

# 基于高通量测序的浓香型白酒窖池细菌群落结构分析

邓杰, 黄治国, 卫春会, 罗惠波, 杜礼泉, 苟云凌

(四川理工学院酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川自贡 643000)

**摘要:** 本试验利用高通量测序技术研究浓香型白酒窖池窖泥微生物群落结构, 建立了一套完整的窖泥微生物群落结构研究方法和相关数据分析方法, 同时得到了川北地区不同窖龄的窖泥微生物群落结构。通过 Roche GS junior 高通量测序平台对川北地区不同窖龄窖泥微生物群落结构进行分析后发现: 6 口窖池的窖泥主要细菌类群为 *Firmicutes*(厚壁菌门)占 79%, *Actinobacteria* (放线菌门)占 4.9%, *Bacteroidetes* (拟杆菌门)占 4.1%, *Lentisphaerae* (黏胶球形菌门)占 3.5%, *Synergistetes*(互养菌门)占 2.5%, 其它占 6%; 其中 *Clostridiales Family XI. Incertae Sedis* 随着窖龄的增加呈现减少的趋势, *Actinobacteria* 类群和 *Synergistetes* 类群随着窖龄的增加呈现增加的趋势, 而 *Haloplasmataceae* 类群和 *Clostridiaceae* 类群则只在 30 年窖龄的窖池中有检测出, *Syntrophomonadaceae* 类群在 5 年窖龄的窖池中均有检出, *Lactobacillaceae* 类群和 *Porphyromonadaceae* 类群则只在 30 年窖龄的一口窖池中是优势细菌类群。

**关键词:** 浓香型白酒窖泥; 细菌群落; 高通量测序

文章编号: 1673-9078(2015)7-50-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.009

## High-throughput Sequencing Reveals Bacterial Structure in the Mud Pits of Heavy-fragrance Baijiu

DENG Jie, HUANG Zhi-guo, WEI Chun-hui, LUO Hui-bo, DU Li-quan, GOU Yun-ling

(Sichuan University of Science & Engineering, Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China)

**Abstract:** High-throughput sequencing was used to study the composition of the microbial community within the mud pits of differently-aged, heavy-fragrance Baijiu cellars in northern using the Roche GS Junior high-throughput sequencing platform. The results showed that the main bacterial taxa in the six mud pits tested included 79% *Firmicutes*, 4.9% *Actinobacteria*, 4.1% *Bacteroidetes*, 3.5% *Lentisphaerae*, 2.5% *Synergistetes*, and 6% others. With increasing age of the cellar, the *Clostridiales Family XI. Incertae Sedis* showed a decreasing trend, while the *Actinobacteria* and *Synergistetes* taxa showed an increasing trend. The *Haloplasmataceae* and *Clostridiaceae* taxa were detected only in the mud pits of a 30-year-old cellar, while the *Syntrophomonadaceae* taxon was detected in the mud pits of all 5-year-old cellars. The *Lactobacillaceae* and *Porphyromonadaceae* taxa were the dominant bacterial groups in only one 30-year-old cellar mud pit.

**Key words:** mud pit of heavy-fragrance Baijiu; bacterial community structure; high-throughput sequencing

浓香型白酒是我国白酒中最重要的香型之一, 它具有绵柔甘冽、芳香浓郁、香味协调、尾净余长、入口甜、落口绵等特点。它是在环境微生物、大曲微生物、窖池微生物的作用下, 以窖池为载体酒醅为原料经过复杂的物质能量代谢过程发酵生产<sup>[1]</sup>。窖池中的窖泥微生物经过几年、几十年甚至几百年的驯化和发

展, 慢慢形成了自身独特的微生物群落, 其代谢产生

收稿日期: 2014-10-13  
基金项目: 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金课题 (NJ2013-08); 四川理工学院人才引进项目 (2014RC28)

作者简介: 邓杰 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程

通讯作者: 黄治国 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为发酵工程

的呈香物质是浓香型白酒窖香的基础<sup>[2]</sup>。所以研究浓香型白酒不同窖龄窖泥微生物群落结构对白酒生产和丰富土壤微生物内群有重要作用。

传统的研究窖泥中微生物的方法是菌种分离, 从 1964 年茅台试点开始分离己酸菌到现在对窖池中部分厌氧菌和兼性厌氧菌的分离<sup>[1]</sup>, 得到的菌种都为白酒生产起到重要作用。近几年开始运用分子生物学方法对窖泥种微生物进行研究, 如变性梯度凝胶电泳技术 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)、单链构象多态性 (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP)、温度梯度凝胶电泳技术、基因文库法和 FISH 技术 (Fluorescence in Situ

Hybridization) 等<sup>[3-5]</sup>。传统的菌种分离只能对窖泥中极少数能分离的菌种进行研究, 突变技术和文库法对窖泥的研究无法准确的定量, 也不能对样品中微生物群落进行较为完备的测序研究, 同时工作量大、灵敏度不高。相比较这些方法, 高通量测序 (HTS) 技术 (又称“下一代”测序 (NGS) 技术) 对微生物群落结构的研究有其明显的先进性和优势, 准确定量、读长长、实时检测等<sup>[7-8]</sup>。目前, 高通量测序技术已经运用于各种分子生物学领域<sup>[6]</sup>, 在人体微生物研究方面、水中生物等多个领域均有应用。近几年, 高通量技术也开始运用于土壤中微生物群落研究<sup>[9-10]</sup>。本试验首次运用高通量测序技术, 利用 Roche 公司 GS junior 测序平台对川北地区浓香型白酒 5 年窖池窖泥和 30 年窖池窖泥中的细菌进行研究, 建立一套高通量测序技术分析白酒窖泥微生物的方法, 同时利用 QIIME 进行数据分析, 能够更加准确、完整的解析浓香型白酒窖泥中细菌的群落结构。这将为解析浓香型不同地域不同窖龄窖泥中优势微生物和特征微生物提供指导作用, 同时为建立白酒窖池微生物数据库和丰富土壤生物多样性有重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

窖泥样品采自四川绵阳丰谷酒业有限责任公司白酒生产窖池, 包括永兴生产基地的 3 口 5 年窖池窖泥 (分别标号为 1、2、3 号) 和丰谷镇生产基地的 3 口 30 年窖池窖泥 (分别标号为 4、5、6 号)。于窖壁上层 (距窖口 50 cm)、下层 (距窖底 50 cm) 和窖底 (窖池底部) 分别取样, 迅速置于冰盒运回, -20 °C 保藏。

### 1.2 试验试剂与仪器

TaqDNA polymerase、dNTPs、DL2000TM DNA Marker (大连宝生物); 蛋白酶 K (Merck); 溶菌酶 (Sigma); 琼脂糖、丙烯酰胺、N, N'-亚甲基双丙烯酰胺、去离子甲酰胺均购自 Solarbio; 引物由上海英潍捷基生物技术公司合成, QIAquick Gel Extraction Kit, MIBIO UltraClean SoilDNA Isolation Kit, Quant-iT PicoGreen 定量试剂盒。

高通量测序仪 (美国 Roche GS junior); 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 5430); 核酸蛋白微量检测仪 (美国 MD SpectraMax Drop); PCR 仪 (美国 Bio-rad C1000 Touch); 水平电泳仪 (美国 Bio-rad Mini-subcell)、凝胶成像分析系统 (美国 Bio-rad ChemiDoc

XRS+); MX-S 型可调式混匀仪 (美国 SCILOGEX)。

### 1.3 总 DNA 的提取及 PCR 扩增

采用 MIBIO UltraClean SoilDNA Isolation Kit<sup>[11]</sup> 试剂盒提取窖泥中微生物总 DNA, 然后用核酸蛋白微量检测仪检测 DNA 的浓度和纯度, 置于 -20 °C 备用。

选用通用引物 968FMID-1401R<sup>[12]</sup> 进行扩增。PCR 反应程序为: Touch Down PCR, 94 °C 4 min; 94 °C 15 s, 56 °C 30 s, 68 °C 80 s; 72 °C 10 min。PCR 结果于 1% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色, 凝胶成像观察, 扩增效果较好。

### 1.4 PCR 产物纯化及定量

采用 QIAquick Gel Extraction Kit<sup>[13]</sup> 胶回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行切胶回收, 然后按照 PCR 产物的检测方法检测。采用 Quant-iT PicoGreen 定量试剂盒对胶回收之后的 PCR 产物进行定量。

### 1.5 高通量测序

将定好量的 DNA 文库样本进行扩增子浓度计算, 然后设计制定 emPCR 体系, emPCR 反应程序为: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 58 °C 4.5 min, 68 °C 30 s, 共 50 个循环; 10 °C 保存。扩增完成后经过处理检测 emPCR 扩增结果。按上机要求稀释扩增子, 确定上样量, 然后进行测序。

### 1.6 QIIME 软件数据分析

QIIME 软件<sup>[14]</sup> 是专门进行微生物群落分析的软件, 已经用于分析和解释真菌, 病毒, 细菌和古细菌群落核酸数据。利用软件对测序数据进行总体分析后再利用 Greengenes 数据库进行 16S rRNA 基因序列的比对, 确定序列对应微生物的分类学地位。

利用软件将序列相似性大于 97% 的定位为一个 OTU (operational taxonomic units)。在利用 Alpha 多样性<sup>[14]</sup> 指数 (alpha diversity or  $\alpha$  diversity) 样品中物种丰富度、均匀度; 再分析样品的 Shannon 指数和 Chao 指数<sup>[14]</sup>, 得到样品群落多样性的高低和所含 OTU 的数目; 最后通过 Beta 多样性指数<sup>[14]</sup> (beta diversity or  $\beta$  diversity) 分析样品之间群落组成的相异性。

选取分析数据中每个 OTU 中一个有代表性的序列, 通过进行 16S rRNA 基因序列的比对, 然后利用 Mega 4.0 软件建立系统发育树。同时还可以将某一个 OTU 中的序列提取出来, 进行深入分析。

## 2 结果与分析

## 2.1 窖泥样品 PCR 产物定量

采用 Quant-iT PicoGreen 定量试剂盒对样品 PCR 产物进行定量, 绘制 DNA 标准曲线 (图 1), 测出各样品的吸光值, 根据标准曲线得到细菌 PCR 产物浓度 (表 1)。

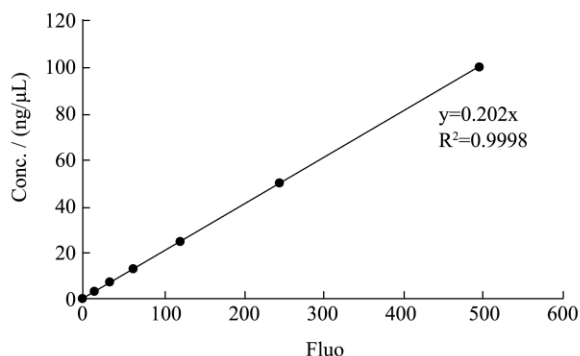


图 1 DNA 浓度标准曲线

Fig.1 DNA standard curve

表 1 PCR 产物浓度

Table 1 Concentration of polymerase chain reaction (PCR)

product		
样品	吸光度	DNA 浓度
1	15.0	6.1
2	10.4	4.2
3	12.9	5.2
4	33.7	13.6
5	40.5	16.4
6	39.9	16.1

## 2.2 测序数据的合理性分析

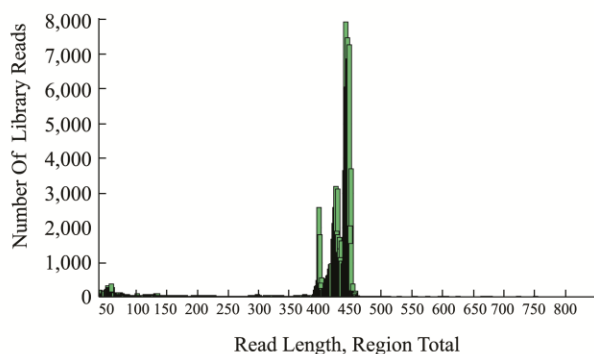


图 2 有效序列长度分布图

Fig.2 Available sequences length distribution

采用多个样品混合测序, 以 barcode 序列或引物为标签。进行细菌和古菌一次同时测序, 细菌引物设计长度为 470 bp 左右, 古菌引物设计长度为 400 bp 左右 (图 2)。有效序列 99818 条, 平均长度 398.02 bp, 可以看出序列平均长度和序列总数显示测序结果较

好。为了验证测序量是否能够真实的反映原始样品的微生物群落的多样性, 对不同窖池窖泥菌群的多样性利用 rarefaction curve 进行评估。样品 1、2、3、4、6 号的稀释性曲线相对趋于平稳 (图 3), 说明取样合理, 而样品 5 号的稀释性曲线说明继续取样还可以获得更多的 OTU。

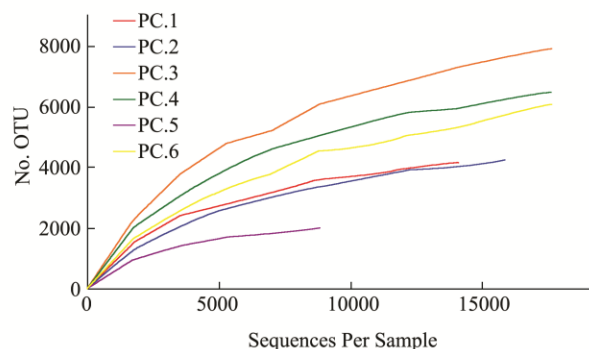


图 3 样品稀释性曲线

Fig.3 Rarefaction curve of Sample

## 2.3 不同窖龄窖泥中细菌群落结构分析

### 2.3.1 细菌 OTU 分类

经过 QIIME 软件处理划分操作分类单元, 原始数据需要经过质量控制, 需满足序列引物和 Barcode 序列完全匹配、序列长度大于 400 bp、序列中不存在有争议的碱基、多聚体结构不得超过 7 个、每 50 个碱基质量值平均不低于 35。总共获得 1708 个 OTUs 分类, 总样品和各个窖龄窖泥细菌门类 OTU 分布 (图 4)

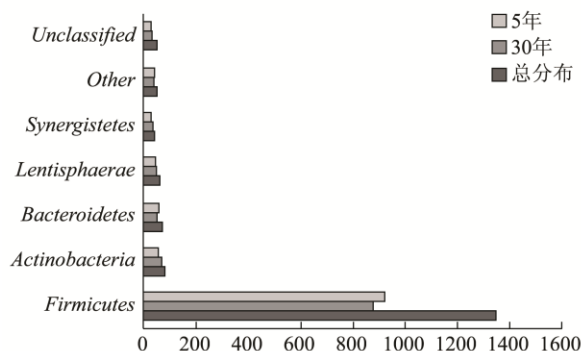


图 4 样品细菌类 OTU 分类

Fig.4 OTU classification of bacteria

### 2.3.2 细菌菌群 Shannon 指数和 Chao 指数分析

描述群落物种多样性的两种  $\alpha$  多样性指数: Simpson 指数和 Shannon-Wiener 指数, 这两种指数能够对群落物种组成的丰富度及均匀度进行综合评价, 而 Shannon-Wiener 指数则对物种丰富度更敏感。由 Shannon 曲线 (图 5A) 和 Chao 曲线 (图 5B) 可以看出, 1、2、3、4、6 号的 Shannon 曲线值均高于 6,

Shao 曲线的值均高于 4000, 说明 1、2、3、4、6 号样品的物种多样性和丰富度都较高; 而 5 号样品的 Shannon 值和 Chao 值均较低, 说明 5 号样品的物种多样性较低, 但是 5 号的 Chao 值还可以随着序列的增加而增长, 说明可以继续取样研究。

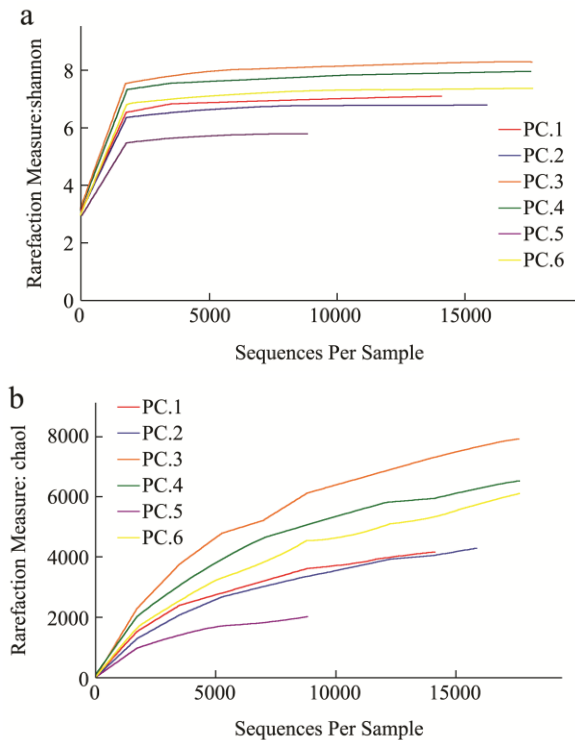


图 5 Shannon 指数 (a) 与 Chao 指数 (b)

Fig.5 a:Shannon Index, b: Chao Index

### 2.3.3 基于 UniFrac 的群落结构分析

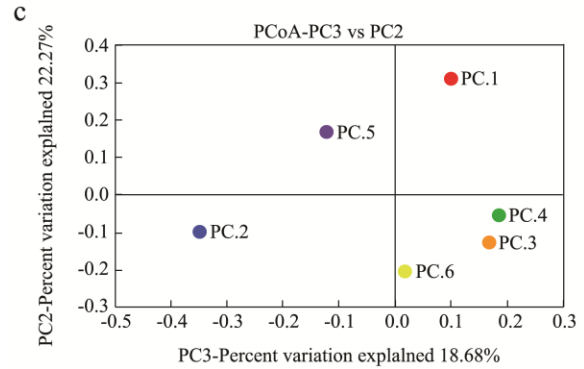
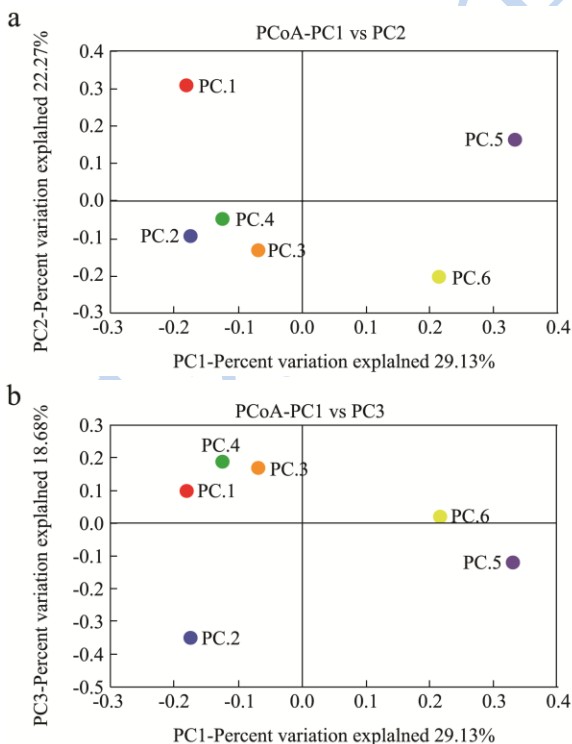


图 6 系统发育距离分析图

Fig.6 Unweighted phylogenetic distance analysis

注: 用非加权的方法通过 UniFrac 软件分别进行系统发育距离分析, 输出图展示出第一(P1)、第二(P2)和第三(P3)轴共同解释沿着六种不同窖池窖泥的微生物群落结构变化。

使用 UniFrac 的 unweighted 算法, 对不同窖池窖泥样品 1708 个 OTUs 进行聚类分析和 PCoA 分析。用 UniFrac 的 unweighted 算法的 PCoA 功能计算系统发育距离来定量分析基于系统发育距离的样品相似性, 了解窖泥样品的整体微生物组成。结果表明, 图 6a、b 中的第一轴能够解释数据中的 29.13% 的变量、第二轴能够解释数据中的 22.27% 的变量, 图 6c 中的第三轴能够解释数据中的 18.66% 的变量。说明样品 3 和 4 的微生物种类相似度较高, 与 1、2、6 号样品相比有一定的差距, 与 5 号样品相比差距最大。

### 2.4 不同窖龄窖泥细菌的组成

#### 2.4.1 不同窖龄窖泥细菌门科分类

通过 QIIME 软件分析, 5 年和 30 年窖泥样品中占主要地位的为 *Firmicutes*(厚壁菌门)、占 79%, 物种丰富度达到 1349 个 OTUs, *Actinobacteria*(放线菌门) 占 4.9% (83 个 OTUs)、*Bacteroidetes*(拟杆菌门) 占 4.1% (71 个 OTUs)、*Lentisphaerae*(黏胶球形菌门) 占 3.5% (60 个 OTUs)、*Synergistetes*(互养菌门) 占 2.5% (43 个 OTUs), 其它如 *Spirochaetes*(消化螺旋菌门)、*Chloroflexi*(绿弯菌门)、*Fibrobacteres*(纤维杆菌门)、*Proteobacteria*(变形杆菌门)、*Verrucomicrobia*(疣微菌门)、*Acidobacteria*(酸杆菌门)、OP9、WS1、WS9 等极少, 加上 unclassified 序列占 6% (102 个 OTUs)。Clostridiales Family XI. Incertae Sedis 在 5 年的窖池分别为 12 个 OTUs、8 个 OTUs、5 个 OTUs, 在 30 年窖池中分别 7 个 OTUs、3 个 OTUs、4 个 OTUs, 所以这三种菌随着窖龄的增加呈现减少的趋势, 而 *Actinobacteria* 类群和 *Synergistetes* 类群在 30 年窖泥中 67 个 OTUs、36 个 OTUs, 在 5 年窖泥中 54 个 OTUs、



28 个 OTUs, 说明 *Actinobacteria* 类群和 *Synergistetes* 类群随着窖龄的增加呈现增加的趋势; *Haloplasmataceae* 类群和 *Clostridiaceae* 类群只在 30 年窖龄的窖池中有检测出, *Syntrophomonadaceae* 类群在 5 年窖龄的窖池中均有检出, *Lactobacillaceae* 类群和 *Porphyromonadaceae* 类群则只在 30 年窖龄的一口窖池中是优势细菌类群。

不同窖池窖泥中科类的分类可以看出 *Firmicutes*(厚壁菌门)下的 *Haloplasmataceae*(盐扁菌科)、*Lactobacillaceae*(乳酸杆菌科)、*Clostridiales*(梭菌科)、*Lachnospiraceae*(毛螺菌科)、*Ruminococcaceae*(瘤胃球菌属)、*Syntrophomonadaceae*(单胞菌科)、*Catabacteriaceae Clostridiales, Family XI, Synergistetes*(互养菌门)下的 *Synergistaceae*(互养菌科)和 *Bacteroidetes*(拟杆菌门)下的 *Porphyromonadaceae*(紫单胞菌科) 都属较优势菌科, *Clostridiales*(梭菌科)占优; *Incertae Sedis* 和 *Family XIII. Incertae Sedis* 为梭杆菌目下的三种新的细菌种属为不同窖池窖泥的主要微生物种群; 同时 *Therm oanaerobacteraceae*(嗜热厌

氧菌科)、*Eubacteriaceae*(优杆菌科)、*Enterococcaceae*(肠球菌科)、*Dehalo bacteriaceae*(低嗜盐细菌科)、*Pseudomonadaceae*(假单胞菌科)、*Peptococcaceae*(消化球菌科)、*Acholeplas mataceae*(无胆甾原体科)、*Erysipelotrichaceae*、*Dethiosulfovibrionaceae*、*Anaerobrancaceae*、*SHA-4*、*ML1228J-1* 等也被检测到。在属的水平发现了 *Pelotomaculum sp*、*sedimentibacter sp*、*syntrophobolulus sp*、*Anaerophage sp*、*sporobacter sp*、*Tepidanaerobacter sp* 和 *Bacillus sp* 等在类的 16 个类群。

### 2.4.2 细菌菌群系统发育树的构建

利用分析软件从数据中选取具有代表性的 OTU 的序列, 从每一个不同科中选取一条有代表性的序列, 如果被选序列在同一门中, 表示相同序列(如 *SHA-4* 和 *SHA-98*)。然后将被选取的序列利用 *Greengenes* 数据库进行 16S rRNA 基因序列的比对, 再利用 *Mega 4.0* 软件, 采用邻接法(*Neighbor-Joining*) 建构系统发育树, 如下图 7。

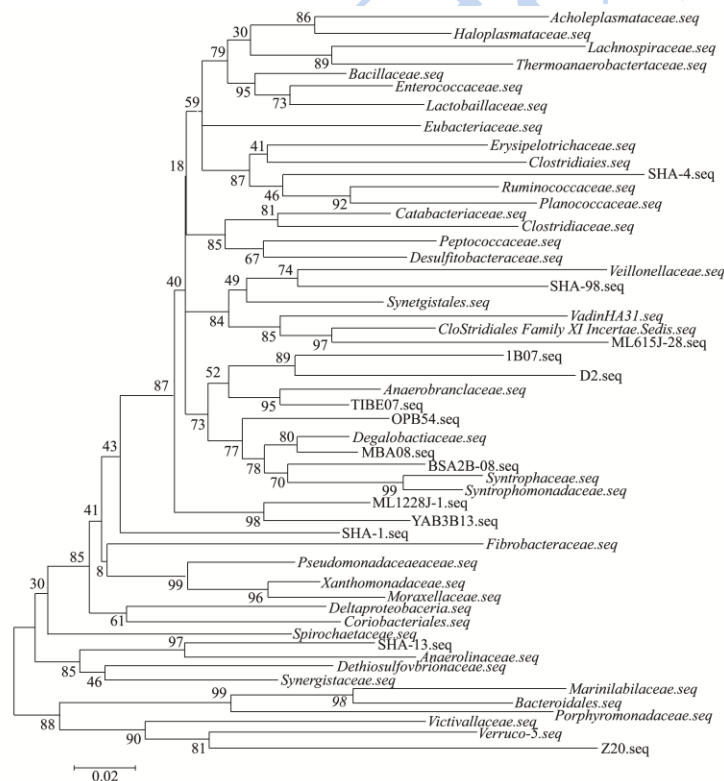


图 7 不同窖泥细菌的系统发育树

Fig.7 Phylogenetic tree of the bacteria in the mud pits

## 3 结论

3.1 叶光斌等<sup>[4]</sup>利用克隆文库分析窖泥细菌群落, 发现芽孢杆菌纲、*Bacteroidetes*(拟杆菌门)、*Synergistetes*(互养菌门)等为窖泥优势微生物群落。本

试验通过高通量测序技术分析了 5 年窖泥和 30 年窖泥细菌群落结构, 结果表明, 其细菌主要分布于 *Firmicutes*(厚壁菌门)、*Bacteroidetes*(拟杆菌门)和 *Synergistetes*(互养菌门)等 8 个门, 13 个科, 16 个属, *Firmicutes*(厚壁菌门)为优势菌门, 其中 *Clostridiales*

(梭菌科)占一定优势。相比其他研究方法<sup>[3-4]</sup>对于窖泥细菌群落分析更加全面,信息量更大。

3.2 窖泥微生物在浓香型白酒生产中起到举足轻重的作用,其经长期发酵驯化过程中形成了相对稳定的功能菌群,如己酸菌、丁酸菌和乳酸菌等。己酸菌是一类与甲烷菌共生的,产己酸的细菌<sup>[1]</sup>,本研究在样品中检测到大量与甲烷类菌共生的细菌,如 *Pelotomaculum sp*、*syntrophobolulus sp* 和 *Tepidanaerobacter sp* 等。同时还检测到窖泥中的其他优势菌群,如梭状菌属和乳酸菌,乳酸菌在发酵过程中能够促进美拉德反应、促进糟醅发酵和维护窖池微生态<sup>[1]</sup>。在分析的数据中有很多 OTU 没有找到其门或属的类别,在门的分类中有 51 个 OTUs 没有门的归属,有 27% 左右的 OTU 没有属的归属,这当中可能存在着大量的新种。综上所述,利用高通量测序技术能够了解窖池中重要功能菌,并且得到其优势度,同时还能发现窖池中部分未知微生物。

## 参考文献

- [1] 岳元媛,张文学,刘霞,等.浓香型白酒窖泥中兼性厌氧细菌的分离鉴定[J].微生物学通报,2007,34(2):251-255  
YUE Yuan-yuan, ZHANG Wen-xue, LIU Xia, et al. Isolation and identification of facultative anaerobes in the pit mud of chinese Luzhou-flavor liquor [J]. Microbiology, 2007, 34(2): 251-255
- [2] 黄治国,甄攀,罗惠波.浓香型白酒窖池古菌群落研究[J].西南大学学报(自然科学版),2012,32(12):91-96  
HUANG Zhi-guo, ZHEN Pan, LUO Hui-bo, et al. Community Structure of Archaeal in the Mud Pit [J]. Journal of Southwest University (Nature Science Edition), 2012, 32(12): 91-96
- [3] 罗惠波,黄治国,李浩,等.浓香型大曲原核微生物的群落 PCR-SSCP 解析[J].微生物学通报,2009,9:1363-1367  
LUO Hui-bo, HUANG Zhi-guo, LI Hao, et al. PCR-SSCP Analysis of the Pronucleus Microbial Communities in Luzhou-flavor Daqu [J]. Microbiology China, 2009, 9: 1363-1367
- [4] 叶光斌,罗惠波,杨晓东,等.基于免培养法研究泸州地区浓香型白酒窖泥原核微生物群落结构[J].食品科学,2013, 1: 1-12  
YE Guang-bin, LUO Hui-bo, YANG Xiao-dong, et al. Community Structure of Prokaryotes in Pit Mud of Lu-Flavor Liquor from Luzhou Prefecture Based on Culture-independent Approach [J]. Food Science, 2013, 1: 1-12
- [5] 黄治国,赵斌,卫春会,等.浓香型白酒窖泥古菌群落结构研究及其系统发育学分析[J].现代食品科技,2014,3:28-32  
HUANG Zhi-guo, ZHAO-bin, WEI Chun-hui, et al. Community structure and phylogenetic diversity analysis of archaeal in the mud pit [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 3: 28-32
- [6] Maccallum, Przybylski D, Generre S, et al. ALLPATHS 2: small genomes assembled accurately and with high continuity from short paired reads [J]. Genome Biol., 2009, 10(10): R103
- [7] Li R, Zhu H, Ruan J, et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing [J]. Genome Res., 2010, 20(2): 65-72
- [8] Yang F, Zeng X, Ning K, et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations [J]. The ISME Journal, 2012, 6(1): 1-10
- [9] Andersson A F, Lindberg M, Jakobsson H, et al., Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing [J]. PLoS One, 2008, 3(7): 28-36
- [10] Chu H, Fierer K, Lauber C L, et al. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes [J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(11): 2998-3006
- [11] Xia W, Zhang C, Zeng X, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil [J]. The ISME Journal, 2011. 5(7): 1226-1236.
- [12] Acosta-Martinez V, Dowd S E, Sun Y, et al. Pyrosequencing analysis for characterization of soil bacterial populations as affected by an integrated livestock-cotton production system [J]. Applied Soil Ecology, 2010, 45(1): 13-25
- [13] Olga Sanchez, Josep M Gasol, Ramon Massana, et al. Comparison of different denaturing gradient gel electrophoresis primersets for the study of marine bacterioplankton communities [J]. Applied And Environmental Microbiology, 2007, 73(18): 5962-5967
- [14] Chun-Lan Xu, Rui Sun, Xiang-Jin Qiao, et al., Protective effect of glutamine on intestinal injury and bacterial community in rats exposed to hypobaric hypoxia environment [J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 16: 4662-4674