

泡椒凤爪中解脂耶氏酵母的分离鉴定及生长特性分析

吴海虹, 王新新, 刘芳, 诸永志, 卞欢, 王道营, 耿志明, 张牧焜, 徐为民

(江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

摘要: 本研究对涨袋泡椒凤爪产品中的主要腐败菌及其生长特性进行了分析。采用传统的分离培养方法, 筛选出主要的污染菌群, 通过美兰染色镜检对细胞形态进行检测, 利用 26S rDNA D1/D2 区序列测定及系统发育分析对分离菌株进行鉴定, 采取 ERIC-RAPD 技术对分离菌株的分子遗传多态性进行分析, 最后对优势菌株的生长特性进行研究。结果表明: 从涨袋产品中共分离出 40 株酵母菌, 分别编号为 PJ1~PJ40, 镜检发现所有菌株的细胞形态相同, 均为椭圆形。经分子鉴定发现所分离菌株都为解脂耶氏酵母, 且为两个基因分型, 说明解脂耶氏酵母是该产品中的一种优势腐败菌, 且污染源不同。同时, 研究发现解脂耶氏酵母 PJ1 的最适生长 pH 值为 4.5、最适生长温度为 25 °C、并且 NaCl 浓度的升高对该菌的生长起到一定的抑制作用。

关键词: 泡椒凤爪; 解脂耶氏酵母; 26SrDNA 基因; 随机扩增多态性 DNA

文章编号: 1673-9078(2014)11-84-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.016

Isolation and Identification of *Yarrowia lipolytica* Strains From Chicken Feet With Pickled Peppers and Analysis of Their Growth Characteristics

WU Hai-hong, WANG Xin-xin, LIU Fang, ZHU Yong-zhi, BIAN Huan, WANG Dao-ying, GENG Zhi-ming, ZHANG Mu-han, XU Wei-min

(Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: This study analyzed the dominant spoilage bacteria present in chicken feet with pickled peppers packed in inflated bags and analyzed their growth characteristics. Traditional isolation and culture methods were employed to screen the dominant spoilage bacteria; cell morphology was observed by microscopy after methylene blue staining, and the isolated strains were identified by phylogenetic analysis of the D1/D2 region of 26S rDNA sequences. Enterobacterial repetitive intergenic consensus-random amplified polymorphic DNA (ERIC-RAPD) analysis was used to characterize the genetic variation of the isolated strains. The growth characteristics of the dominant strains were also studied. Forty strains of yeast, numbered PJ1-PJ40 were isolated from the chicken feet product, and microscopic images showed that all strains had the same morphological characteristics; all were oval in shape. Molecular identification showed that all strains belonged to two genotypes of *Yarrowia lipolytica*, indicating that *Y. lipolytica* was the dominant spoilage bacteria in this product, originating from several sources of contamination. The optimal pH and temperature for growth of *Y. lipolytica* were found to be 4.5 and 25 °C, respectively; increasing the NaCl concentration had an inhibitory effect on the growth of these bacteria.

Key words: chicken feet with pickled peppers; *Yarrowia lipolytica*; 26S rDNA gene; random amplified polymorphic DNA (RAPD)

泡椒凤爪是用泡椒及辅料对凤爪进行腌制的一种风味食品, 因其口感鲜香脆嫩、爽口开胃且低脂肪高蛋白, 营养价值高, 受到广大消费者的青睐。泡椒凤爪中含有大量的胶原蛋白, 其热稳定性较差, 热杀菌会导致胶原蛋白析出, 降低了泡椒凤爪的韧性, 严重

收稿日期: 2014-04-21

基金项目: 国家农业科技成果转化资金 (2012GB2C100165); 江苏省农业科技自主创新资金 (CX (12) 3082)

作者简介: 吴海虹 (1976-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 肉品加工与质量控制

通讯作者: 刘芳 (1982-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 肉品加工与质量控制研究

影响了产品的外观形态和口感^[1]。目前, 国内在泡椒凤爪保质期延长的工艺上多采用辐照杀菌或添加食品防腐剂的手段^[2-3]。辐照杀菌存在杀菌成本高, 辐照剂量限制的缺陷, 且企业如果不注意控制原料的质量和生产过程中的规范操作, 容易导致产品的初始含菌量过高, 在使用常规的剂量进行辐照后还是会出现质量的问题。添加食品防腐剂保质, 由于其繁琐收购、运输、加工及使用种类和数量较多调味料, 原料经常会受到微生物的污染, 缺乏针对性的防腐保鲜法, 抑菌过程也不易控制且容易发生防腐剂超标的问题。

目前, 对泡椒凤爪产品保质期的研究表明了微生物的活动是导致产品腐败变质的主要原因, 但对泡椒

凤爪腐败微生物的种类的鉴定及其特性的研究还是空白,使得我们无法有效地根据腐败微生物的特性,进行有针对性的产品防腐工作,因此搞清引起其产品腐败的微生物具有深远的现实意义。本实验首先采用传统分离培养的方法对涨袋的泡椒凤爪产品中的主要腐败微生物菌群进行分离,再结合显微镜下的菌体形态、基因测序以及分子指纹技术等对分离到的腐败菌的分类地位和遗传多样性进行分析。在此基础上,对分离的主要腐败菌在不同环境条件下的生长特性进行研究。研究结果为产品在生产加工中如何控制微生物污染提供依据,以达到提高产品质量,延长产品的货架期目的。

1 材料与amp;方法

1.1 样品来源

泡椒凤爪产品样品为某企业涨袋样品。

1.2 试剂

酵母基因组提取试剂盒(DP307)购于天根生化科技有限公司;PCR引物的合成以及DNA序列的测定由上海生物工程技术服务有限公司完成;PCA、真菌培养基平板计数琼脂、甘露醇氯化钠琼脂、VRBDA琼脂、假单胞菌琼脂和MRS培养基等购于北京陆桥公司;Taq DNA聚合酶购于宝生物工程(大连)有限公司;其余试剂为分析纯。

1.3 腐败微生物的分离

无菌条件下分别从每袋样品(共4袋泡椒凤爪)中称取10 g样品,剪碎后加入90 mL灭菌的蛋白胨溶液中,然后置于振荡培养箱中,4 ℃ 200 r/min振荡半个小时后得到样品稀释液。选择3个稀释梯度,将稀释液涂布到各选择性培养基中。37 ℃培养48 h。挑选不同菌落进一步的分离纯化,将分纯的菌落进行美兰染色后在普通显微镜下进行形态学观察。

1.4 26S rDNA 基因 D1/D2 区序列分析

将选取的40个单菌落接种到真菌培养液体培养基中,25 ℃ 200 r/min振荡培养24 h左右,获得菌株发酵液。利用酵母基因组提取试剂盒提取基因组DNA后,通过扩增26S rDNA序列来对分离菌株进行鉴定。26S rDNA D1/D2区引物的PCR扩增引物分别是NL1(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')和NL4(5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')^[4]。其中50 μL反应体系为:10×PCR缓冲液5 μL, MgCl₂

(25 mmol/L) 3 μL, dNTP 4 μL, 引物NL1和引物NL4(50 μmol/L)各1 μL, 基因组DNA 2 μL, Taq酶(5 U/mL) 0.5 μL, 然后用ddH₂O补足50 μL。PCR扩增条件:94 ℃预变性5 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 共30个循环,最后72 ℃延伸10 min。PCR产物以2%琼脂糖凝胶电泳进行检测后,送往上海生物工程有限公司测序。

利用BLAST,寻找与目的基因序列同源性最高的已知分类地位的菌种。然后从GenBank中提取酵母菌属内代表菌株的26S rRNA基因序列,与测定的序列共同用ClustalX1.83校准排齐进行多序列比较后,用MEGA4软件以Neighbor Joining法构建系统发生树,1000次随机抽样,计算自引导值(Bootstrap)以评估系统发生树的置信度。

1.5 ERIC-RAPD 反应

采用ERIC-RAPD指纹技术对所分酵母菌的亲缘关系进行鉴定。以分离菌株基因组DNA为模板,以ERIC1(5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3')和ERIC2(5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3')为引物进行PCR扩增^[5]。其中50 μL反应体系为:10×PCR缓冲液5 μL, MgCl₂(25 mmol/L) 3 μL, dNTP 4 μL, 引物ERIC1和引物ERIC2(50 μmol/L)各1 μL, 基因组DNA 2 μL, Taq酶(5 U/mL) 0.5 μL, 然后用ddH₂O补足50 μL。PCR扩增条件:94 ℃预变性4 min, 然后92 ℃ 45 s, 25 ℃ 60 s, 68 ℃ 10 min, 共40个循环,最后72 ℃延伸20 min。PCR产物以2%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6 影响分离菌株 PJ1 生长特性的主要因素

1.6.1 温度对酵母菌 PJ1 生长的影响

挑取活化好的酵母PJ1菌落,接入20 mL真菌液体培养基中振荡培养24 h,制成种子液。将等量种子液按照1%接种量分别接到含有100 mL真菌液体培养基(pH 4.5)的三角瓶中,然后分别置于15、25、35、45 ℃下220 r/min振荡培养60 h,每隔3 h取样,测定菌液在660 nm的吸光度。绘制酵母菌PJ1在不同培养温度的生长曲线,分析温度对酵母菌PJ1生长的影响。

1.6.2 pH 值对酵母菌 PJ1 生长曲线的影响

将等量种子液按照1%接种量分别接种到pH值分别调为2.5、3.5、4.5、5.5、6.5的真菌液体培养基中,在25 ℃条件下培养60 h,每隔3 h取样,测定菌液在660 nm的吸光度。绘制酵母菌PJ1在不同pH下的生长曲线,分析pH值对酵母菌生长的影响。

1.6.3 NaCl 浓度对酵母菌 PJ1 生长曲线的影响

将等量种子液按照 1% 接种量分别接种到 NaCl 浓度为 0、2、4、6% 的真菌液体培养基 (pH4.5) 中, 在 25 °C 条件 220 r/min 振荡下培养 60 h, 每隔 3 h 取样, 测定菌液在 660 nm 的吸光度。绘制酵母菌的在不同 NaCl 浓度下的生长曲线, 分析 NaCl 浓度差异对酵母菌 PJ1 生长的影响。

1.7 数据分析

采用 Excel 进行数据处理及相关分析。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离鉴定和形态检测

本研究发现在选用的几种选择性培养基中, 只有 PCA 培养基中检测到了腐败菌的生长。因此选用 PCA 培养基对泡椒凤爪中的腐败菌进行分离, 选择合适的分离梯度, 从 4 袋样品中分别选取 10 株菌, 共 40 株, 分别编号为 PJ1~PJ40。结果发现这 40 株菌的菌落形态相似, 都呈圆形, 白色, 不透明, 表面光滑, 边缘整齐, 中间凸起。将分离菌株进行美兰染色后在显微镜下观察, 发现分离菌株的细胞形态相同, 均为椭圆形 (图 1), 初步判断分离到的菌株应该是酵母菌。因此, 在此后的研究中选用真菌培养基对这些菌株进行分离培养。



图 1 酵母菌 PJ1 美兰染色后的显微镜图片 (×1000)

Fig.1 Microscopic image of isolated yeast PJ1 (×1000)

2.2 26S rDNA 序列测定和系统发育分析

2.2.1 PCR 扩增及测序

提取分离的 40 株菌的基因组 DNA 后, 通过 PCR 扩增获得 26S rDNA 基因的 D1/D2 区序列, 琼脂糖电泳检测结果见图 2, 发现目的片段长度约为 600 bp。

2.2.2 分离酵母菌的系统发育分析

将 PCR 目的片段回收测序, 通过多序列比对发现该 40 个基因序列同源性都在 99% 以上, 说明这些菌株为同一种酵母菌。将该 40 个基因序列与 GenBank 已公布的一些酵母菌代表菌株的 26S rRNA 基因序列进行同源性分析后, 构建系统发育树 (图 3)。结果发现该 40 个基因序列同解脂耶罗维亚酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 230、解脂耶罗维亚酵母 235 与解脂耶罗

维亚酵母 236 的同源性都很高, 相似性达 98% 以上。因此将分离到的 40 株酵母菌鉴定为解脂耶罗维亚酵母。

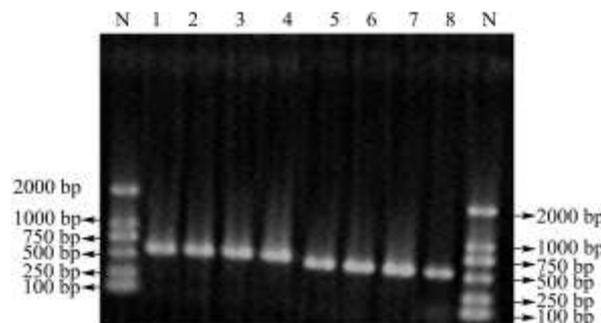


图 2 酵母菌 PJ1-PJ8 的 26S rDNA 基因 D1/D2 区的 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR amplification products of the D1/D2 region of 26S rDNA for yeast strains PJ1-PJ8

注: 泳道 N 为 DNA 分子量标准 2000; 泳道 1~8 代表为酵母菌 PJ1-PJ8 的 PCR 扩增产物。

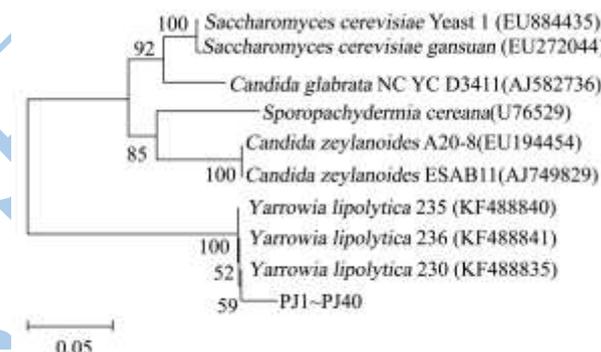


图 3 分离酵母菌的 26S rDNA 序列与 GenBank 数据库中相关序列的相似性分析

Fig.3 Sequence similarity analysis of 26S rDNA sequences of isolated yeast and relevant sequences from GenBank

解脂耶罗维亚酵母于 1942 年首次被分离得到, 最早被认为属于 *Candida lipolytica*, 但随着子囊孢子被观察到, 这一真菌被重新分类并先后被命名为 *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica*, 最后被命名为 *Y. lipolytica*。解脂耶罗维亚酵母是海洋环境中广泛存在的酵母菌之一, 能够长期稳定存在于海洋环境及健康的海洋鱼类肠道中。该酵母的不同菌株能合成大量的胞内蛋白质, 油脂, 分泌大量柠檬酸, 并且能够分泌各种蛋白质, 包括蛋白酶 (酸性蛋白酶 AXP 和碱性蛋白酶 AEP)、磷酸酶、脂肪酶和 RNA 酶等。因此该菌经常被进行代谢途径改造后用来生产油脂、糖、淀粉酶和脂肪酸等^[6-9]。国内还没有解脂耶罗维亚酵母作为食品中的一种腐败菌的报道, 但是国外有研究者报道该菌是禽肉中的一种优势腐败菌^[5]。虽然解脂耶罗维亚酵母被美国食品药品监督管理局定为最安

全的 (GRAS) 微生物, 但是该菌株耐酸、产气, 因此能在泡椒凤爪产品中繁殖, 造成了产品的涨袋。因此解脂耶罗维酵母在食品中的安全控制会逐渐被人们所重视。

2.3 分离酵母菌株的 ERIC-RAPD 图谱分析

目前随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术广泛仍被用作酵母亲缘关系的研究^[10-12], 其主要是利用约 10 个碱基的随机引物以 PCR 技术为基础, 对整个基因组 DNA 进行扩增, 得到多个片断, 再利用 PAGE 或琼脂糖凝胶电泳检测个体间扩增出的片断的多态性, 可以辨别出菌株间基因组 DNA 内核苷酸序列存在的微小变异^[13]。Deak 等研究发现利用商用的十聚体引物对解脂耶罗维酵母进行 RAPD 扩增并没有获得理想的条带, 选择更长的 ERIC 引物来进行 RAPD 扩增, 获得了理想的图谱, 并进行了多态性分析^[5]。

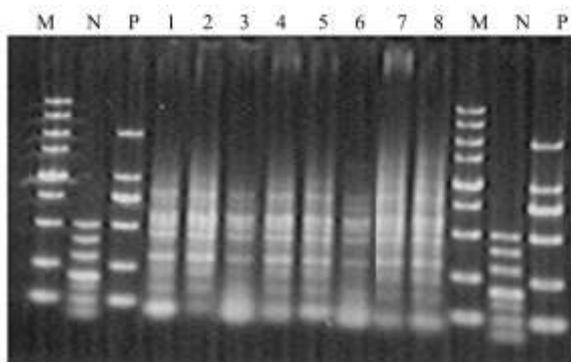


图 4 酵母菌株 PJ1-PJ8 的 ERIC-RAPD 扩增产物

Fig.4 ERIC-RAPD amplification products for yeast strains PJ1-PJ8

注: 泳道 M 为 DNA 分子量标准 5000, 从大到小的条带分别为: 5000、3000、2000、1500、1000、750、500、250、100 bp; 泳道 N 为 DNA 分子量标准 500, 从大到小的条带分别为: 500、400、300、200、150、100、50 bp; 泳道 P 为 DNA 分子量标准 2000, 从大到小的条带分别为: 2000、1000、750、500、250、100 bp; 泳道 1~8 代表为酵母菌 PJ1-PJ8 的 ERIC-RAPD 扩增产物。

本研究采用了 ERIC-RAPD 技术对分离到的 40 个酵母菌株的遗传多样性进行了分析, 结果发现 40 株解脂耶罗维酵母的 ERIC-RAPD 共出现了两种图谱类型。部分菌株的扩增图谱如图 4 所示, 一种类型如条带 3 和 6 所示, 共含有 5 个条带, 从大到小分别为 750~1000 bp 之间、500~750 bp 之间、400~500 bp 之间、300 bp、50~100 bp 之间。其余所示的条带为第二类型, 共扩增出 7 条条带, 由此可以看出, 从大到小分别为 750~1000 bp 之间、500~750 bp 之间、400~500 bp 之间、300 bp、200~300 bp 之间、150~100 bp 之间,

50~100 bp 之间。从泡椒凤爪中分离出的 40 个解脂耶罗维菌株为两个分型, 并且每包样品中都含有这两个分型的菌株, 说明这个酵母菌是从不同的污染源污染的。

2.4 培养条件对解脂耶罗维酵母 PJ1 生长的影响

2.4.1 温度对解脂耶罗维酵母 PJ1 生长的影响

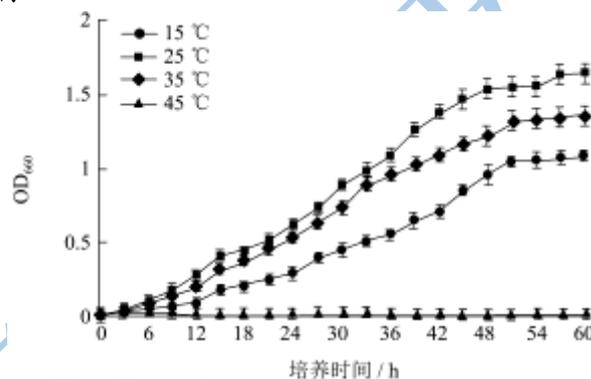


图 5 温度对解脂耶罗维 PJ1 菌株生长的影响

Fig.5 Effect of temperature on the growth of *Y. lipolytica* PJ1

图 5 所示的是解脂耶罗维酵母 PJ1 在不同培养温度下的生长情况, 可以看出温度是影响酵母菌解脂耶罗维酵母 PJ1 生长和存活的主要因素之一。解脂耶罗维酵母 PJ1 在 15~35 °C 下均有不同程度的生长, 而在 45 °C 下停止生长。PJ1 菌在 15~35 °C 的培养条件下, 大约在 9 h 进入对数生长期后, 此时不同温度下生长活力出现分化, 其中 25 °C 条件下 PJ1 菌生长最快, 并且提前进入稳定期, 说明 PJ1 菌的最适生长温度为 25 °C。温度高于和低于 25 °C 时, 细胞中酶活力未达到适宜温度, 均影响了解脂耶罗维酵母 PJ1 在培养基上生长。

2.4.2 pH 值对解脂耶罗维酵母 PJ1 生长的影响

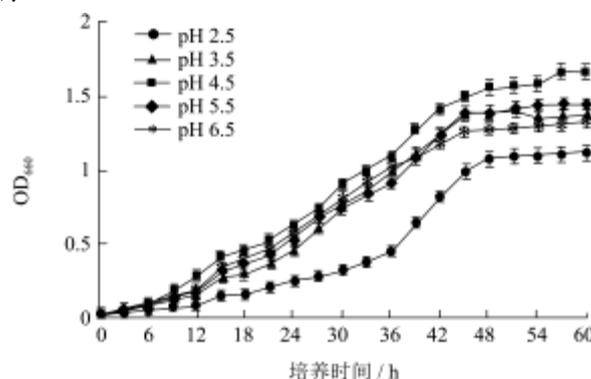


图 6 pH 对解脂耶罗维 PJ1 菌株生长的影响

Fig.6 Effect of pH on the growth of *Y. lipolytica* PJ1

由图 6 可以看出, 在不同 pH 值下, 菌株的生长均

有一定的适应期。进入对数生长期后,不同pH值生长情况也不相同, pH 4.5时繁殖速度最快,在此pH值下能获得最大生长量。当pH值小于2.5时,强烈的酸性环境抑制了菌株的生长;当pH值大于6.5时,可能是菌株细胞酶活力受到了抑制,不利于菌株的生长。因此,解脂耶罗维亚酵母PJ1的最适生长pH值为4.5。

2.4.3 NaCl 浓度对酵母菌生长曲线的影响

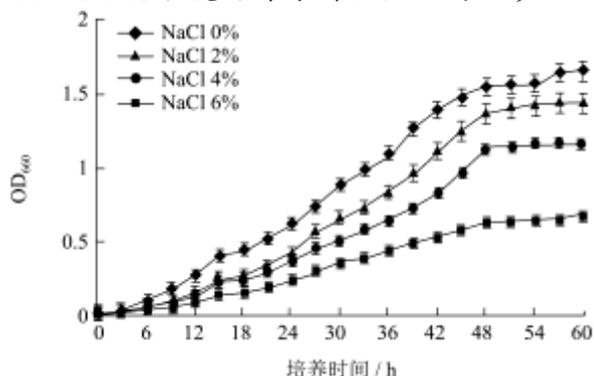


图7 NaCl 对解脂耶罗维亚 PJ1 菌株生长的影响

Fig.7 Effect of NaCl on the growth of *Y. lipolytica* PJ1

由图7可以看出, NaCl 浓度对解脂耶罗维亚酵母 PJ1 的生长有着一定的抑制作用, 菌株的生长活力随着 NaCl 浓度的增加而降低。在 NaCl 浓度达 6% 时, 明显的减缓了对数期细胞的增殖。NaCl 具有很好的渗透性, 能抑制细菌生长且不易蒸发等特点^[14]。随着 NaCl 浓度的增加, 解脂耶罗维亚酵母 PJ1 细胞内外渗透压增大, 导致细胞内部失水生长变慢直至死亡。

3 结论

3.1 从涨袋的泡椒凤爪中分离到 40 株酵母菌, 对其菌株进行形态学和 26S rDNA D1/D2 区序列分析, 最终鉴定出该 40 株酵母菌为同一种菌, 即解脂耶氏酵母。采用 ERIC-RAPD 技术对分离菌株的遗传多态性进行了分析, 发现 40 株解脂耶氏酵母菌存在两个基因分型。

3.2 对解脂耶氏酵母 PJ1 在不同培养条件下的生长特性进行了测定, 结果发现解脂耶罗维亚酵母生长活力与 pH 值、温度有关, 最适 PH 值为 4.5、最适生长温度为 25 °C。NaCl 对解脂耶氏酵母 PJ1 的生长也起到了一定的抑制作用。

3.3 本研究首先发现解脂耶氏酵母是泡椒凤爪中的一种优势腐败菌。由于泡椒凤爪产品的 pH 一般在 4~5 之间, 因此该菌很容易生长繁殖、产气后造成产品的涨袋, 建议企业可以通过在控制原料运输、加工过程环境、优化产品的加工工艺以及在产品中添加一些纳他霉素等抗真菌的保鲜剂来降低或消除解脂耶罗维亚酵母的污染。

参考文献

- [1] 杨欢,李思宁,闫志农,等.栅栏技术在泡椒凤爪保藏中的应用[J].食品科学,2012,33(24):348-351
YANG Huan, LI Si-ning, YAN Zhi-nong, et al. Application of hurdle technology in pickled chicken feet preservation [J]. Food Science, 2012, 33(24): 348-351
- [2] 李淑荣,冯敏,李澧,等.辐照对泡椒凤爪在货架期中的营养品质的影响[J].核农学报,2013,7(10):1490-1494
LI Shu-rong, FENG Min, LI Li, et al. Effect of irradiation on nutritional quality of chicken feet with pickled peppers in shelf life [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2013, 7(10): 1490-1494
- [3] 崔龄文,赵鹏,周玲.几种天然保鲜剂对泡椒凤爪保质期的影响[J].食品工业,2011,4:25-28
CUI Ling-wen, ZHAO Peng, ZHOU Ling. Influence of several natural preservatives on shelf-life of chicken feet with pickled peppers [J]. The Food Industry, 2011, 4: 25-28
- [4] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(5): 1216-1223
- [5] Deak T, Chen J, Beuchat LR. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4340-4344
- [6] 宋焕禄,刘晋芳,吕跃钢.耶罗维亚酵母(*Yarrowia lipolytica*)发酵蓖麻油制备 γ -癸内酯的研究[J].中国食品学报,2007, 7(5):102-107
SONG Huan-lu, LIU Jin-fang, LV Yue-gang. Studies on the preparation of γ -decalactone using castor oil fermentation by *Yarrowia lipolytica* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2007, 7(5): 102-107
- [7] 柳志强,田富,李晓宇,等.响应面法优化解脂耶罗维亚酵母 ypy01 淀粉酶发酵条件研究[J].中国农学通报,2011,27(17): 98-102
LIU Zhi-qiang, TIAN Fu, LI Xiao-yu, et al. Optimization of amylase production from *Yarrowia lipolytica* ypy 01 by using response surface methodology [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(17): 98-102
- [8] SHENG J, JI XF, WANG F, et al. Engineering of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip8p by circular permutation to alter substrate and temperature characteristics [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(5):

- 757-762
- [9] Tomaszewska L, Rywińska A, Gładkowski W. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(9): 1333-1343
- [10] El-Fiky ZA, Hassan GM, Emam AM. Quality parameters and RAPD-PCR differentiation of commercial baker's yeast and hybrid strains [J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(6): 312-317
- [11] Pfliegler WP, Horváth E, Kállai Z, et al. Diversity of *Candida zemplinina* isolates inferred from RAPD, micro/minisatellite and physiological analysis [J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(5-6): 402-410
- [12] Olchawa A, Krawczyk B, Brillowska-Dabrowska A. New PCR test for detection of *Candida glabrata* based on the molecular target chosen by the RAPD technique [J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2013, 62(1): 81-84
- [13] 杨智,杨振泉,汪志君,等.RAPD 技术在酿酒酵母分类鉴定与遗传育种中的应用[J].现代食品科技,2007,23(2):90-93
YANG Zhi, YANG Zhen-quan, WANG Zhi-jun, et al. Application of RAPD in molecular classification and genetic breeding of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(2): 90-93
- [14] 孙之南,王娟,鲁梅芳,等.氯化钠对几种常见菌的抑制作用 [J].盐业与化工,2006,36(1):12-15
SUN Zhi-nan, WANG Juan, LU Mei-fang, et al. The inhibitory function of NaCl to a few common bacteria [J]. *Journal of Salt and Chemical Industry*, 2006, 36(1): 12-15

现代食品科技