

研究报告

甘油对粒毛盘菌 DP5 胞外多酚积累的影响

杨柳* 曹焕英 孙丹宇 邓杰勇 吴俊贤 叶明

(合肥工业大学 生物与食品工程学院 安徽 合肥 230009)

摘要:【目的】探明以甘油为碳源促进粒毛盘菌 DP5 积累多酚的可能原因。【方法】对碳源种类、甘油浓度、曲酸、抑制剂和前体等对多酚产量和生物量的影响进行分析。【结果】以甘油为碳源，能显著提高粒毛盘菌胞外多酚产量。甘油浓度为 20 g/L 时，胞外多酚产量最高，达到 0.664 g GAE/L，并在发酵液中检测到曲酸，其含量为 0.25 g/L。向以蔗糖为碳源的发酵液添加曲酸，胞外多酚含量从 0.209 g GAE/L 提高至 0.376 g GAE/L。以甘油为碳源的发酵液中，酚氧化酶活性较低。粒毛盘菌 DP5 通过莽草酸途径和聚酮途径合成多酚，甘油有利于莽草酸途径和聚酮途径前体物质的合成。【结论】粒毛盘菌以甘油为碳源合成出曲酸，曲酸抑制多酚向黑色素的转化；甘油促进多酚前体的合成，从而提高了粒毛盘菌胞外多酚的积累量。

关键词: 粒毛盘菌，胞外多酚，曲酸，莽草酸途径，聚酮途径

Effect of glycerol on extracellular polyphenols accumulation in *Lachnum* DP5

YANG Liu* CAO Huan-Ying SUN Dan-Yu DENG Jie-Yong WU Jun-Xian YE Ming

(College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009, China)

Abstract: [Objective] The possible relationships between glycerol and the extracellular polyphenols (EP) production from *Lachnum* DP5 were explored initially. [Methods] The influences of various carbon sources, glycerol concentration, kojic acid, inhibitors and precursors on EP production and biomass were investigated. [Results] The EP accumulation was obviously increased by the addition of glycerol. The maximum EP content reached 0.664 g GAE/L when using 20 g/L glycerol as the carbon source. Meanwhile, kojic acid was produced, and its yield was 0.25 g/L. The EP yield increased from 0.209 g GAE/L to 0.376 g GAE/L by the addition of kojic acid into the sucrose-containing medium. The phenoloxidase activity was lower in the fermented glycerol-containing medium than that in the fermented sucrose-containing medium. The EP from *Lachnum* DP5 was biosynthesized via the shikimate and polyketide pathways. The biosynthesis of precursors of the shikimic acid and polyketide pathways were improved by glycerol. [Conclusion] Glycerol stimulated the biosynthesis of relative precursors and inhibited the bioconversion of polyphenols to melanin. Thus, EP accumulation was

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31270060); Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship of HFUT (No. 2014CXCYZ041)

*Corresponding author: Tel: 86-551-62919368; E-mail: yangliu199@163.com

Received: March 18, 2015; Accepted: May 11, 2015; Published online (www.cnki.net): September 09, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270060); 合肥工业大学大学生创新创业训练项目(No. 2014CXCYZ041)

*通讯作者: Tel: 86-551-62919368; E-mail: yangliu199@163.com

收稿日期: 2015-03-18; 接受日期: 2015-05-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-09-09

boosted by the addition of glycerol as carbon source.

Keywords: *Lachnum*, Extracellular polyphenol, Kojic acid, Shikimate pathway, Polyketide pathway

多酚是指分子结构中含有多个酚羟基化合物的总称,按结构可分为酚酸类、类黄酮类、二苯乙烯类、木酚素等化合物。天然多酚具有抗氧化、抗辐射、抗肿瘤、降血压等多种生理活性,是比较理想的药物和保健食品基料,已引起全球的极大关注。利用微生物发酵生产多酚,不受地域、季节限制,并具有周期短、易产业化、成本低的优点,将成为生产天然多酚的发展方向,其中具有活性的真菌多酚令人瞩目。对真菌发酵产多酚的研究主要集中在桦褐孔菌和桑黄,对其营养调控与代谢调控已有一定了解。在培养基中添加甘蔗渣、麦秸、稻秆等木质纤维素物质能提高桦褐孔菌胞内、胞外多酚的含量^[1];在桦褐孔菌液体发酵过程中添加硝普钠(NO 供体)、激发子(霉菌提取物)和茉莉酸能促进胞内、胞外多酚的合成^[2-5]。

粒毛盘菌(*Lachnum*)属于盘菌纲(Discomycetes)柔膜菌目(Helotiales)晶杯菌科(Hyaloscyphaceae),在深层发酵条件下可以产生多酚物质^[6],但产量一直较低。前期研究发现粒毛盘菌 DP5 以甘油为碳源能显著提高发酵液中抗氧化多酚的产量。甘油对真菌多酚合成的影响还未见报道,本论文从多酚转化和多酚生物合成途径两个方面对甘油促进粒毛盘菌合成多酚原因进行了分析,以期对真菌多酚的开发应用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

粒毛盘菌 DP5 菌株,子实体采集自中国云南省,由合肥工业大学微生物资源与应用研究室分离保藏。

蔗糖、甘油、EDTA、氯化镁、邻苯二酚、甲醇、乙酸等试剂购自国药集团化学试剂公司;酵母粉、没食子酸、碘乙酰胺、Folin-Ciocalteu 试剂、辛伐他汀、钠型强酸性阳离子交换树脂 001X7 等购自上海生工生物公司。

1.2 培养基

种子培养基(g/L):蔗糖 20,酵母粉 5,胰蛋白胨 5, pH 自然。

发酵培养基(g/L):甘油 20,酵母粉 2,氯化镁 0.5, pH 自然。

培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 后使用。

1.3 培养方法

将保藏菌种接种在马铃薯蔗糖平板上,28 °C 培养 4 d。打孔器接种直径 8 mm 的菌块于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,28 °C、120 r/min 振荡培养 2 d。用接种环挑一环种子液中菌体于装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,30 °C、150 r/min 振荡培养 6 d,测胞外多酚含量及生物量。

1.4 曲酸对多酚发酵的影响

用蔗糖代替发酵培养基中的甘油配制发酵培养基。培养 2 d 后添加曲酸,使曲酸终浓度分别为 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 g/L,发酵培养 6 d 后测定生物量和胞外多酚含量。

1.5 抑制剂对多酚合成的影响

EDTA、碘乙酰胺、辛伐他汀溶液分 2 次在培养 2 d 和 3 d 时添加。发酵液中 EDTA 添加的终浓度分别为 5、10、20 mmol/L;碘乙酰胺终浓度分别为 0.2、1.0、2.0 mmol/L;辛伐他汀终浓度分别为 0.15、0.30、0.45 mmol/L。

1.6 前体对胞外多酚合成的影响

在发酵培养 2 d 和 3 d 时分 2 次等量添加各前体,使终浓度为 12 mmol/L,发酵培养 6 d 后测定生物量和胞外多酚含量。

1.7 生物量的测定

将发酵液抽滤后,用去离子水冲洗 2 遍菌体,55 °C 烘至恒重后称重。

1.8 胞外多酚测定

因发酵液中含有的少量游离氨基酸会干扰多

酚的测定, 需要将发酵液进行预处理以除去游离氨基酸。将除去菌体的发酵液以流速 1 mL/min 通过装有钠型通用性强酸性阳离子交换树脂 001X7 的层析柱, 收集流出液。用 Folin-Ciocalteu 法测定多酚含量^[7], 用没食子酸制作标准曲线, 胞外多酚含量以没食子酸当量计。

1.9 曲酸测定

利用 Shimadzu LC-6AD 测定。Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇(A)+1%乙酸(B), 流速 1.0 mL/min, 梯度洗脱: 0–10 min, A:B=10:90–30:70, 检测波长 268 nm, 柱温 25 °C。

1.10 酚氧化酶活性^[8]

按发酵液抽滤除菌体, 取滤液。反应体系为 3 mL, 含 0.2 mol/L 邻苯二酚的溶液 2 mL (用 0.1 mol/L pH 6.5 的磷酸钠盐缓冲溶液配制), 加入 1 mL 滤液以启动反应, 30 °C 测定前 10 min 的 OD_{525} 变化。以每分钟内吸光值变化 0.01 个单位记为 1 个活性单位(U)表示。

1.11 还原糖测定

DNS 法比色测定。发酵液过滤取滤液, 适当稀释。取 2 mL 稀释液, 加入 3,5-二硝基水杨酸试剂 1.5 mL, 混匀, 沸水浴 5 min, 冷却至室温。用蒸馏水定容至 25 mL, 充分混匀, 在 540 nm 处测吸光值。以葡萄糖制作标准曲线, 还原糖含量以葡萄糖当量计。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对粒毛盘菌 DP5 多酚产量和生物量的影响

将发酵培养基中的碳源分别改用葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、羧甲基纤维素钠、果糖、甘油、乳糖、糊精、玉米粉、乙酸钠等, 添加量均为 20 g/L, 30 °C、150 r/min 振荡培养 6 d 后, 测定生物量和胞外多酚含量, 结果见表 1。

以羧甲基纤维素钠为碳源时, 粒毛盘菌 DP5 生长微弱, 说明菌株难以利用纤维素。以乳糖、乙酸

表 1 不同碳源对粒毛盘菌生物量和胞外多酚产量的影响

Table 1 Effect of carbon sources on EP production and biomass by *Lachnum* DP5

碳源 Carbon source	生物量 Biomass (g/L)	多酚含量 EP (g GAE/L)
CMC-Na	0.973±0.012	0.111±0.005
Fructose	5.730±0.325	0.226±0.090
Glucose	5.105±0.050	0.241±0.040
Lactose	2.140±0.085	0.174±0.021
Sucrose	5.835±0.219	0.217±0.024
Dextrin	6.090±0.099	0.083±0.009
Starch	5.805±0.025	0.175±0.075
Corn flour	8.115±0.445	0.169±0.039
Glycerol	5.455±0.191	0.664±0.034
Sodium acetate	1.699±0.071	0.187±0.029

钠为碳源时, 菌球数量少, 菌体生长差。碳源为葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、甘油、果糖、糊精、玉米粉等时, 菌株 DP5 生长较快, 菌丝团松散。其中以甘油为碳源时, 胞外多酚含量最高, 达到 0.664 g GAE/L, 远高于其它碳源。忍冬木层孔菌液态发酵 8 d 时胞外多酚最大为 0.010 7 g GAE/L^[9]; 桦褐孔菌在含木质纤维素的液体培养基中胞外多酚产量提高至 0.151 6 g GAE/L^[1], 粒毛盘菌所产胞外多酚远高于忍冬木层孔菌和桦褐孔菌, 有较好的应用开发价值。

2.2 甘油浓度对粒毛盘菌 DP5 多酚产量、生物量和还原糖含量的影响

以甘油为碳源, 添加浓度分别为 5、10、15、20、30、40 g/L 时, 30 °C、150 r/min 振荡培养 6 d, 测定胞外多酚含量、还原糖含量和生物量, 结果见图 1。

由图 1 可知, 甘油浓度为 20 g/L 时, 多酚产量最高; 当甘油浓度低于 20 g/L 时, 多酚量和生物量随甘油浓度增加而增加; 当甘油浓度超过 20 g/L 时, 随甘油浓度增加多酚产量略有降低而生物量无明显增加。许多天然多酚常以糖苷键与糖相连, 本研究最初采用 DNS 法测定发酵液中还原糖含量。由

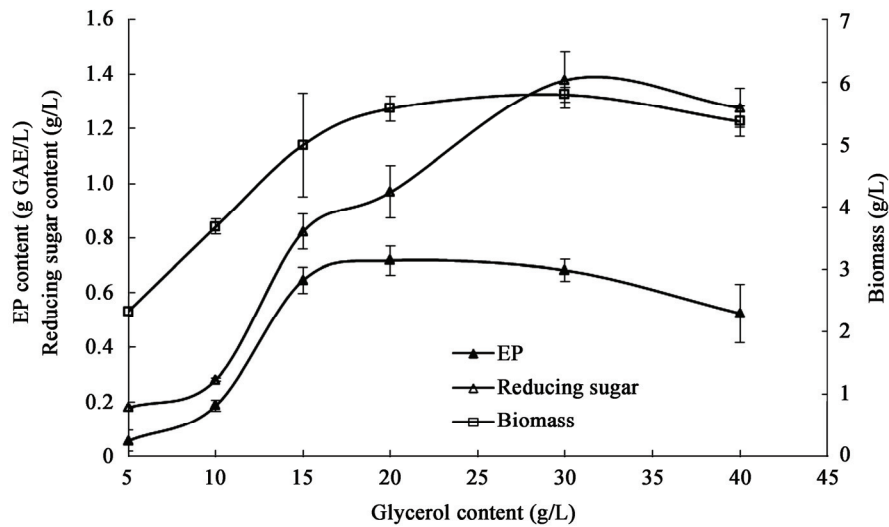


图1 甘油浓度对多酚含量、还原糖浓度和生物量的影响

Figure 1 Effect of glycerol concentrations on EP production, reducing sugar production and biomass by *Lachnum* DP5

图 1 可知，还原糖含量随着甘油含量增加而增加。在对发酵液中多酚提取、纯化时，发现与 DNS 试剂反应的并非是与多酚连接的糖，而是一种结构与糖类似、极性较大的物质，对该物质进行提纯，并经 GC-MS、LC-MS 分析(数据未显示)，确定该极性物质为曲酸，从图 1 可以看出曲酸产量随甘油含量增加而增加。在甘油含量为 20 g/L 时，发酵液中曲酸含量为 0.25 g/L。曲酸与真菌合成多酚的关系尚不清楚，但曲酸对单酚和双酚氧化酶活性有抑制作用^[10]。粒毛盘菌具有合成黑色素的能力^[11]，黑色素是多酚在酚氧化酶的作用下生成的聚合物。实验中发现：以甘油为碳源时，菌株 DP5 合成黑色素的能力明显降低且黑色素合成时间延迟。因此推测曲酸可能抑制了多酚向黑色素的转化，从而促进了多酚的积累。

2.3 曲酸对粒毛盘菌 DP5 产多酚的影响

在以蔗糖为碳源的发酵液中，粒毛盘菌生长良好且未检测到曲酸。为了解曲酸对多酚合成有无影响，在以蔗糖为碳源的发酵培养基中添加曲酸，以考察曲酸对粒毛盘菌合成多酚的影响，结果见表 2。

从表 2 可知，低浓度曲酸能提高胞外多酚产量，高浓度曲酸不利于生物量和多酚的积累，过多曲酸

表 2 曲酸对粒毛盘菌生物量及胞外多酚产量的影响 (以 20 g/L 蔗糖为碳源)
Table 2 Effect of kojic acid concentrations on biomass and EP production of *Lachnum* DP5 using 20 g/L sucrose

曲酸 Kojic acid (g/L)	生物量 Biomass (g/L)	多酚含量 EP (g GAE/L)
0	5.729±0.130	0.209±0.015
0.10	5.826±0.025	0.247±0.072
0.20	5.835±0.019	0.276±0.064
0.30	5.973±0.023	0.313±0.005
0.40	5.425±0.108	0.376±0.071
0.50	5.189±0.093	0.327±0.022
0.60	4.894±0.076	0.269±0.013

会抑制多酚合成相关酶活性。这也说明发酵液中含有适量的曲酸能促进盘菌合成多酚物质。

为弄清曲酸对酚氧化酶活性的影响，分别测定了以甘油和以蔗糖为碳源时发酵液中酚氧化酶活性变化曲线，结果见图 2。

由图 2 可知，在以甘油为碳源的发酵液中，酚氧化酶的活性较低，因曲酸是酚氧化酶的抑制剂，发酵液中较低的酚氧化酶活性应和曲酸的合成有关。

2.4 粒毛盘菌 DP5 胞外多酚合成途径分析

从表 2 可以看出，向以蔗糖为碳源的发酵液中

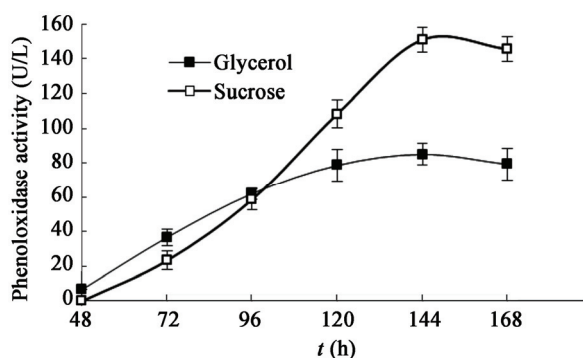


图2 碳源对发酵液中酚氧化酶活性变化曲线的影响
Figure 2 Effects of carbon sources on phenoloxidase activity curve by *Lachnum* DP5

添加曲酸, 酚积累量提高至 0.376 g GAE/L; 以甘油为碳源的培养液中, 酚含量为 0.664 g GAE/L, 说明应还有除曲酸外其他原因促进粒毛盘菌合成多酚。酚类化合物的合成可能经过聚酮途径、莽草酸途径及甲羟戊酸途径^[2], 粒毛盘菌胞外多酚的可能合成途径还未见报道, 一般采用代谢途径抑制法可以推断出代谢物的可能合成途径。EDTA、碘乙酰胺、辛伐他汀分别是莽草酸途径、聚酮途径、甲羟戊酸途径的抑制剂, 向以甘油为碳源的发酵液中添加不同浓度的抑制剂, 考察它们对粒毛盘菌多酚合成的影响, 结果如表 3 所示。

由表 3 可知, 辛伐他汀轻微抑制粒毛盘菌 DP5 的生长, 对胞外多酚积累无显著影响。而作为莽草酸途径抑制剂的 EDTA 和作为聚酮途径抑制剂的碘乙酰胺在低浓度下对胞外多酚无显著影响, 在中高浓度下对菌体生长和多酚合成均极显著抑制, EDTA 和碘乙酰胺减少了单位质量菌体多酚合成量, 说明粒毛盘菌胞外多酚可能是通过莽草酸途径和聚酮途径进行的。Yang 等研究表明甘油能促进莽草酸的积累^[12], 并有利于甲基丙二酰 CoA 前体的合成^[13], 从而能够促进聚酮途径的代谢通量。以甘油为碳源促进粒毛盘菌多酚的合成, 可能与甘油能提高菌体内莽草酸途径和聚酮途径代谢通量有关。为了验证这一实验推测, 在培养基中分别添加莽草酸途径的前体物质水杨酸、苯丙氨酸和酪氨酸及聚酮途径的前体物质乙酸、丙酸和丙二酸, 考察其对多酚产量的影响, 结果见图 3。

由图 3 可知, 所添加的前体物质均能够促进多酚的合成, 特别是丙二酸和水杨酸效果尤为明显, 使多酚产量分别提高了 90%和 110%。由此可确认粒毛盘菌胞外多酚是通过莽草酸途径和聚酮途径的。

综上, 以甘油为碳源有利于粒毛盘菌多酚的合成, 可能是因为: (1) 甘油促进菌体合成曲酸, 而

表3 不同抑制剂对粒毛盘菌DP5胞外多酚产量及生物量的影响
Table 3 Effect of inhibitors on biomass and EP yield of *Lachnum* DP5

抑制剂 Inhibitor	添加量 Content (g/L)	生物量 Biomass (g/L)	多酚含量 EP (g GAE/L)	多酚/生物量 EP/Biomass
Control	0	5.458±0.097	0.653±0.025	0.119 6
Iodoacetamide	0.20	5.285±0.105	0.668±0.016	0.126 4
	1.00	5.072±0.050	0.523±0.005	0.103 1***
	2.00	4.540±0.194	0.429±0.019	0.094 5***
	5.00	4.898±0.456	0.642±0.027	0.131 1
EDTA	10.00	4.729±0.148	0.522±0.015	0.116 7***
	20.00	4.535±0.119	0.367±0.026	0.809 3***
	0.15	5.368±0.256	0.650±0.014	0.121 1
Simvastatin	0.30	5.232±0.156	0.642±0.011	0.122 7
	0.45	4.953±0.235	0.616±0.027	0.124 4

注: 实验平行次数为 4, 表中数据为平均值±标准偏差。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

Note: Number of independent replicates=4, data were shown as mean ± SD. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

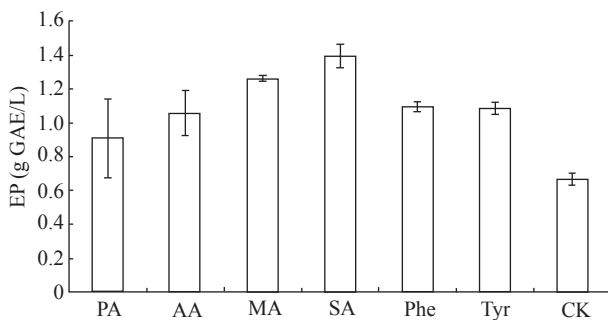


图3 不同前体物质对粒毛盘菌DP5胞外多酚产量的影响

Figure 3 Effect of precursors on EP production by *Lachnum DP5*

注: PA: 丙酸; AA: 乙酸; MA: 丙二酸; SA: 水杨酸; Phe: 苯丙氨酸; Tyr: 酪氨酸; CK: 空白对照。

Note: PA: Propionic acid; AA: Acetic acid; MA: Malonic acid; SA: Salicylic acid; Phe: Phenylalanine; Tyr: Tyrosine; CK: Control check.

曲酸能够抑制多酚氧化酶活性, 减少了多酚的进一步转化; (2) 盘菌多酚通过莽草酸途径和聚酮途径合成, 甘油有利于提高聚酮途径和莽草酸途径的代谢通量。

3 结论

目前, 对植物多酚的生物合成与代谢调控的研究较多, 已明确苯丙氨酸解氨酶(PAL)是其合成关键酶^[14]。对真菌的 PAL 研究相对较少, 只在部分担子菌(如裂褶菌、桦褐孔菌等)、红酵母中发现^[15]。在桦褐孔菌多酚发酵过程中, 一氧化氮和真菌诱导子等因能提高 PAL, 而促进多酚合成^[2-4]。在粒毛盘菌 DP5 的发酵过程中始终未检测到 PAL, 说明粒毛盘菌与桦褐孔菌的多酚合成代谢调控可能有较大差异。

甘油是易被微生物利用的碳源, 可通过甘油脱氢酶(氧化途径)或甘油脱水酶(还原途径)被微生物利用, 已被用于 1,3 丙二醇、二羟基丙酮、琥珀酸、丙酸、乙酸、柠檬酸等初级代谢产物及色素、鼠李糖脂、安丝霉素等次级代谢产物的发酵生产中^[16-17]。甘油的促进机制因代谢产物不同而不同。如在珍贵束丝放线菌(*Actinosynnema pretiosum*)中,

甘油提高葡萄糖磷酸变位酶活性, 促进了安丝霉素 P-3 的合成^[17]; 在纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)中, 甘油促进丙二酰 CoA 的合成而提高大环内酯类抗生素埃博霉素的产量^[18]。粒毛盘菌多酚由多种酚类物质组成, 多酚结构还未完全解析出来。本研究从次级代谢途径入手研究粒毛盘菌多酚合成的大致途径, 初步了解甘油在其中的作用。下一步需要开展多酚结构解析、关键酶活性分析及同位素分析等工作, 以明确多酚的合成途径及甘油在多酚合成的确切作用。

本研究发现粒毛盘菌 DP5 以甘油为碳源时能合成曲酸。曲酸多由曲霉属和青霉属菌以葡萄糖、蔗糖为基础进行合成^[19], 利用甘油合成曲酸的研究较少, 仅有 Coelho 等报道过黄曲霉利用甘油合成曲酸^[20], 尚未有粒毛盘菌合成曲酸的报道, 粒毛盘菌曲酸的合成途径、曲酸与多酚合成的前体物质间的关系还不清楚, 尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Zhu LH. Stimulatory effect of different lignocellulosic materials for phenolic compounds production and antioxidant activity by *Inonotus obliquus* in submerged fermentation[D]. Hangzhou: Master's thesis of Zhejiang Sci-Tech University, 2013 (in Chinese)
朱玲慧. 不同来源木质纤维素对桦褐孔菌液体深层发酵产多酚的影响[D]. 杭州: 浙江理工大学硕士学位论文, 2013
- [2] Zheng WF, Gu Q, Chen CF, et al. Aminophenols and mold-water-extracts affect the accumulation of flavonoids and their antioxidant activity in cultured mycelia of *Inonotus obliquus*[J]. *Mycosystema*, 2007, 26(3): 414-425 (in Chinese)
郑维发, 顾琪, 陈才法, 等. 氨基酸和霉菌水提取物对深层发酵桦褐孔菌菌丝体黄酮积累及其抗氧化活性的影响[J]. 菌物学报, 2007, 26(3): 414-425
- [3] Zhao YX, Miao KJ, Zhang MM, et al. Effects of fungal elicitor on production of phenolic compounds by *Phaeoporus obliquus*[J]. *Mycosystema*, 2010, 29(3): 437-441 (in Chinese)
赵艳霞, 缪康杰, 张梅梅, 等. 真菌激发子对桦褐孔菌多酚积累的影响[J]. 菌物学报, 2010, 29(3): 437-441
- [4] Zhao YX, Miao KJ, Zhang MM, et al. Effects of nitric oxide on production of antioxidant phenolic compounds in *Phaeoporus obliquus*[J]. *Mycosystema*, 2009, 28(5): 750-754 (in Chinese)
赵艳霞, 缪康杰, 张梅梅, 等. 一氧化氮对桦褐孔菌抗氧化酚类化合物积累的影响[J]. 菌物学报, 2009, 28(5): 750-754
- [5] Zhao YX, Miao KJ, Sun WG, et al. Effects of jasmonic acid and hydrogen peroxide on production of phenolic compounds in a melanin-deficient mutant of *Phaeoporus obliquus*[J]. *Mycosystema*, 2009, 28(1): 129-137 (in Chinese)
赵艳霞, 缪康杰, 孙卫国, 等. 茉莉酸和双氧水对斜生褐孔菌一株黑色素缺失突变体产生酚类化合物的影响[J]. 菌物学

- 报, 2009, 28(1): 129-137
- [6] Qian MS, Wu CY, Ji J, et al. Fermentation and purification of polyphenols produced by *Lachnum* YMU50[J]. Journal of Hefei University of Technology (Natural Science Edition), 2013, 36(9): 1115-1121 (in Chinese)
钱梅双, 吴春艳, 纪静, 等. 粒毛盘菌 YMU50多酚发酵与纯化[J]. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2013, 36(9): 1115-1121
- [7] Zhang MM, Wei ZW, Liu YB, et al. Optimization on determination of polyphenols from *Inonotus obliquus* by Folin-Ciocalteu colorimetry[J]. Mycosystema, 2011, 30(2): 295-304 (in Chinese)
张梅梅, 魏志文, 刘玉冰, 等. Folin-Ciocalteu 比色法测定桦褐孔菌多酚的条件优化[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 295-304
- [8] Zhu GL, Zhong HW, Zhang AQ. Experiment of Plant Physiology[M]. Beijing: Peking University Press, 1990: 37-40 (in Chinese)
朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990: 37-40
- [9] Yu HY, Cao CL, Cui BK. Polyphenol content and antioxidant activities of *Phellinus lonicericola* in liquid culture[J]. Mycosystema, 2012, 31(6): 933-939 (in Chinese)
余海尤, 曹春蕾, 崔宝凯. 忍冬木层孔菌液体培养过程中多酚含量及抗氧化活性研究[J]. 菌物学报, 2012, 31(6): 933-939
- [10] Wang SD, Luo WC, Gao XX, et al. Inhibitory effects of kojic acid on phenoloxidase of diamondback moth *Plutella xylostella*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(9): 1316-1321
- [11] Lu Y, Ye M, Song S, Li L, et al. Isolation, purification, and anti-aging activity of melanin from *Lachnum singerianum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(2): 762-771
- [12] Yang Y, Yuan C, Dou J, et al. Recombinant expression of *glpK* and *glpD* genes improves the accumulation of shikimic acid in *E. coli* grown on glycerol[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2014, 30(12): 3263-3272
- [13] Walton LJ, Corre C, Challis GL. Mechanisms for incorporation of glycerol-derived precursors into polyketide metabolites[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2006, 33(2): 105-120
- [14] Fowler ZL, Koffas MAG. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(5): 799-808
- [15] Hyun MW, Yun YH, Kim JY, et al. Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase[J]. Mycobiology, 2011, 39(4): 257-265
- [16] Nicol RW, Marchand K, Lubitz WD. Bioconversion of crude glycerol by fungi[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(5): 1865-1875
- [17] Gao Y, Fan YX, Nambou K, et al. Enhancement of ansamitocin P-3 production in *Actinosynnema pretiosum* by a synergistic effect of glycerol and glucose[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(1): 143-152
- [18] Woo PS, Choi SH, Yoon YJ, et al. Enhanced production of epothilones by carbon sources in *Sorangium cellulosum*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16(4): 519-523
- [19] Wei SP, Xu N, Ji ZQ. Identification of a kojic-acid producing *Aspergillus flavus* F52[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(10): 1155-1160 (in Chinese)
魏少鹏, 徐楠, 姬志勤. *Aspergillus flavus* F52菌株鉴定及不同碳源对曲酸产量的影响[J]. 微生物学报, 2014, 54(10): 1155-1160
- [20] Coelho RS, Anschau A, Monte-Alegre R. Kojic acid production from glycerol: optimization using central composite rotatable design[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 150(6): 84