), 男, 研究员, 主要从事农产品精深加工研究

一样,通过添加诱导物及对合成途径进行调控也是提高其表达量的有效方法。因而,阐明其诱导形成的机制和调节控制的原理,不仅有着理论上的意义,而且将为改变培养条件提高其产量,设计筛选模型选育高产菌种提供新的线索和手段。已有报道,麦芽糖和异麦芽糖能够诱导曲霉类大量生成淀粉水解酶类^[8-10]。鉴于本项目组在前期的研究中发现玉米芯能够使菌株 CL-6 生成葡萄糖淀粉酶的时间缩短为原来的 1/3,本研究假设玉米芯中存在葡萄糖淀粉酶的诱导因子可能为糖类成分。现拟对菌株 CL-6 进行鉴定,建立能够响应玉米芯中不同化学成分对菌株 CL-6 生成葡萄糖淀粉酶影响的液体发酵体系,以探究玉米芯中诱导因子的化学成分。本研究有望为葡萄糖淀粉酶合成的诱导调控机制研究提供有用借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

菌株 CL-6: 分离自甜酒曲。蔗糖、葡萄糖、果糖、异麦芽糖和麦芽糖标准品,购自 Sigma 公司,其它试剂均为分析纯试剂。

1.2 主要仪器

HYG-A 全温摇瓶柜,太仓实验设备厂;LRH-150 生化培养箱,上海益恒实验设备有限公司;SW-CJ-IFD 洁净工作台,苏净集团安泰公司;电热手提式压力蒸汽消毒器,上海医用核子仪器厂;DYY-2C 型电泳仪,北京六一仪器厂;PCR 仪,BIO-RAD;生物显微镜,尼康 H600L;高效液相色谱仪和示差折光检测器,美国 Waters 600。

1.3 方法

1.3.1 菌株 CL-6 的形态鉴定

将 CL-6 接种于 PDA 平板上,在 25 °C 下培养。每隔 1 d 观察一次,记录菌落形态特征和培养性状。采用插片培养法制作盖玻片,隔一定时间取出盖玻片,在显微镜下观察其产孢结构及孢子的形状和颜色,参照魏景超的《真菌鉴定手册》进行鉴定^[11]。

1.3.2 菌株 CL-6 的 ITS 鉴定

菌丝 DNA 提取: SK1375 真菌基因组 DNA 抽提试剂盒,上海生工生物工程技术服务有限公司。PCR 扩增和测序^[12]: 采用通用引物: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') 和 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 进行 ITS1-5.8S-ITS2 区域的扩增。50 μL PCR 扩增反应体系为: 模板 DNA 10 pmol、10×PCR

buffer (50 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5) 5 μL、Taq DNA 聚合酶 (Biotech) (5 μ/μL) 0.25 μL、dNTP (10 mM) 1 μL、引物各 1 μL, 补充去离子水至 50 μL。于 98 °C 预变性 5 min 后,反应程序为 95 °C 变性 35 s、55 °C 退火 35 s、72 °C 延伸 40 s, 共 35 个循环,于 72 °C 最终延伸 8 min。PCR 产物用 1% 凝胶电泳进行检测,送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序,测序结果采用 EditSeq 程序进行拼接。

1.3.3 薄层层析法分析玉米芯水溶性成分中的糖类物质

参考相关文献报道^[13-14]。硅胶板: 青岛海洋 GF254, 10×20 cm, 共 5 块, 使用前 105 °C 活化 30 min。每个层析缸放 2 块。显色剂: 1% 对甲基苯甲醛和 2% 硫酸溶于乙酸中。展开剂: 异丙醇: 正丁醇: 水 = 12:3:4, 展开长度为 8.5 cm。跑板结束后, 喷展开剂后, 在 110 °C 加热 10 min。标准糖溶液浓度 0.5~1%, 点样量 0.4~2 μL。点样点距离板底 1.5 cm, 点样斑点直径控制在 3~5 mm, 样品间距 1.5 cm。室温展开。待展开剂前沿走至距板顶 2 cm 时, 取出, 自然晾干。

1.3.4 高效液相色谱 (HPLC) 示差折光检测法玉米芯水溶性成分中的糖类物质

参考相关文献报道^[15-16]。糖柱 HPLC 示差折光检测法测定葡萄糖和果糖: 美国 Waters 600 高效液相色谱仪 (包括示差折光检测器); 色谱柱: Sugarpak1 柱 (6.5 mm×300 mm, 5 μm), 流动相为纯水, 流速 0.5 mL/min, 柱温 85 °C, 检测器示差折光检测器, 进样量: 10 μL, 外标法定量。氨基酸柱 HPLC 示差折光检测法测定麦芽糖、异麦芽糖和蔗糖: 美国 Waters 600 高效液相色谱仪 (包括示差折光检测器); 色谱柱: Spherisorb NH2 柱 (4.6 mm×250 mm); 流动相: 乙腈/水 (70/30); 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL, 外标法定量。

1.3.5 米根霉 CL-6 液体发酵体系

发酵方式为液体摇瓶发酵。发酵条件: 接种量为 1% 米根霉 CL-6 液体孢子液, 孢子数约为 10⁶ 个/毫升。温度为 25 °C, 转速为 120~180 r/min, 培养 20 d。取样时, 将摇瓶中发酵液过滤后, 测定上清液中葡萄糖淀粉酶的酶活。

加玉米芯组发酵培养基组成: 2 g 玉米淀粉, 2.5 g 玉米芯粉和 100 mL 蒸馏水, 装于 250 mL 摇瓶中, 加热至玉米淀粉糊化后, 121 °C 下灭菌 20 min。

未加玉米芯组: 2 g 玉米淀粉加入 100 mL 蒸馏水, 装于 250 mL 摇瓶中, 加热至玉米淀粉糊化后, 121 °C 下灭菌 20 min。

加玉米芯水溶性成分组: 2.5 g 玉米芯粉加入 100

毫升蒸馏水中,煮沸 20 min,四层纱布过滤,取滤液,蒸馏水定容为 100 mL,加入 2 g 玉米淀粉装于 250 mL 摇瓶中,加热至玉米淀粉糊化后,121 °C 下灭菌 20 min。

加玉米芯水不溶性成分组:2.5 g 玉米芯粉加入 100 毫升蒸馏水中,煮沸 20 min,四层纱布过滤,取滤渣,蒸馏水定容为 100 mL,加入 2 g 玉米淀粉装于 250 mL 摇瓶中,加热至玉米淀粉糊化后,121 °C 下灭菌 20 min。

未加玉米芯加玉米芯水溶性成分中糖类成分组:2 g 玉米淀粉加入 100 mL 蒸馏水,装于 250 mL 摇瓶中,加热至玉米淀粉糊化后,冷却,再加入蔗糖、葡萄糖、果糖和麦芽糖标准品,分别为 52.03、24.27、22.87 和 3.03 mg,121 °C 下灭菌 20 min。

加玉米芯水溶性成分中分子量高于 8~14.4 KD 化合物组:2.5 g 玉米芯粉加入 100 mL 蒸馏水中,煮沸 20 min,四层纱布过滤,取滤液,蒸馏水定容为 100 mL,装入 8~14.4 KD 透析袋中,加入 10 倍蒸馏水,4 °C 下透析 12 h,每 4 h 更换一次蒸馏水。取透析袋中液体,定容为 100 mL,加入 2 g 玉米淀粉,装于 250 mL 摇瓶中,加热至玉米淀粉糊化后,121 °C 下灭菌 20 min。

1.3.6 葡萄糖淀粉酶酶活测定方法

测定方法采用葡萄糖氧化酶-过氧化物法^[17]。采用南京建成公司的 Robio 葡萄糖测定试剂盒。0.1 M pH 4.6 醋酸钠缓冲液配制:5.4 g 醋酸钠置于 100 mL 烧杯中,加入 50 mL 蒸馏水,用冰醋酸调为 pH 4.6,用蒸馏水定容、摇匀。0.5% 可溶性淀粉溶液配制:称取 0.5 g 可溶性淀粉,置于 100 mL 烧杯中,加入 100 mL 蒸馏水,搅拌下加热至沸,保持 5 min,冷却至室温后转入 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容、摇匀。取 0.05 mL 0.1 M pH 4.6 醋酸钠缓冲液与 0.05 mL 0.5% 可溶性淀粉溶液混合后,50 °C 加热 10 min,加入适度稀释的过滤后发酵液,50 °C 加热 15 min 后,煮沸 10 min,取反应液 30 μL 与 3 mL 葡萄糖测定试剂盒的工作液混合,37 °C 加热 15 min,测定 505 nm 的吸光值。

2 结果与分析

2.1 菌株 CL-6 的形态特征

图 1 中 A 图为菌株 CL-6 在 PDA 培养基上生长的图片,菌落大小:遍布整个培养皿;菌丝颜色:白;匍匐菌丝:致密,平整,呈爬行扩散形生长;菌落质地:呈蛛丝网状;气生菌丝:接触到平皿盖,丰盈,呈顶端分支;孢子:生长在顶端分支顶上;孢子囊颜色:菌丝接种到平板上后第二天长出孢子囊为白色,3 d 后为黑色。图 1 中 B 图为菌株 CL-6 菌丝、孢子囊、孢囊梗和孢囊孢子的显微镜图片(×10),菌丝:发达,

无横隔有分支,显微镜下显示灰白色;孢子囊:球型;孢囊梗:直立或稍弯曲,褐色,壁粗糙,直径,幼期短,成熟后长。囊轴:呈半球型或卵圆型,淡褐色,壁光滑;孢囊孢子:球型,卵形或椭圆形大小不一;褐色或淡褐色,有线纹;假根:根状或手指状分支,部分与孢囊梗对生,褐色。

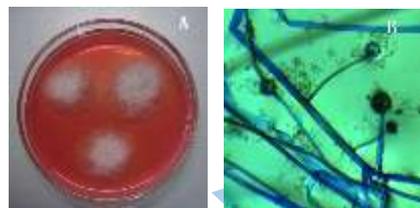


图 1 菌株 CL-6 的菌落 (A) 和菌丝形态 (B, ×10)

Fig.1 Colony (A) and morphology of mycelia (B, ×10) of CL-6

参照魏景超的《真菌鉴定手册》进行形态学鉴定,可初步确定菌株 CL-6 属接合菌亚门(Zygomycota)、接合菌纲(Zygomycetes)、毛霉目(Mucorales)、毛霉科(Mucoraceae)、根霉属(Rhizopus)。

2.2 菌株 CL-6 基于 ITS 序列的分子鉴定

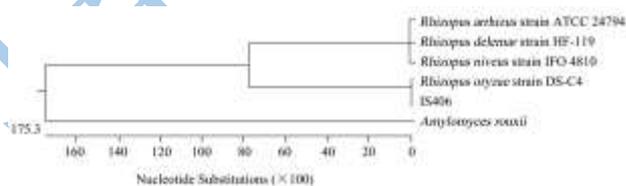


图 2 基于 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 序列的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of endophytic fungus CL-6 based on the sequence of ITS1-5.8S rDNA-ITS2

注:图中数值为 bootstrap 值。

通过 blastn 程序与 GenBank 中核酸序列进行比对分析,筛选与米根霉同源性较高的典型菌株用于系统发育分析(图 2)。ITS 区域进化树中,IS406 为米根霉 CL-6,其与属于接合菌亚门(Zygomycota)、接合菌纲(Zygomycetes)、毛霉目(Mucorales)、毛霉科(Mucoraceae)、根霉属(Rhizopus)的米根霉 *Rhizopus oryzae* strain DS-C4 具有很高的同源性,处于同一分支中,相似性达 100%,blastn 结果显示序列相似性为 99%,而且用来检验所计算的进化树分支可信度的 bootstrap 值(自展值)均为 100。可以判断菌株为米根霉属,分子鉴定结果与形态特征鉴定结果一致。

2.3 玉米芯能够迅速诱导米根霉 CL-6 产葡萄糖淀粉酶

本课题组在前期的研究中发现,在制作米酒过程中,加入玉米芯后,可以明显促进淀粉的糖化液化。

为深入研究上述现象，建立了米根霉液体发酵体系，并考察加入玉米芯粉后，葡萄糖淀粉酶的酶活变化。如图 3，在发酵第 5 d 时，加玉米芯组的葡萄糖淀粉酶的酶活（0.45 $\mu\text{mol}/\text{min}$ ）已与未加玉米芯组发酵 15 d 的葡萄糖淀粉酶（0.49 $\mu\text{mol}/\text{min}$ ）酶活差异不显著，即玉米芯能够使米根霉生成葡萄糖淀粉酶的时间缩短为原来的 1/3。由上述结果可知，玉米芯中存在能够诱导米根霉迅速生成葡萄糖淀粉酶的诱导因子。

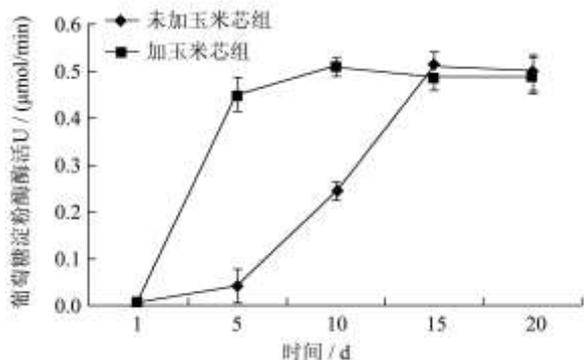


图 3 玉米芯对米根霉 CL-6 生成葡萄糖淀粉酶的影响
Fig.3 Effects of corncob on glucoamylase production by *Rhizopus oryzae* CL-6

2.4 玉米芯中诱导因子为水溶性成分

为了确定玉米芯中诱导因子是水溶性还是水不溶性。将玉米芯经水提取，过滤后，分为水溶性成分和水不溶性成分，分别加入米根霉液体发酵体系中，测定葡萄糖淀粉酶酶活。结果如图 4，加玉米芯可溶性成分组其发酵过程中葡萄糖淀粉酶的变化趋势与加玉米芯组变化趋势相同，可以推测玉米芯中诱导因子主要存在于玉米芯的水溶性成分中。

2.5 玉米芯中诱导因子不是水溶性成分中的糖类成分

糖类成分

Kato 和 Tanabe 均报道麦芽糖和异麦芽糖能够诱导曲霉生成淀粉水解酶^[8-9]，而且异麦芽糖的诱导作用强于麦芽糖。麦芽糖只有转化为异麦芽糖才能起到诱

导作用。我们假设玉米芯诱导因子为其水溶性成分中的麦芽糖或异麦芽糖。为验证假设，将玉米芯水溶性成分进行了薄层层析分析。结果如图 5，可初步推断玉米芯水溶性成分中含有麦芽糖，不含有异麦芽糖。于是，通过 HPLC 示差折光检测法进一步分析其中所含糖类成分的种类和含量，结果如表 1。

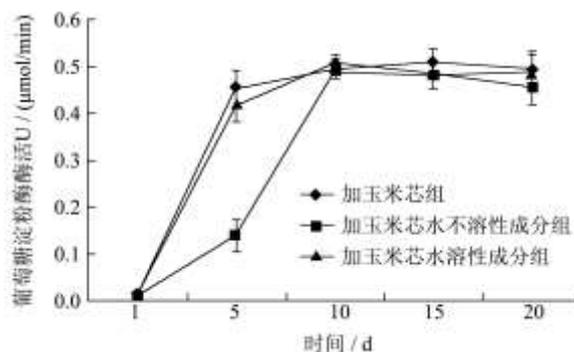


图 4 玉米芯中水溶性成分对米根霉 CL-6 生成葡萄糖淀粉酶的影响

Fig.4 Effects of water-soluble and water-insoluble components of corncob on glucoamylase production by *Rhizopus oryzae* CL-6

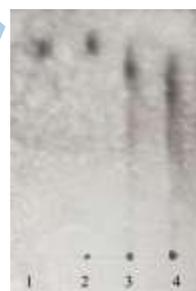


图 5 玉米芯中水溶性物质的薄层层析图

Fig.5 Thin layer chromatogram of the sugars in the water-soluble components of the corncob

注：1：麦芽糖标准品；2：玉米芯水提取液；3：麦芽糖和异麦芽糖混合标准品；4：异麦芽糖标准品。

由表 1 可知，玉米芯水溶性成分中含有蔗糖、葡萄糖、果糖和麦芽糖（含量依次降低），未检测到异麦芽糖。

表 1 玉米芯水溶性成分中糖类成分的种类及含量

Table 1 The sugars in the water-soluble components of the corncob

样品	异麦芽糖	麦芽糖	葡萄糖	果糖	蔗糖
玉米芯(湿基)/(mg/2.5 g)	ND	3.03±0.56	24.27±1.66	22.87±2.17	52.03±1.91

为了验证上述四种糖是否就是玉米芯中的诱导因子，我们比较了加玉米芯组、未加玉米芯组和未加玉米芯加玉米芯水溶性成分中糖类成分组的葡萄糖淀粉酶酶活的变化，如图 6。从下图可知，未加玉米芯组和未加玉米芯加了四种糖组的葡萄糖淀粉酶酶活变化

趋势相同，表明加入四种糖并未达到玉米芯的诱导作用。将表 1 中加入玉米芯后米根霉发酵体系中麦芽糖的含量（3.03 mg/mL）与 Kato 报道的能够起到诱导作用的麦芽糖的含量（3 mM 即 102.6 mg/mL）比较后^[8]，可知其含量远低于能够发挥诱导作用的浓度，我们推

测,可能是这四种糖,尤其是麦芽糖的含量过低未发挥诱导作用,所以排除了这几种单糖和二糖为诱导因子的可能。

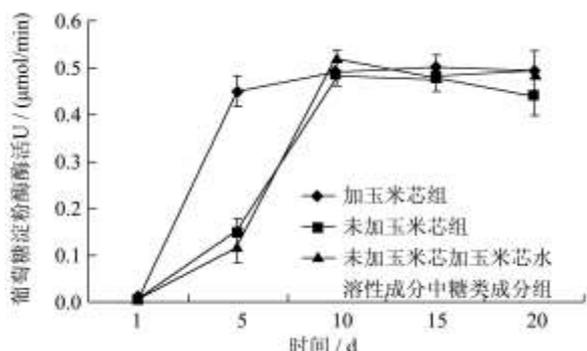


图6 玉米芯水溶性成分中所含糖类成分对米根霉 CL-6 生成葡萄糖淀粉酶的影响

Fig.6 Effects of the sugars in the water-soluble components of the corncob on glucoamylase production by *Rhizopus oryzae* CL-6

2.6 玉米芯中诱导因子的分子量大于 8~14.4 KD

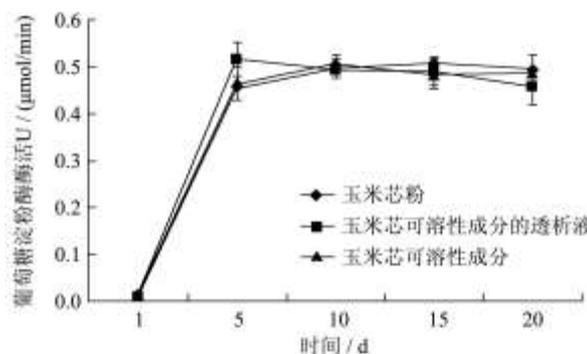


图7 玉米芯水溶性成分中分子量大于 8-14.4KD 化合物对米根霉 CL-6 生成葡萄糖淀粉酶的影响

Fig.7 The effects of the components with molecular weight exceeding 8-14.4KD in the water-soluble parts of corncob on glucoamylase production by *Rhizopus oryzae* CL-6

通过上述研究可知,玉米芯水溶性成分中小分子成分(可溶性单糖和二糖)不是诱导因子。为确定其分子量范围,采用规格为8~14.4 kDa的透析袋,透析掉小分子可溶性成分。比较了加玉米芯组、加玉米芯水溶性成分组和加玉米芯水溶性成分中分子量大于8~14.4 kDa 化合物组的葡萄糖淀粉酶酶活的变化。如图9,诱导因子为分子量大于8~14.4 kDa 的成分,这样的成分可能是多糖类或蛋白类物质。

3 结论

玉米芯可以迅速诱导一株分离自甜酒药的米根霉

CL-6 生成葡萄糖淀粉酶。玉米芯中的诱导活性物质主要存在于水溶性成份中。玉米芯的水溶性成分中的糖类物质主要有蔗糖、葡萄糖、果糖和麦芽糖,其含量为520.33、242.67、228.67、30.33 mg/L。但这些糖类成分不是诱导因子,推测可能是由于其在玉米芯中含量较低。玉米芯中诱导活性成分主要为分子量大于8~14.4 kDa 的物质,可能为蛋白类或可溶性多糖类成分。

参考文献

- [1] Mertens J A, Skory C D. Isolation and characterization of a second glucoamylase gene without a starch binding domain from *Rhizopus oryzae* [J]. Enzyme and microbial technology, 2007, 40(4): 874-880
- [2] Zheng Y, Xue Y, Zhang Y, et al. Cloning, expression, and characterization of a thermostable glucoamylase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2010, 87(1): 225-233
- [3] Xiao Z, Wu M, Grosse S, et al. Genome Mining for New α -Amylase and Glucoamylase Encoding Sequences and High Level Expression of a Glucoamylase from *Talaromyces stipitatus* for Potential Raw Starch Hydrolysis [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2013, 9: 1- 14
- [4] Li S, Zuo Z, Niu D, et al. Gene cloning, heterologous expression, and characterization of a high maltose-producing α -amylase of *Rhizopus oryzae* [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2011, 164(5): 581-592
- [5] Kato N, Murakoshi Y, Kato M, et al. Isomaltose formed by α -glucosidases triggers amylase induction in *Aspergillus nidulans* [J]. Current genetics, 2002, 42(1): 43-50
- [6] Tanabe O, Tonomura K. Studies on the amylase formation by *Aspergillus oryzae*. Part 1. On the effect of carbon sources on the amylase formation by *A. oryzae* 557 [J]. J Agric Chem Soc Jpn, 1954, 28: 227-231
- [7] Tonomura K, Suzuki H, Nakamura N, et al. On the inducers of α -amylase formation in *Aspergillus oryzae* [J]. Agric Biol Chem., 1961, 25:1-6
- [8] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海科学技术出版社,1979
- [9] Wei jing chao. Manual for Identification of Fungi [M]. Shanghai Science and Technology Press, 1979
- [9] 崔莉,董明盛,陈晓红,等.一株纤溶酶产生菌-蛹虫草的形态和分子鉴定[J].江苏农业学报,2010,26(3): 667-669
- Cui Li, Dong Ming-sheng, Chen Xiao-hong, et al. Morphological and Molecular Identification of a *Cordyceps militaris* Producing Thrombolytic Enzyme [J]. Jiangsu

- Journal of Agricultural Sciences, 2010, 26(3): 667- 669
- [10] 毛忠贵,朱利丹.用薄层层析法分析海藻糖[J].无锡轻工大学学报,1997,16(4):42-44
- Mao Z G, Zhu L D. On Assayed Trehalose by TLC [J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 1997, 16(4): 42-44
- [11] 张桂,李俊英,陈学武,等.薄层层析法测定纤维素材料水解液中混合糖的研究[J].理化检验.化学分册,2002,38(2): 81-84
- ZHANG Gui, LI Jun ying, CHEN Xue wu, et al. Study on the TLC Determination Mixed Sugar in Hydrolytic Solution of Plant Cellulose [J]. Physical Testing and Chemical Analysis Partb Chemical Analysis, 2002, 38(2): 81-84
- [12] 田艳玲,王浩,张曼玲,等.高效液相色谱法与化学法测定蜂蜜中果糖,葡萄糖,蔗糖,麦芽糖含量的比较与研究[J].食品科学,2005,26(10): 91-94
- Tian Y, Wang H, Zhang M, et al. Comparison and Research of HPLC and Chemical Method Determination Honey The Fructose, Glucose, Sucrose, Maltose Content [J]. Food Research and Development, 2005, 26(10): 91-94
- [13] 赵仁邦.高效液相色谱法测定枣中糖类物质[D].河北农业大学,2003
- Zhao Ren-bang. Determination of Carbohydrates in Chinese Jujube by Using HPLC [D]. Agricultural University of Hebei, 2003
- [14] Nguyen Q D, Rezessy-Szabó J M, Claeysens M, et al. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(3): 345-352