

# 一株产生淀粉分解酶犁头霉的分离鉴定及其酶学性质

秦臻<sup>1,2</sup> 蔡素梅<sup>1,2</sup> 黄钧<sup>2</sup> 周荣清<sup>1,2\*</sup>

(1. 四川大学制革清洁技术国家工程实验室 四川 成都 610065)

(2. 四川大学轻纺与食品学院 四川 成都 610065)

**摘要:** 从保宁麸醋曲中定向筛选得到一株产生淀粉分解酶的菌株 CQB43, 其酶活力为 105.2 U/mL, RDA 值达到 27.9%。通过形态观察和分子生物学鉴定确定该菌株为伞枝犁头霉 *Absidia corymbifera*。对该菌株分泌生淀粉酶酶学性质的研究表明, 该酶在 pH 为 4.0–5.6 的范围相对稳定, 最适 pH 是 5.0; 在 60 °C 以下的范围内具有较好的热稳定性, 最适作用温度为 40 °C。研究金属离子对其活力影响的结果表明,  $\text{Co}^{2+}$  对该生淀粉糖化酶有激活作用,  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  对该酶有抑制作用。

**关键词:** 生淀粉分解酶, 筛选, 鉴定, 酶学性质, 犁头霉

## Screening and identification of a novel rawstarch-digesting glucoamylase producing strain *Absidia* and its enzymatic property

QIN Zhen<sup>1,2</sup> CAI Su-Mei<sup>1,2</sup> HUANG Jun<sup>2</sup> ZHOU Rong-Qing<sup>1,2\*</sup>

(1. National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

(2. College of Light Industry, Textile & Food, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

**Abstract:** A novel strain which could produce raw starch-digesting glucoamylase was isolated from Baoning bran vinegar Daqu and numbered as CQB43. Its raw starch-digesting glucoamylase activity was 105.2 U/mL and the RDA value was 27.9%. The species attribution of the strain was confirmed to be *Absidia corymbifera* by the characterization of morphological, and the similarity of the nucleotide sequence of the 26S rDNA gene and ITS region gene of the strain. Then the enzyme characters of the crude extracts produced by *Absidia corymbifera* CQB43 were studied. The optimum pH for the enzyme

activity was 5.0, and it was very stable at the pH range about 4.0–5.6. The optimum temperatures was 40 °C. Besides, the enzyme was very stable at the temperature of less than 60 °C, as its remnant activities was about 88% after 2 hours at 60 °C. According to the research on enzyme activity affected by metallic ion, it was activated by  $\text{Co}^{2+}$ , whereas the activity was inhibited by  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Keywords:** Raw starch-digesting glucoamylase, Screening, Identification, Enzymatic property, *Absidia*

淀粉类原料的深加工长期以来是粮食与食品加工产业中的重要组成部分。传统的发酵工艺中, 蒸煮工段需要消耗大量的热能, 所耗的蒸汽占整个生产过程蒸汽消耗的 25%–30%<sup>[1]</sup>。耐酸性生淀粉分解酶是指在酸性环境下对未经蒸煮的生淀粉颗粒具有一定分解作用的酶类, 主要由一些细菌<sup>[2–3]</sup>及霉菌<sup>[4–5]</sup>分泌, 能够将发酵工艺中的淀粉糊化、液化、糖化等过程合并为一步直接进行糖化。目前, 国内外对于生淀粉分解酶的研究还处于起步阶段, 由于酶活力低和不稳定等因素限制, 生淀粉分解酶的工业化生产和实际应用还存在一定困难<sup>[6]</sup>。因此, 基于生淀粉降解能力微生物资源的开发不仅能促进传统酿造业的技术进步, 而且在农副产品的资源化及生物能源开发领域中具有广阔的应用前景。

保宁麸醋采用未经蒸煮的麸皮为主要原料制醋<sup>[7]</sup>, 在经过长期驯化的生产环境中, 富集了大量适应极端环境的微生物资源。醋曲中的主要微生物及酶的作用是在微酸和酸性环境中液化和降解小麦淀粉颗粒(生淀粉)。因此, 本文基于保宁麸醋醋曲筛选高活力生淀粉分解酶菌株的研究, 具有很强的针对性, 有益于利用和保护我国传统酿造微生物资源, 为改进传统酿造工艺及生淀粉分解酶的应用打下了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

醋曲样品由四川阆州醋业有限公司提供。琼脂糖: AMRESCO; Wide Range DNA Marker (500–15 000, TaKaRa); 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器

水平槽电泳仪: DYC P-31BN (六一仪器厂, 北京); 凝胶成像仪: Gel Doc XR (Bio-Rad, 美国);

Spectrumb22PC 可见分光光度计(Perkin Elmer<sup>TM</sup>, 美国); 高速冷冻离心机: TGL16M (湘麓离心机仪器有限公司, 长沙); 超净工作台: SW-CJ-2FD 型(苏州净化设备有限公司, 苏州); 电热恒温培养箱: DHP-9162 (上海一恒实验仪器有限公司, 上海); 恒温振荡培养器: QYC-2112 型 (上海福玛实验设备有限公司, 上海); 超级水浴恒温锅: CS501 (上海浦东荣科学仪器有限公司, 上海); 光学显微镜: CX31RTSF (Olympus, 日本)。

### 1.3 培养基

**1.3.1 常用培养基<sup>[8]</sup>:** PDA 培养基; 查氏培养基; 麦芽汁培养基。

**1.3.2 淀粉琼脂培养基(g/L)<sup>[9]</sup>:** 生小麦淀粉 30,  $\text{NaNO}_3$  2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, KCl 0.5,  $\text{FeSO}_4$  0.01, 琼脂 20, pH 自然,  $1.0 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。其中生小麦淀粉在 155 °C 下干热灭菌 2 h, 然后在 65 °C 下无菌操作加入。

**1.3.3 三角瓶固料培养基:** 黄豆粉 5%, 麸皮 95%, 水分 90% (占总干料量百分数), 500 mL 三角瓶装湿料 30 g,  $1.0 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

### 1.4 试验方法

**1.4.1 菌种定向分离与筛选:** 分别在醋曲曲块表面、边角和中心各取相同质量曲块小样, 粉碎, 充分混匀备用。将曲粉在无菌水玻珠瓶中打散, 经适当稀释后分别涂布于 PDA、麦芽汁和查氏培养基上, 以尽可能全面的收集醋曲中的霉菌。

示踪法筛选: 初筛: 将分离株斜面制成孢子悬浮液, 在无菌玻珠球的三角瓶中打散, 经适当稀释涂布在淀粉琼脂培养基上, 在 28 °C $\pm$ 1 °C 的恒温箱中培养 3–5 d, 根据透明圈直径与菌落直径之比值(H/C)挑选出待复筛的菌株。复筛: 将初筛得到的菌种接种到装有 30 g 麸皮培养基的三角瓶中, 30 °C $\pm$ 1 °C

培养 72 h, 待麸曲成熟测定生淀粉分解酶活力。

**1.4.2 生淀粉分解酶活力测定:** 粗酶液的制备: 准确称取 3 g 麸曲样品置于研钵中, 加入适量的蒸馏水研碎, 转移至 50 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容。混合均匀后置于  $40\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  的水浴中浸提, 每 5 min 摇匀一次, 保温 60 min 后取出用新华 2 号滤纸过滤, 滤液即为粗酶液。

降解生淀粉能力的测定: 根据参考文献[10]所述的方法: 于 25 mL 比色管中加入 2.0 mL 2.5% (W/V) 生小麦淀粉悬液, 2.0 mL pH 3.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.2 mol/L),  $40\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  预热 10 min。加入 0.5 mL 酶液,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  精确反应 30 min, 中间不断摇动, 反应结束加 0.5 mL 4% 的 NaOH 溶液终止反应。反应液 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液采用 DNS (3,5-二硝基水杨酸)法测定其还原糖含量。空白实验: 先加 0.5 mL 4% 的 NaOH 溶液, 再加入酶液, 作空白对照, 用以消除酶液和小麦淀粉中游离糖的影响。

降解糊化淀粉能力的测定: 用可溶性淀粉作为酶的作用底物, 测定方法与降解生淀粉活力的测定方法相同。

酶活力单位的定义: 在分析条件下, 1 min 释放 1  $\mu\text{g}$  还原糖(以葡萄糖计)的酶量定义为一个活力单位。

RDA 值(Raw starch digesting-ability)计算<sup>[10]</sup>: 即分解生淀粉和分解糊化淀粉酶活的比例:  $RDA(\%)=B/A\times 100$ 。式中: B: 降解生淀粉酶活; A: 降解糊化淀粉酶活。

**1.4.3 菌种形态观察:** 对分离纯化好的菌种采用点种法接种于 PDA 固体培养基中, 于  $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 72 h 进行观察记录, 从平板上挑取少量菌丝, 采用乳酸石碳酸棉兰法染色制片, 显微镜观察菌株孢子、孢子梗和菌丝的形态特征。

**1.4.4 菌种分子生物学鉴定:** 根据菌落和细胞形态观察的结果, 采用改良的 SDS 法<sup>[11]</sup>提取总 DNA, 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和分子量大小。以纯化的总 DNA 为模板, 正向引物 5'-GAGCGGATAAC

AATTTACACAGG-3', 反向引物 5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3', 完成 26S rDNA D1/D2 区域、ITS 全序列 PCR 扩增和测序。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): 模板 1  $\mu\text{L}$ , PCR Premix 25  $\mu\text{L}$ , D1/D2 Forward primer (ITS 序列为 ITS Forward primer)与 D1/D2 Reverse primer (ITS 序列为 ITS Reverse primer, 浓度均为 20 pmol/ $\mu\text{L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 23  $\mu\text{L}$ 。反应条件:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  0.5 min,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  0.5 min,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min。取 PCR 扩增产物 5  $\mu\text{L}$  进行 3% 琼脂糖凝胶电泳。

采用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 (Code No. DV805A)切胶回收目的片段, 参考文献[12]的方法, ABIPRISMTM3730DNA 测序仪测定其序列。利用 NCBI 的 BLAST 进行序列比对, 与 GenBank 数据库做相似性分析, 通过 ClustalX 程序进行多序列匹配比对, 以 26S rDNA D1/D2 区和 ITS 区序列的同源性亲近为基础, 通过 MEGA 4.0 软件以 Neighbor-Joining 法建立该菌株的系统发育树图。

**1.4.5 菌种生淀粉分解酶酶学性质初探:** (1) 温度对酶活力的影响。取一定量的粗酶液, 将酶促反应分别控制在  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  进行, 在 pH 3.6 的柠檬酸盐缓冲液条件下按照生淀粉分解酶的酶活力测定方法测定酶活力(温度高于  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 则生淀粉将糊化, 生淀粉分解酶将失去意义)。

(2) pH 对酶活力的影响。配制 pH 分别为 3.0、3.6、4.0、4.6、5.0、5.6 和 6.0 的柠檬酸盐缓冲液, 在不同 pH 缓冲液中,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴条件下按照生淀粉分解酶的酶活力测定方法测定酶活力。

(3) 酶的热稳定性研究。取一定量的粗酶液, 分别在  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴条件下保温处理, 每隔 10 min 取样一次, 冷却稀释, 在 pH 3.6、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下按照生淀粉分解酶的酶活力测定方法立即测定酶液残余酶活力。

(4) 酶的 pH 稳定性研究。将粗酶液用 pH 值分别为 2.6、3.6、4.6、5.6、6.6 和 7.6 的柠檬酸盐缓

冲液稀释, 在 40 °C 水浴中保温 30 min, 于 pH 3.6、40 °C 条件下按照生淀粉分解酶的酶活力测定方法测定酶液残余酶活力。

(5) 金属离子对生淀粉分解酶酶活力的影响。配置一定浓度的  $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{BaCl}_2$ 、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{CaCl}_2$  溶液, 将酶液分别用不同金属离子溶液稀释, 使金属离子最终浓度为 10 mmol/L, 40 °C 水浴保温 30 min。以用蒸馏水稀释的酶液相对酶活为 100, 在 pH 3.6、40 °C 条件按照生淀粉分解酶的酶活力测定方法, 测定不同酶液相对酶活力。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产生淀粉分解酶霉菌的筛选

采用示踪技术从经形态观察及镜检挑选出 76 株霉菌菌株中, 筛选得到 11 株  $H/C$  值较大菌株, 经麸皮三角瓶复筛得到 8 株具有较高分解生淀粉能力的菌株, 比较复筛得到的 8 株霉菌生淀粉降解能力  $RDA$  (Raw starch digesting-ability), 编号为 CQB43 的菌株  $RDA$  值较高(表 1)。

表 1 生淀粉分解酶高产菌株初筛结果 Table 1 Screening of stains used in the production of acid raw-starch digesting gluconamylase			
No.	Raw starch-digesting gluconamylase activities (U/mL)	Pastegranule-digesting gluconamylase activities (U/mL)	$RAD$ (%)
CQB43	105.2	376.7	27.9
CQA2	68.5	415.9	16.4
CQB31	73.3	420.2	17.4
CQA31	61.8	392.1	15.7
CQA32	70.9	416.8	17.0
CQB34	54.5	325.3	16.7
CQA36	100.6	390.6	25.7
CQA43	57.2	387.5	14.8

### 2.2 高产菌株形态学观察

CQB43 号菌株形态学观察结果如图 1 所示, CQB43 菌株菌落生长迅速, 菌丝呈白色长毛状, 不产色素, 无匍匐菌丝和假根, 菌丝无隔膜、有较多分枝, 顶端膨大形成圆形的孢子囊。

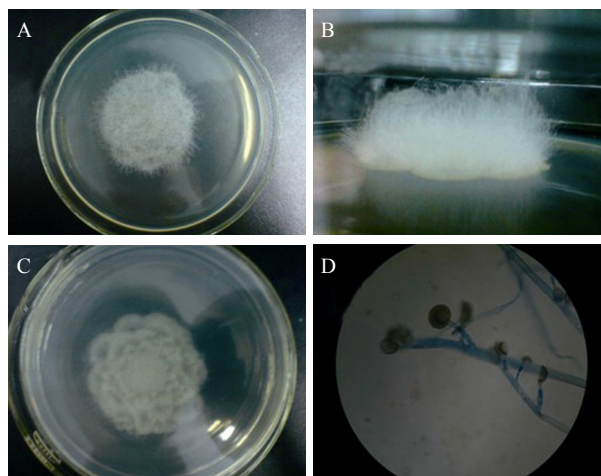


图 1 CQB43 菌株形态照片(72 h)

Fig. 1 Morphological characteristics of the strain CQB43 (72 h)

注: A: 正面; B: 侧面; C: 背面; D: 40 倍镜检。

Note: A: Front; B: Side face; C: The back; D: Micrograph  $\times 40$ .

### 2.3 高产菌株分子生物学鉴定

对 CQB43 菌株的 PCR 扩增产物进行了序列测定(GenBank 登录号: HQ456539)。26S rDNA D1/D2 区核苷酸序列全长为 671 bp, ITS 区序列的核苷酸序列全长为 720 bp, 将该序列在 NCBI 上用 BLAST 进行同源性比较并用 Chromas 软件与 GenBank 中的相关序列进行多序列同源性分析。构建系统发育树(图 2), CQB43 菌株在 26S rDNA D1/D2 区序列与编号为 AB363769 (*Absidia corymbifera*)的菌株亲缘关系最近, 相似度为 95%。而该菌株在 ITS 区序列与编号为 EU409804 (*Absidia corymbifera*)的菌株亲缘关系最近, 相似度为 99%。因此, 结合形态特征、26S rDNA 和 ITS 的测序结果, 分离株 CQB43 被鉴定为伞枝犁头霉 *Absidia corymbifera* 并命名为 *Absidia corymbifera* CQB43。

### 2.4 高产菌株酶学性质初探

2.4.1 温度对酶活力的影响: 如图 3 所示, 生淀粉酶在 40 °C–60 °C 的范围内活力相对稳定, 最适作用温度为 40 °C。该结果表明, 此菌株分泌的生淀粉分解酶在 40 °C–60 °C 的范围, 即酿醋及淀粉加工等酿造工艺所需的温度范围, 具有较高的反应活力。

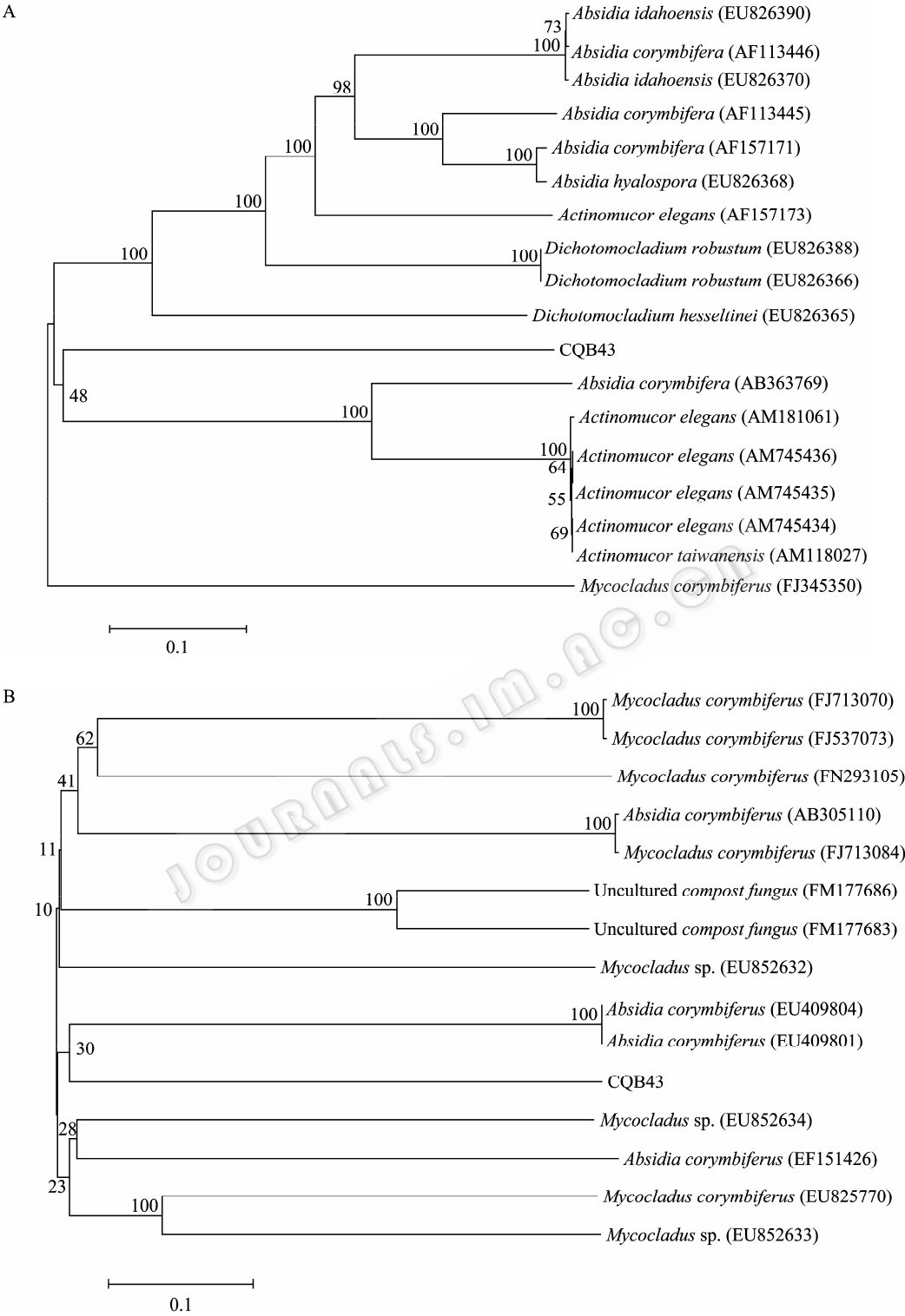


图 2 CQB43 菌株 26S rDNA D1/D2 区系统发育树(A), ITS 区系统发育树(B)

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 26S rDNA D1/D2 (A) and ITS (B) domain sequences of strain CQB43

Note: Number in parentheses represents the sequences accession number in GenBank. The numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap based on 1 000 resampled data sets. Bar, 10% sequence divergence.

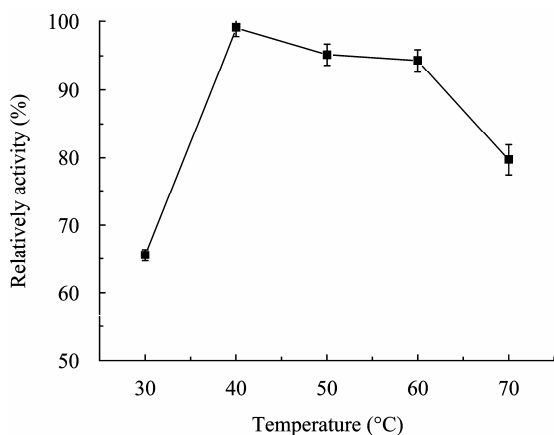


图3 温度对酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the enzymatic activity

**2.4.2 pH 对酶活力的影响:** 大多数糖化酶在酸性和中性的条件下才具有活性, 最适作用 pH 一般在 4.0–5.0 的范围<sup>[13]</sup>。pH 对该生淀粉分解酶活力的影响如图 4 所示。该酶的最适作用 pH 为 5.0。在 pH 为 3.6 时, 酶活为最适 pH 时酶活的 60.5%, 表明该酶在微酸性环境下具有良好的应用前景。与中温  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶作用过程比较, 该酶在对生淀粉的利用及过程的调控更具特性<sup>[14]</sup>。

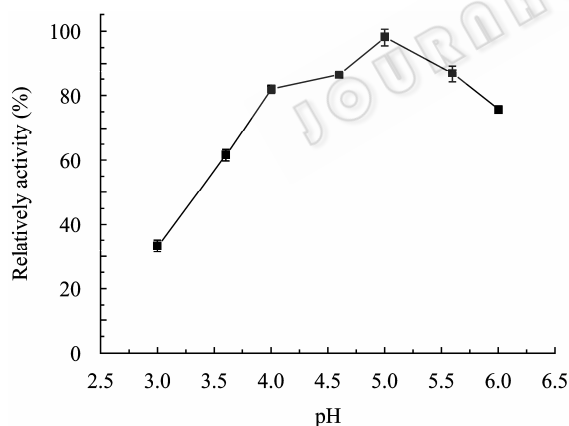


图4 pH 对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of pH on the enzymatic activity

**2.4.3 酶的热稳定性研究:** 通常真菌来源的糖化酶热稳定性较酵母更好, 细菌来源的糖化酶耐热性要优于真菌<sup>[15]</sup>。试验结果显示(图 5)该酶在 60 °C 以内的范围具有较好的稳定性, 60 °C 保温 1 h 后, 残余酶活仍达到 88.36%。而在 60 °C 以上时热稳定性较差, 70 °C 保温 1 h 酶活仅剩不足 50%。

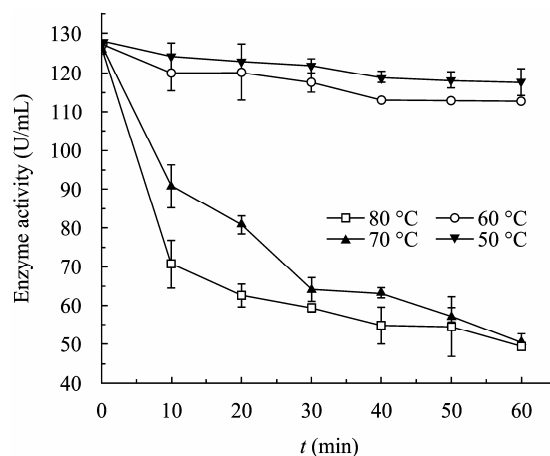


图5 酶的热稳定性

Fig. 5 Heat-resistance of the enzyme

**2.4.4 酶的 pH 稳定性研究:** 试验结果表明(图 6)该生淀粉分解酶在 pH 3.6 以上的缓冲体系中均十分稳定, 放置 30 min 后酶活均在 75%以上, 在偏中性环境中基本不失活, 表明该生淀粉分解酶具有一定的耐酸能力, 能够在微酸性环境下保持稳定而发挥其功效。与郭爱莲等人<sup>[16]</sup>报道的生淀粉酶一般在 pH 4.0–7.0 的缓冲体系中较稳定相吻合。

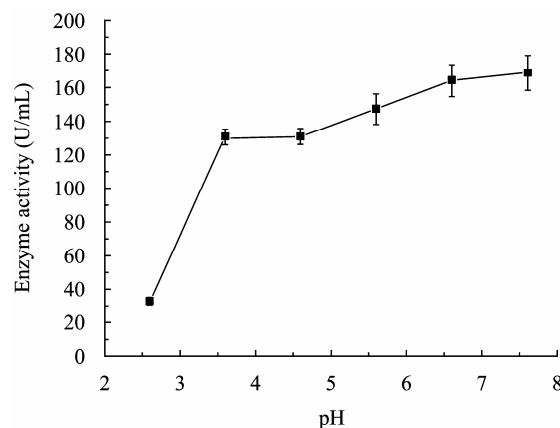


图6 酶的 pH 稳定性

Fig. 6 pH value-resistance of the enzyme

**2.4.5 金属离子对生淀粉分解酶酶活力的影响:** 金属离子对该耐酸生淀粉分解酶的酶活力影响如图 7 所示。 $\text{Co}^{2+}$ 离子对该酶有一定激活作用,  $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 对该酶基本无影响。 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 对该酶有抑制作用, 其中  $\text{Fe}^{3+}$ 离子对该酶有强烈抑制作用, 含浓度为 10 mmol/L  $\text{Fe}^{3+}$ 的酶液活力仅剩不足 5%。

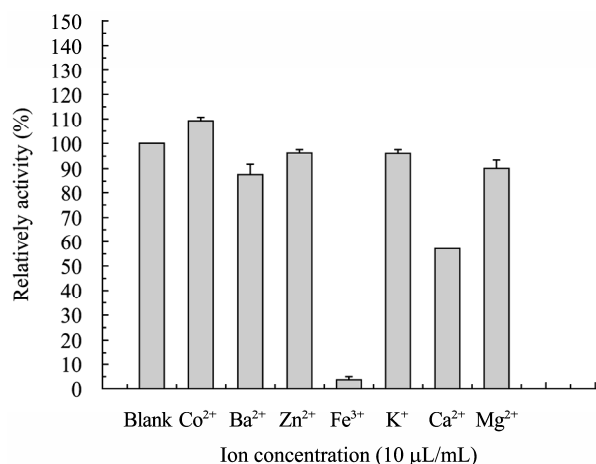


图7 金属离子对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of metal ions on the enzymatic activity

### 3 结论

(1) 采用菌种筛选示踪技术并结合底物特点,从保宁麸醋醋曲中筛选得到一株生淀粉分解酶高产菌株,固态发酵产酶在现有报道中处于较高水平<sup>[13]</sup>,其固体麸曲浸出粗酶液在 pH 3.6, 反应温度 40 °C 条件下,分解生淀粉酶活力达到 105.2 U/mL(粗酶液)。

(2) 分离株经形态学鉴定及 26S rDNA D1/D2 区和 ITS 区的测序结果表明该菌株为伞枝犁头霉 *Absidia corymbifera*, 并命名为 *Absidia corymbifera* CQB43。国内外文献报道产生淀粉分解酶的菌株较多,但犁头霉产生淀粉分解酶的报道尚属首例。

(3) 对该菌株所产生淀粉分解酶酶学性质的初步探讨表明该酶的最适反应温度为 40 °C, 最适反应 pH 值为 5.0, 该菌株所产生的淀粉酶热稳定性较好, 60 °C 处理 1 h 酶活力仍能保持 88.36%, 有利于生淀粉分解酶的进一步提纯精制和工业化的应用。Co<sup>2+</sup> 离子对该酶有一定激活作用, Fe<sup>3+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 对该酶有抑制作用。

### 参 考 文 献

- [1] 方善康, 朱明田. 无蒸煮生淀粉酒精发酵研究[J]. 食品与发酵工业, 1988(2): 13-19.
- [2] Goyal N, Gupta JK, Soni SK. A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use

in the direct hydrolysis of raw potato starch[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(7): 723-734.

- [3] Gangadharan D, Nampoothiri KM, Sivaramakrishnan S, et al. Biochemical characterization of raw-starch-digesting  $\alpha$  amylase purified from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 158(3): 653-662.
- [4] Yamada R, Bito Y, Adachi T, et al. Efficient production of ethanol from raw starch by a mated diploid *Saccharomyces cerevisiae* with integrated  $\alpha$ -amylase and glucoamylase genes[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 44(5): 344-349.
- [5] Omenu AM, Akpan I, Bankole MO, et al. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil[J]. African Journal of Biotechnology, 2005, 4(1): 19-25.
- [6] 谢慧玲, 阮森林, 刘亮伟, 等. 酸性生淀粉酶产生菌的筛选及酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(10): 85-87.
- [7] 尚英. 闻中保宁醋传统生产工艺浅析[J]. 中国酿造, 2003(6): 32-33.
- [8] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [9] 武晋海. 山西老陈醋大曲微生物种类及主要生物活性的研究[D]. 山西农业大学硕士学位论文, 2004.
- [10] 谢舜珍, 严自正, 张树政. 生淀粉酶产生菌的分离和筛选[J]. 微生物学通报, 1992, 19(5): 267-270.
- [11] 李绍兰, 周斌, 杨丽源, 等. 真菌 DNA 提取方法的改良[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2002, 24(6): 471-472.
- [12] Chang PK, Ehrlich KC, Hua SST. Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108(2): 172-177.
- [13] 肖长清. 生淀粉糖化酶产生菌的分离筛选及其产酶条件[D]. 中国科学院成都生物研究所硕士学位论文, 2005.
- [14] Niaz M, Iftikhar T, Tabassum R, et al.  $\alpha$ -Amylase production by *Bacillus licheniformis* under solid state fermentation conditions and its cross linking with metalosalts to confer thermostability[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2010, 12(5): 793-795.
- [15] Pandey A, Nigam P, Soccol CR, et al. Advances in microbial amylases[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2000, 31(2): 135-152.
- [16] 郭爱莲, 郭延巍, 杨琳, 等. 生淀粉糖化酶的菌种筛选及酶学研究[J]. 食品科学, 2001, 22(10): 45-48.