

浓香型大曲中可培养真菌的分离鉴定与系统发育学分析

罗惠波^{1,2}, 杨晓东^{1,3}, 杨跃寰¹, 叶光斌^{1,2}, 李丹宇¹

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000) (2. 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川自贡 643000) (3. 四川省江安县工业园区管委会, 四川宜宾 644200)

摘要: 采用传统微生物分离手段从浓香型大曲中分离纯化得到 69 株真菌。通过形态学观察、分子生物学鉴定以及系统发育学分析其分类地位。结果表明: 采用 ITS 区序列进行真菌的分子鉴定可将大多数的真菌鉴定到属, 部分真菌甚至能够鉴定到种; 浓香型大曲内分离获得的真菌类群主要包括曲霉属(*Aspergillus*)、红曲霉属(*Monascus*)、根毛霉属(*Rhizomucor*)、横梗霉属(*Lichtheimia*)、青霉菌属(*Penicillium*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、德巴利氏酵母属(*Debaryomyces*)、异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomala*)、锁掷酵母(*Sporidiobolus pararoseus*)等目前已报道的大曲真菌类群, 同时也发现了 *Merimbla ingelheimensis*、踝节菌属(*Talaromyces*)、尾孢菌属(*Cercospora*)、枝孢菌属(*Cladosporium*)、*Acremonium impicatum*、脉孢菌属(*Neurospora*)等霉菌类群在大曲中分布。其中曲霉属是优势种群, 其菌株数目和种类最多, 分别占 43.48% 和 20.69%。本研究极大地丰富了对浓香型大曲中真菌种群的认识。

关键词: 浓香型大曲; 真菌; 系统发育学分析

文章编号: 1673-9078(2013)9-2047-2052

Isolation, Identification and Phylogenetic Analysis of Culturable Fungi in Luzhou-flavor Daqu

LUO Hui-bo^{1,2}, YANG Xiao-dong^{1,3}, YANG Yue-huan¹, YE Guang-bin^{1,2}, LI Dan-yu¹

(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China) (2. Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China) (3. Industrial Park Management Committee of Jiangan County, Sichuan Province, Yibin 644200, China)

Abstract: 69 strains of fungi were isolated from Luzhou-flavor Daqu through traditional microbial isolation method. The taxonomy information of these separated fungi were analyzed through morphologic observation, molecular biological identification and phylogenetic analysis. The results showed that most of fungi can be identified to genus, and species of some strains were identified based on molecular identification of ITS region sequences. *Aspergillus*, *Monascus*, *Rhizomucor*, *Lichtheimia*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces*, *Wickerhamomyces anomala*, and *Sporidiobolus pararoseus* were found as the main strains of Luzhou-flavor Daqu. Other groups like *Merimbla ingelheimensis*, *Talaromyces*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Acremonium impicatum*, *Neurospora* etc were also found in Luzhou-flavor Daqu. Among them, *Aspergillus* spp. was the dominant group, and its stain number ratio and species number ratio were 43.48% and 20.69%, respectively.

Key words: Luzhou-flavor Daqu; fungi; phylogenetic analysis

收稿日期: 2013-05-07

基金项目: 四川省教育厅重大培育项目(09Z2015); 四川理工学院人才引进项目(2010XJKRL001); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(NJ2009-02)

作者简介: 罗惠波(1969-), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事酒类发酵工程专业的教学和科研工作

通讯作者: 叶光斌(1980-) 男, 博士, 讲师, 主要研究方向为酿酒生物技术及应用

大曲是一种含丰富的微生物菌系与酶系的复合微生物制剂, 作为白酒工业生产中不可或缺的糖化和发酵生香剂, 大曲同时也是传统白酒酿造的中间原料和生产动力, 能够直接或间接影响白酒的产量和风格^[1]。传统大曲制备采用小麦为原料, 生料制曲、自然接种、自然发酵(由于大曲制备过程的人工控制一般表现在通风、换气及控制品温等方面, 总体而言还是属于自然发酵)而成, 其微生物的群落组成主要包含

霉菌、酵母菌、细菌和放线菌^[2]。大曲微生物的代谢可以产生大量淀粉酶、糖化酶、蛋白酶和酯化酶等，对白酒的产酒、生香和产酯等方面起着十分重要作用^[3]。早期学者对于大曲微生物的研究主要采用传统培养方法对不同酒厂的大曲样品进行微生物菌落计数和菌群组成的初步研究，但并未对分离获得的大曲微生物进行系统鉴定^[4-5]。近年来，随着分子生物学技术的发展，大曲微生物的研究取得了长足的进步。惠丰立等应用传统培养方法结合 ITS 和 26S rDNA D1/D2 区域序列分析对分离获得的中温大曲酵母进行分类研究，结果表明中温大曲内酵母主要有酿酒酵母、汉逊酵母、毕氏酵母、拟内孢霉等^[6]。王海燕等通过 PCR-DGGE 技术比较了不同香型大曲中的细菌、酵母及霉菌组成差异，结果表明大曲内酵母优势类群为 *Saccharomycopsis fibuligera* 和 *Pichia anomal*；还存在其他非酵母菌科的酵母如 *Hanseniaspora guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii*, *Issatchenkia orientalis*, *Trichosporonasahii* 等。霉菌优势种群为 *Aspergillus oryzae* 和 *Absidia blakesleeana*^[7]。然而由于目前真菌微生物的研究缺乏较为通用的引物，难以获得足够多的真菌群落信息，这一问题也是目前研究大曲真菌群落组成的瓶颈。ITS 区序列是目前真菌鉴定中一个较好的分子标记，相比于核糖体基因序列而言，其序列的进化速率较快，可以较好的将不同属、种区分开来，目前已广泛应用于真菌的分子鉴定。

浓香型白酒在我国的白酒消费市场上占据着主导地位，对浓香型大曲中的微生物进行研究，对解析大曲的代谢机理、丰富大曲微生物菌种库及保证大曲质量具有十分重要的意义。本研究采用传统的分离手段结合分子生物学手段对浓香型大曲中分离获得的 69 株真菌进行形态学结构和 ITS 区序列进行比较，并通过系统发育学分析确定各真菌的分类地位及种群关系。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

样品：浓香型大曲取自泸州老窖制曲公司。

主要试剂：葡萄糖、蔗糖、琼脂、麦芽糖琼脂培养基、 NaNO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 K_2HPO_4 、 KCl 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、去氧胆酸钠等均为分析纯，购自成都科龙化工试剂厂；链霉素等药品购自药店。

仪器与设备：PCR 仪（美国，设备型号，BIO-RAD）；生物显微成像系统，日本 NIKON 公司；全自动高压灭菌锅（MLS-3020）日本三洋公司；霉菌

培养箱（MJ-250），上海齐欣科学仪器有限公司；超净工作台（SW-CJ-1F），苏净集团；凝胶成像系统（SC-805），上海山富科学仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配制

实验所用培养基主要包括麦芽汁琼脂培养基、土豆琼脂培养基(PDA) 和察氏培养基（CPK），培养基的配制参照微生物实验指导书^[8]；每种培养基中均加入终浓度为 30 mg/L 的链霉素和 200 mg/L 的脱氧胆酸钠分别抑制细菌的生长和抑制真菌菌丝的蔓延。

1.2.2 浓香型大曲中可培养真菌的分离、纯化

将粉碎的大曲样品 10 g，制成 10^{-2} ~ 10^{-7} 的稀释液，采用稀释平板涂布法将 100 μL 各个浓度的菌悬液涂布于麦芽汁培养基、PDA 培养基、CPK 培养基上，30 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 72 h 后，对平板上所得到的微生物菌落进行分离纯化，并对纯化后菌种进行镜检。

1.2.3 真菌 DNA 的提取与 PCR 扩增

在无菌条件下挑取纯菌种至马铃薯液态培养基，30 $^\circ\text{C}$ ，100 r/min 扩大培养 48 h，准确移取菌悬液 3 mL 于离心管内，10000 r/min 离心 5 min 后弃上清，得到菌丝体，用于 DNA 的提取，利用改良的 SDS-酚氯仿抽提法提取 DNA^[9]，将得到 DNA 通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

以提取的真菌基因组 DNA 为模板，通过引物 ITS1（5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'）和 ITS4（5' -TCCTCCGCTTATGATATGC-3'）扩增真菌核糖体 ITS 区基因^[10]。PCR 反应体系为：5.0 μL 10 倍缓冲液，4.0 μL dNTP (2.5 mmol/L)，3.0 μL Mg^{2+} (25 mmol/L)，1.0 μL 引物 ITS1 (10 $\mu\text{mol/L}$)，1.0 μL 引物 ITS4 (10 $\mu\text{mol/L}$)，1.0 μL DNA 模板，1.0 μL rTaq 酶 (2500 U/mL)，最后用双蒸水补充至 50 μL 。PCR 反应程序为：94 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min，接下来 34 个循环包括 94 $^\circ\text{C}$ 变性 1 min，58 $^\circ\text{C}$ 退火 1 min，72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min，最后一个循环在 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳检测有无。最后将含有目的条带的 PCR 原液送到上海杰李生物技术有限公司测序。

1.2.4 系统发育学分析

将测序结果通过 DNASTar 软件的 Seqedit 程序进行剪切，并输入 NCBI (National Center of Biotechnology Information, 美国国家生物技术信息中心) GenBank 数据库进行同源性检索，获得近似序列。用 Clustal X 软件进行核苷酸序列多序列比对分析，通过 Mega4 软件构建系统发育树，确定其分类地

位。

2 结果与分析

2.1 浓香型大曲中真菌微生物的分离与纯化

对稀释平板涂布法得到的真菌微生物菌株进行分离、纯化,共分离获得 72 株真菌,分别标号为 njsys-1 到 njsys-72; 其中有 3 株真菌 njsys-54、55、56 由于未获得测序结果,后续的研究只针对获得测序结果的 69 株真菌进行讨论。部分真菌代表菌株的微生物菌落与显微结构见图 1。

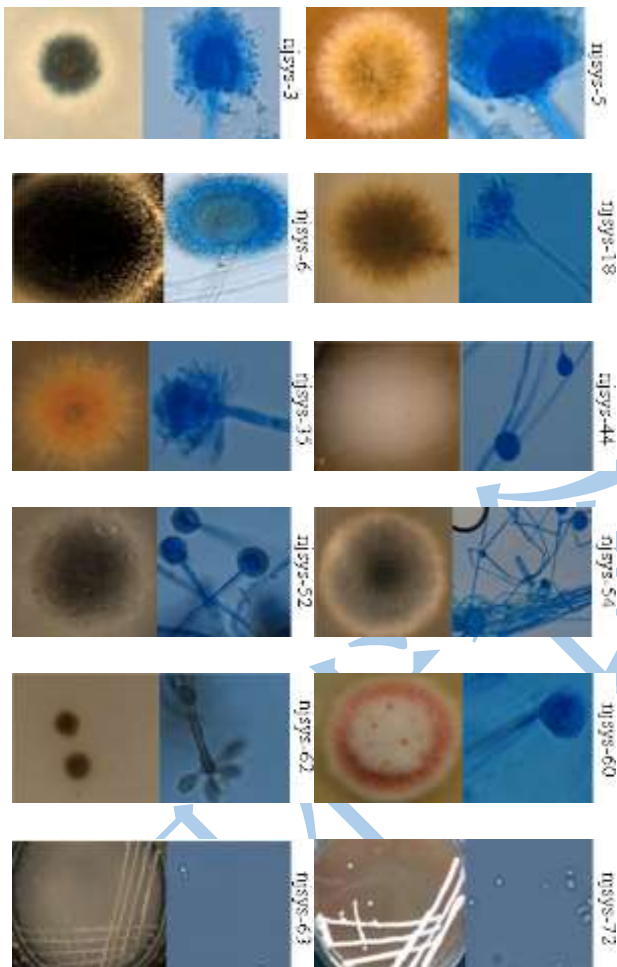


图 1 部分代表真菌菌落形态与显微形态结构

Fig1. Colony morphology and microscopic structure of some representative fungi

由图 1 可知运用常规的微生物分离手段,可从浓香型大曲样品中分离得到种类较为丰富的霉菌与酵母菌; 相关微生物已保存在酿酒生物技术及应用四川省重点实验室菌种保藏中心。

2.2 浓香型大曲中真菌微生物的分子生物学

鉴定
2049

2.2.1 真菌微生物 DNA 的提取与 PCR 扩增结果

对每种真菌微生物 ITS 区的基因进行扩增,部分真菌微生物的 PCR 扩增产物检测结果如图 2 所示:

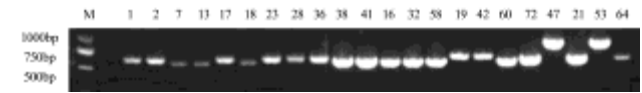


图 2 部分真菌微生物 ITS1 和 ITS4 引物的 PCR 扩增结果

Fig2. The results of ITS 1 and ITS4 primer PCR amplification of part fungi

注: 由于空间原因, 每种菌株的标号省略了“njsys-”。

由图 2 可知: 各个真菌微生物 ITS 区 DNA 的 PCR 扩增片段的长度大致都在 500~1000 bp 之间, 将每个菌种的 PCR 原液 100 μL 送上海杰李生物技术有限公司进行测序。

2.2.2 真菌微生物的系统发育学分析

对测序菌株序列进行数据比对和系统发育学分析, 得到各菌株微生物学分类信息。由于参与建树的菌株及参比序列较多, 将发菌科, 横梗霉属, 其他真菌(包括微小根毛霉、酵母菌等)分别建树(见图 3~5)。

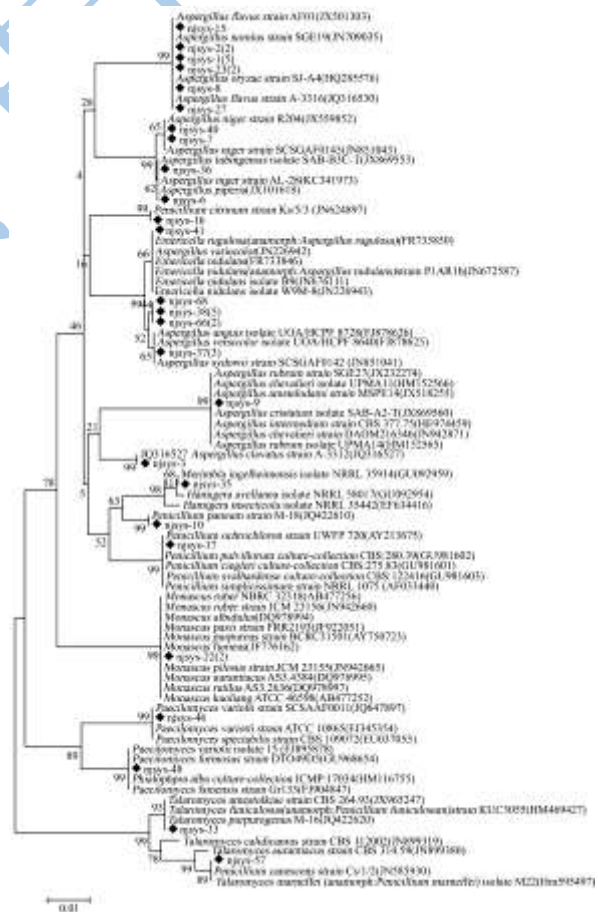


图 3 基于发菌科真菌 ITS 序列构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the ITS sequence of trichocomaceae fungi

注：图中加◆为本次实验分离测序的菌株，其中括号内数字表示测序结果完全相同的菌株数目，如 njsys-1(5)，(5)指测序结果有 5 株完全相同的菌株，未标括号和数字则表示只有一株菌。

由图 3 的系统发育树可知：浓香型大曲分离得到的发菌科菌株从数量和类别上都较为丰富，主要分布于曲霉属（30 株）、红曲霉属（2 株）、青霉属（5 株）、拟青霉属（2 株）和 Merimbla（1 株）。由于目前真菌分子鉴定系统还不是很完善，且 ITS 区序列难以有效的将同属近似种甚至近似属区分开来，因此构建系统发育树时，将每个菌株 NCBI 数据库比对获得的属种名不同的序列均选择参与到系统发育树的构建。由图 3 可以看出大部分菌株与很多同属不同种的序列聚为一类，表明基于 ITS 序列的分子鉴定只能提供近似属种的信息，难以鉴定到种。其中菌株 njsys-16、3、35、10 可以鉴定到种，它们的鉴定结果分别为桔青霉 (*Penicillium citrinum*)、棒曲霉 (*Aspergillus clavatus*)、*Merimbla ingelheimensis*、*Penicillium paneum*。而其他菌株通过系统发育树则难以鉴定到种。

通过系统发育树可以将曲霉属分为 6 个分支；其中菌株 njsys-1、2、8、15、23 等 12 株菌聚为一支，它们与黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、米曲霉 (*A. oryzae*) 和 *A. nomius* 遗传关系较近。菌株 njsys-7、40、6、36 聚为一支，且与黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、塔宾曲霉 (*A. tubingensis*) 和 *A. piperis* 聚在一起。菌株 njsys-41 单独聚为一支，与皱瓣曲霉 (*Aspergillus rugulovallus*)，其有性型为 *Emericella rugulosa*）、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*，有性型为 *Emericella nidulans*) 和杂色曲霉 (*Aspergillus varicolor*) 近似。菌株 njsys-38、66、68 与 njsys-37 聚为一支，其中 njsys-37 与聚多曲霉 (*Aspergillus sydowii*)、杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*)、*Aspergillus unguis* 近似；而 njsys-38、66、68 单独聚在一起，它们有可能是曲霉属的新种。菌株 njsys-9 和 njsys-3 各自单独聚为一支，其中 njsys-9 与 *Aspergillus rubrum*、*A. chevalieri*、*A. amstelodami*、*A. cristatum*、*A. intermedium* 近似；njsys-3 与棒曲霉近似。

菌株 njsys-16、10、17 为青霉属菌株，njsys-16、10 可以鉴定到种，而 njsys-17 则与 *Penicillium ochrocloron*、*Penicillium pulvillum*、*Penicillium ciegleri*、*Penicillium simplicissimum*、*Penicillium svalbardense* 等青霉属近似菌株相关。菌株 njsys-22 为红曲霉属，且与 *Monascus ruber*、*M. albidulus*、*M. paxii*、*M. purpureus*、*M. fumeus*、*M. pilosus*、*M. aurantiacus*、*M. rutilus*、*M. kaoliang* 遗传关系相近。菌株 njsys-46、

48 为拟青霉属菌种近似。而菌株 njsys-33 和菌株 njsys-57 与踝节菌属菌种相关。

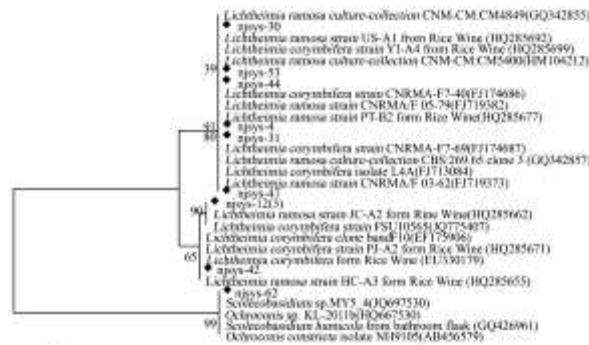


图 4 基于横梗霉属真菌 ITS 序列构建的系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree based on the ITS sequence of *Lichtheimia*

注：图中加◆为本次实验分离测序的菌株。

由图 4 可知：共分离得到 10 株横梗霉属真菌（犁头霉），它们全部与 *Lichtheimia ramosa*、*Lichtheimia corymbifera* 近似；目前难以将菌株 njsys-62 鉴定到属，只能说该菌株与 *Scolecobasidium humicola* 和 *Ochroconis constricta* 遗传距离较近，且 *Scolecobasidium* 与 *Ochroconis* 为近似属。

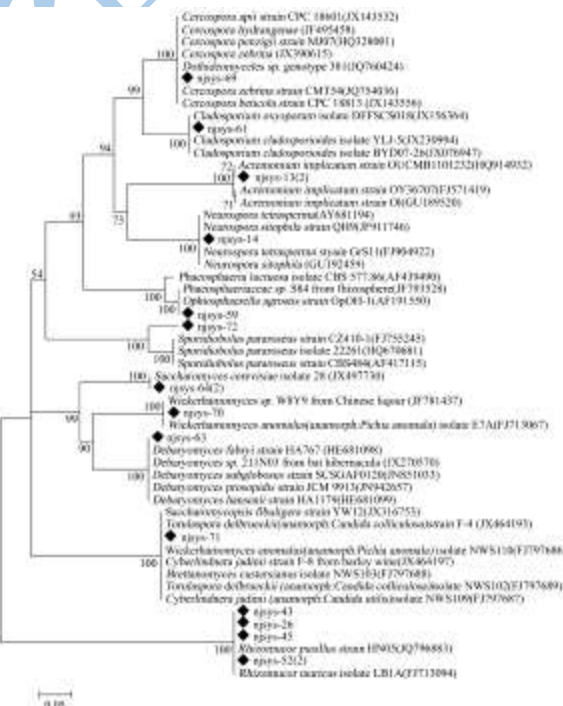


图 5 基于其他真菌 ITS 序列构建的系统发育树
Fig.5 Phylogenetic tree based on the ITS sequence of the other fungi

注：图中加◆为本次实验分离测序的菌株，其中括号内数字表示测序结果完全相同的菌株数目，如 njsys-13(2)，(2)指测序结果有 2 株完全相同的菌株，未标括号和数字则表示只有一株菌。

由图 5 可知其他种类的霉菌包括尾孢菌属 (*Cercospora*, njsys-69)、枝孢菌属 (*Cladosporium*, njsys-61); 支顶孢属 (*Acremonium impicatum*, njsys-13); 脉孢菌属 (*Neurospora*, njsys-14); 根毛霉属 (*Rhizomucor*, njsys-26、43、45、52 等); 菌株 njsys-59 难以鉴定到属, 分别与 *Ophiosphaerella* 和 *Phaeosphaeria* 近似; 分离获得的酵母菌包括: 锁掷酵母属 (*Sporidiobolus pararoseus*, njsys-72)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, njsys-64)、异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomala*, njsys-70)、德巴利氏酵母属 (*Debaryomyces*, njsys-63)。菌株 njsys-71 难以鉴定到属, 分别与复膜孢酵母属 (*Saccharomycopsis fibuligera*)、戴尔有孢圆酵母 (*Torulasporea delbrueckii*)、*Cyberlindnera jadinii*、班图酒香酵母 (*Brettanomyces custersianus*) 近似。从比对结果上看, 菌株 njsys-71 这一个菌种能够与多个不同属种的微生物近似则表明: 所选的参考序列的菌种存在同物异名或者是序列上传者存在错误鉴定。

2.3 浓香型大曲可培养真菌微生物群落组成

通过系统发育学分析, 浓香型大曲内分离获得的 69 株真菌分别属于 16 个不同的属和 3 个属级分类地位未知的类群内, 共计 29 个 OTUs (Operational taxonomic unit, 以序列相似度低于 98% 界定为不同的 OTU), 结果见图 6。

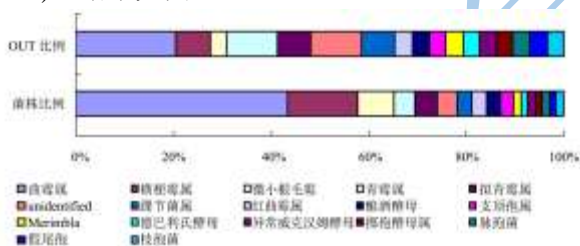


图 6 浓香型大曲可培养真菌的菌群组成

Fig.6 Community composition of cultivable fungi from Luzhou-flavor daqu

从图 6 可以看出, 浓香型大曲内分离的真菌从菌株数目比例上看主要为曲霉属 (包括黄曲霉、黑曲霉等, 占 43.48%)、横梗霉属 (即犁头霉, 占 14.50%)、微小根毛霉 (占 7.25%)、青霉属 (占 4.35%)、拟青霉属 (占 4.35%)、踝节菌属 (占 2.90%)、红曲霉属 (占 2.90%)、酿酒酵母 (占 2.90%)、支顶孢属 (占 2.90%)、*Merimbla* (占 1.45%)、德巴利氏酵母 (占 1.45%)、异常威克汉姆酵母 (占 1.45%)、掷孢酵母属 (占 1.45%)、脉孢菌 (占 1.45%)、假尾孢 (占 1.45%)、枝孢菌 (占 1.45%)、未确定的分类地位的菌株占 4.35%。从 OTUs 比例上看曲霉属 (6 个 OTUs, 占 20.69%)、青霉属 (3

个 OTUs, 占 10.34%)、横梗霉属 (2 个 OTUs, 占 6.90%)、拟青霉属 (2 个 OTUs, 占 6.90%)、踝节菌属 (2 个 OTUs, 占 6.90%) 菌种种类较为丰富; 其余的微小根毛霉、红曲霉属、酿酒酵母、支顶孢属、*Merimbla*、德巴利氏酵母、异常威克汉姆酵母、掷孢酵母属、脉孢菌各有 1 个 OUT, 分别占 3.45%; 未确定的分类地位的菌株有 3 个 OUTs, 占 10.34%。

曲霉属和红曲霉属菌种是大曲中公认的功能菌株, 它们在代谢过程中能产生多种酶类、有机酸、脂肪酸等产物, 对大曲糖化力、酯化力、液化力的好坏起着决定性作用, 进而对酿酒固态发酵产生着极为重要的影响; 横梗霉 (犁头霉) 属是大曲中报道的优势种群, 它们具有少量合成糖化酶和淀粉酶的能力, 对大曲的综合品质有一定的影响, 但在大曲中大量生长会对成品曲的质量不利。大曲中酵母菌从功能上讲主要分产酒和产香两种类型, 但现阶段的研究发现许多酿酒工业的酵母菌都具备这两种功能, 如掷孢酵母属的一些菌种具有产酯的功能, 酒精酵母同时具备产酒精与产香的功能, 而异常威克汉姆酵母 (即异常毕赤酵母) 具有产生酯香的能力, 当然还有相当多类别的酵母在酿酒工业中的功能尚不十分清楚, 有待更进一步的研究。此外, 在分离菌株中也发现了青霉属等有害菌种; 青霉菌在制曲生产中的大量滋生会抑制有益菌的生长并会产生影响白酒风格的苦味。而其它菌株在酿酒工业上的作用也有待更进一步的研究。

3 结论

实验采用了察氏、土豆琼脂、麦芽糖琼脂三种培养基对泸州老窖浓香型大曲中的真菌微生物进行大规模的稀释分离, 并对获得的纯培养菌种进行了分子生物学鉴定与系统发育学分析。研究结果表明: 浓香型大曲内存在大量曲霉属、红曲霉属、根毛霉属、横梗霉属 (犁头霉) 等主要霉菌类群以及酿酒酵母、德巴利氏酵母属、异常威克汉姆酵母 (即异常毕赤酵母)、锁掷酵母属等酵母菌类群, 同时也发现了尾孢菌属、枝孢菌属、脉孢菌属等霉菌类群在大曲中分布, 极大地丰富了对浓香型大曲中真菌种群的认识。此外采用 ITS 区序列进行真菌的分子鉴定可将大多数的真菌鉴定到属, 部分真菌甚至能够鉴定到种; 但是对于近似属、近似种的鉴定有待结合其他手段如多相分类、寻找新的标记基因或多基因联合建树等手段加以更进一步的区分。

参考文献

[1] 张宿义, 许德富. 泸型酒技艺大全 [M]. 北京: 中国轻工业出版社

- 社,2011
- Zhang S Y, Xu D F. Luzhou-flavor liquor technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011
- [2] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,2007
- Shen Y F. The liquor production techniques [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007
- [3] 罗惠波,侯海波,黄治国,等.大曲真核微生物群落 PCR-DGGE 电泳条件优化[J].四川理工学院学报(自然科学版), 2011, 24 (5): 515-518
- Luo H B, Hou H B, Huang Z G, et al. Optimization of PCR-DGGE electrophoresis conditions of eucaryotic microorganisms community in daqu [J]. Journal of Sichuan University of Science & Engineering (Natural Science Edition), 2011, 24 (5): 515-518
- [4] Wang C L, Shi D J, Gong G L. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24: 2183-2190
- [5] 施安辉,张文璞.徐坊大曲的微生物区系及其优势菌的鉴定 [J].酿酒科技,2001,6:26-28
- Shi A H, Zhang W P. Microbial niche of Xufang Daqu and the identification of its dominant micro-organisms [J]. Liquor-making Technology, 2001, 6: 26-28
- [6] 惠丰立,柯涛,褚学英,等.大曲中酵母菌种群结构及多样性分析[J].食品与生物技术学报,2009,28(1):102-106
- Hui F L, Ke T, Zhu X Y, et al. Analysis on community composition and diversity of yeast isolated from Daqu [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2009, 28 (1): 102-106
- [7] Wang H Y, Gao Y B, Fan Q W, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqus by PCR-DGGE [J]. Letters in Applied Microbiology, 53: 134-140
- [8] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社, 2005
- Shen P, Chen X D. Microbial experiments[M]. Beijing: High Education Press, 2005
- [9] Guangbin Ye, Shufang Wang, Lijing Jiang, et al. Distribution and diversity of Bacteria and Archaea in marine sediments affected by gas hydrates at Mississippi Canyon in the Gulf of Mexico [J]. Geomicrobiology Journal, 2009, 26 (6): 370-381
- [10] White T J, Bruns T, Lee S. In PCR protocols: a guide to methods and applications [M]. New York Academic Press Inc, 1990