

基于 ITS4/5 rRNA 区序列对不同时期大曲中霉菌的分离与鉴定

苏畅, 窦晓, 叶新, 马莹莹, 杨建刚

(四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000)

摘要: 利用大曲作为糖化发酵剂是中国传统白酒主要的工艺特点之一。大曲中的微生物组成十分丰富包括各种种类的霉菌、酵母以及细菌, 这些复杂的微生物体系为白酒的发酵提供了必要的微生物、酶以及风味物质。其中霉菌作为酒类发酵生产中必不可少的微生物, 在大曲发酵过程中能够分泌一些糖化酶和蛋白酶等多种酶类以及有机酸等多种代谢产物, 对大曲质量好坏起着重要作用。为了探究大曲中霉菌功能, 本文对不同时期大曲中分离的霉菌采用 ITS4/5 rRNA 区序列进行分析比对, 共分离鉴定了 193 株霉菌, 分属于 13 个种。主要为红曲(*Aspergillus ruber*), 米根霉(*Rhizopus oryzae*), 微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*), *Rhizopus azygosporus*, 烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*), 嗜热子囊菌(*Thermomyces lanuginosus*), 谢瓦氏曲霉(*Aspergillus salwaensis*), *Aspergillus chevalieri*, 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)等, 并构建了 M-L 系统树。根据这些分离鉴定的结果初步探究出大曲生产过程中不同时期霉菌的组成和变化规律。这些结果为进一步研究中国传统白酒的酿造微生物奠定了一定的基础。

关键词: 大曲; 霉菌; ITS4/5 rRNA 区; 分离鉴定

文章编号: 1673-9078(2018)03-54-58

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.03.008

Isolation and Identification of Mold from Daqu in Different Periods Based on the ITS4/5 rRNA Region Sequence

SU Chang, DOU Xiao, YE Xin, MA Ying-ying, YANG Jian-gang

(College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: Daqu, the saccharifying ferments in Chinese traditional liquor fermentation, is rich in microorganisms, including various types of fungi, yeast and bacteria, providing necessary microorganisms, enzymes and flavor substances for the fermentation of liquor. The mold is a necessary microorganism in alcoholic fermentation, and can secrete some enzymes such as glucoamylase and protease and some metabolites such as organic acids, playing an important role in the quality of Daqu. In order to explore the function of mold in Daqu, 193 strains of fungi were isolated from Daqu in different fermentation periods. Analysis and by ITS4/5 rRNA sequence. showed that those strains can be identified to 13 species and the main strains included *Aspergillus ruber*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus azygosporus*, *Aspergillus fumigatus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus salwaensis*, *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus oryzae* and so on. The construction of the M-L tree was established and the composition and variation patterns of mold in different stages of Daqu production were also explored. These results provided a foundation for further research on the brewing microorganisms of Chinese traditional liquor.

Key words: Daqu; mold; ITS4/5 rRNA region; separation and identification

中国传统固态发酵白酒的酿造微生物包括酒醅微生物、窖泥微生物、大曲微生物和环境微生物等四大菌群微生物。不同菌群微生物在酿酒过程中的活动能

收稿日期: 2017-09-02

基金项目: 固态酿造研究院士(专家)工作站开放基金项目(GY2015-03); 四川省省属高校科研创新团队建设计划(16TD026); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室(NJ201501)

作者简介: 苏畅(1993-), 男, 研究生, 研究方向: 酿酒生物技术与应用

通讯作者: 杨建刚(1961-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品发酵与酿造技术

够左右白酒的品质^[1]大曲作为一种多酶多菌的微生态制品在白酒酿制中起糖化、发酵和增香的作用^[2-4]。不同菌群微生物在酿酒过程中的活动能菌作为大曲微生物中的主要组成部分之一, 对大曲的功能的形成有着不可或缺的作用, 能够生产糖化酶和蛋白酶等多种酶类以及有机酸等多种代谢产物^[5]。在大曲研究中, 发现了很多与白酒风味有关的功能菌。张应莲从酱香型大曲中分离到一株白地霉, 研究了它的产蛋白酶特性, 其在最适条件下蛋白酶活力可达到 3387.61 U/mL, 在发酵过程中为降解蛋白质和提供香味物质有一定作用

[6]。曲霉在高温大曲中常见,能够产生糖化酶,通过诱变的黑曲霉 UV-11 具有更高的糖化酶活力,在中型实验中降低了用曲量和提高了出酒率[7]。红曲霉在代谢过程中会产生淀粉酶和蛋白酶等,而且具有较高酯化酶活力,可增加白酒中酯的含量,提高白酒的品质[8]。

传统的霉菌鉴定方法建立在菌株的形态、生理特性和生物化学特性差异之上。然而这些特征会受培养条件的影响,在某种程度上具有不确定性,为确保鉴定结果的可靠性,鉴定一株菌经常需要完成 50~100 项实验[9]。费时费力且重复性不高。分子生物学方法应用于微生物群落结构分析使得对环境样品中占大多数的不可培养微生物的研究成为了可能。

由于功能上高度保守,序列上的不同位置具有不同的变异速率,核糖体 RNA (rRNA) 是目前在微生物分子生态学上最为有用以及应用最广泛的分子标记,通过序列比对,可以分析不同分类水平的系统发育关系。目前,较为常用的分析微生物群落结构的方法大多是建立在对于小亚基上的全长或某个片段进行扩增的基础上的[10]。本研究通过对不同时期大曲中分离的霉 ITS4/5 rRNA 区序列进行分析,在 GenBank 数据库中进行同源序列搜索(BLAST),比较供试菌株与已知霉菌相应序列的同源性。依据分离鉴定的结果对大曲生产过程中的霉菌的演替规律进行了初步探究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

大曲取自泸州老窖制曲生态园,对生产过程中 0、3、5、7、10、25、90 d 的大曲进行采集。在形态学观察的基础上,挑取了 193 株霉菌进行 ITS4/5 rRNA 区的序列测序与比对。

1.1.2 仪器试剂

基因扩增仪(GT9612),杭州柏恒科技有限公司;离心机(CF15R),日立集团;电泳仪(JK600C),北京君意东方电泳设备有限公司;凝胶成像系统 AlphaInnotech,美国 Alpha 公司。Taq PCR Master Mix,引物 27f, 1492r 均购自北京擎科新业生物技术有限公司。Tris, SDS, EDTA, 醋酸钾, 氯仿异戊醇, 异丙醇, 乙醇均购自北京华奥正生科技有限公司; PDA 培养基(马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, 自然 pH) 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 霉菌分离

在泸州老窖制曲生态园中采取第 0、3、5、7、10、25、90 d 的大曲,每个时期的大曲杂碎混匀后取 50 g 加入到 450 mL 无菌水里面充分混匀后,吸取 1 mL 混合液到装有 9 mL 无菌水的试管中,依次做成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 五个梯度,然后再用 PDA 培养基(马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, 自然 pH)进行平板分离。对培养好的平板进行计数,并根据菌落形态差异进行纯化培养。

1.2.2 总 DNA 的提取

丝状真菌是接种环挑取一环纯化后的霉菌菌体(紧贴培养基挑取),接入到含有 500 μ L 75%乙醇的 1.5 mL 离心管中(CTAB 法)。5000 转离心 1 min,收集菌体到管底,倒掉酒精。(如果颜色较深,多用 75%乙醇洗涤几次,洗去色素,以免影响 PCR 结果。可以放入 -20 °C 和室温长期保存)在离心管中加入 1~2 g 石英砂,用牙签或枪头搅拌,将石英砂同菌体混匀,加入液氮,用安装玻璃钻头的手电钻搅拌石英砂,磨碎菌体,破除霉菌细胞壁。(转速不要过快,以免发热影响 DNA 提取率)。加入 500 μ L 月桂酸钠,震荡摇匀 10 min,在通风橱中加入 250 μ L 氯仿异戊醇,加入 250 μ L 的 Tri 饱和酚,震荡摇匀 5 min, 13000 转离心 10 min。吸取上清液 500 μ L,通风橱内加入等体积的异丙醇, -20 °C 放置 30 min 或 1 h, 13000 r/min 离心 15 min,倒掉上清液,管底微小沉淀即为 DNA,加入 75%乙醇缓慢转动离心管洗涤 DNA 后倒掉乙醇,共洗涤 2 次。65 °C 水浴 30 min,烘干乙醇,加入 100 μ L ddH₂O,即为模板 DNA。在 4 °C 下溶解 2 h, -20 °C 保存备用。

1.2.3 PCR 扩增和测序

PCR 扩增 ITS4/5 rRNA 基因区:丝状真菌采用真菌 ITS 基因的通用引物: Its5 的碱基序列为 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', Its4 碱基序列 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',提取与扩增方法见阮云杰扩增反应条件[11]: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s, 循环 35 次; 72 °C 8 min。PCR 反应产物的琼脂糖电泳检测:取 3 μ L PCR 扩增原液点样于 1%的琼脂糖凝胶,电泳,溴化己锭(EB)染色后在紫外灯照射下确定是否扩出所要片段。ITS4/5 rRNA 区扩增出单一明亮条带,片段大小约为 700~800 bp。

1.2.4 DNA 序列分析方法

DNA 序列分析:用 DNA Star 软件并结合 DNA 正反向序列图谱对 DNA 序列进行拼接和校正。将校正后的序列在国际核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)中进行同源序列搜索,初步确定受试菌株的分类地位,一般在 ITS4/5 rRNA 区可以按如下

经验值判断：(1)与最近缘种的模式菌株相似率为100%，可确定为同一种；(2)与最近缘种的模式菌株的相似率<98%，可初步确定为新种；(3)与最近缘种的模式菌株的相似率在99%~100%之间，它们的关系要视不同的情况而定，除考虑序列差异外，还应考虑生理生化性状差异。

2 结果与讨论

2.1 ITS4/5 rRNA 基因区序列的扩增

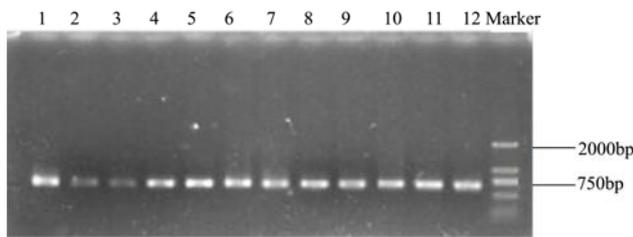


图1 ITS4/5 rRNA 基因区序列的扩增产物电泳图

Fig.1 The electrophoresis map of the amplified product of ITS4/5 rRNA gene sequence

在对分离的193株菌的ITS4/5区序列进行了PCR扩增，下图为部分样品PCR扩增产物电泳图，显示产物的长度都在700~800 bp之间的中间位置，这与丝状真菌的ITS4/5区域序列长度为750 bp左右相符合，说明扩增正常(图1)。

2.2 ITS4/5 区序列的比对

通过对分离的193株丝状真菌的ITS4/5基因区序列在GenBank数据库中进行同源序列搜索(BLAST)后，按照上边论述的要求，将相似度大于97%鉴定为同一种，下表为经过ITS4/5基因序列比对后，不同类型菌株在Genbank数据库中进行同源序列搜索后的结果。由于总体数量较多不能一一呈现，表1中为鉴定到种的菌株每个种选取一株菌株的序列比对结果。

2.3 基于ITS4/5 基因区序列构建 M-L 系统树

用软件MEGA6.06对所有序列进行比对后，删除两端未对齐的碱基生成进化树，并进行1000次的Bootstraps检验。采用“Maximum Likelihood Tree”方法显示进化树(结果见图2)。构建了不同菌株的模式菌株的M-L系统树如图2所示，通过系统发育树的建立对大曲中分离出的不同类型的丝状真菌的种间亲缘关系进行了直观界定。从图中可以看出，不同种属微生物间的差异很明显。通过与前面高通量结果比较可知，大曲发酵过程中占优势的丝状真菌有：红曲霉(*Aspergillus ruber*)，米根霉(*Rhizopus oryzae*)，微小根

毛霉(*Rhizomucor pusillus*)，*Rhizopus azygosporus*，*Aspergillus fumigatus*，嗜热子囊菌(*Thermomyces lanuginosus*)，谢瓦氏曲霉(*Aspergillus salwaensis*)，*Aspergillus chevalieri*，米曲霉(*Aspergillus oryzae*)。

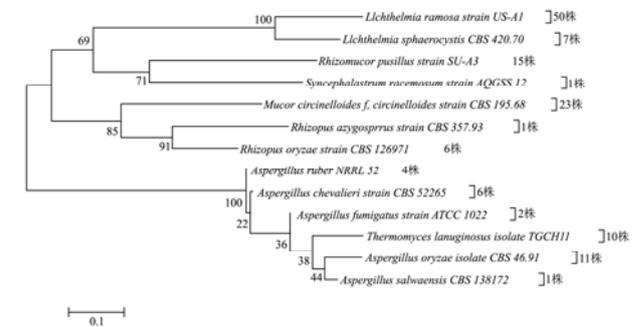


图2 基于ITS4/5区序列构建的M-L系统树

Fig.2 M-L phylogenetic tree established based on ITS4/5 sequence

表1 不同种菌株ITS4/5基因区在Genbank数据库中进行同源序列比对结果

Table 1 The results of homologous sequences comparison in Genbank database of different strains of ITS4/5 gene area

Strain	The related members of the Identity/%	Num ber	GeneBank Accession
90-S56	<i>Aspergillus chevalieri</i>	100	CBS 522.65
90-S55	<i>Aspergillus salwaensis</i>	99.25	AB205055
S15-85	<i>Aspergillus fumigates</i>	100	ATCC 1022
S30-114	<i>Lichtheimia sphaerocystis</i>	100	CBS 420.70
30N-S10	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	99	DAOM 232588
S0-1	<i>Aspergillus ruber</i>	100	NRRL 52
60W-S27	<i>Lichtheimia ramosa</i>	100	TBO38
60W-S31	<i>Rhizopus oryzae</i>	100	CBS 112.07
S6-36	<i>Mucor circinelloides f. circinelloides</i>	99	CBS195.68
S6-42	<i>Rhizomucor pusillus</i>	100	ATCC 46342
S15-74	<i>Rhizopus azygosporus</i>	100	CBS 357.93
90-S38	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	100	AQGSS 12
90-S64	<i>Aspergillus oryzae</i>	100	CBS 466.91

分离时发现发酵后期(90 d)大曲中的丝状真菌中的主要霉菌有微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*)，*Aspergillus chevalieri*和横梗霉(*Lichtheimia ramosa*)。前两种微生物的分离结果与高通量分析结果一致，而*Lichtheimia ramosa*只在高通量多样性分析的科水平上出现，说明横梗霉(*Lichtheimia ramosa*)确实存在，只不过高通量数据在属以及种水平上鉴定时精度大幅降低，又把这类微生物给遗漏了。

2.4 不同时期大曲霉菌的分布规律

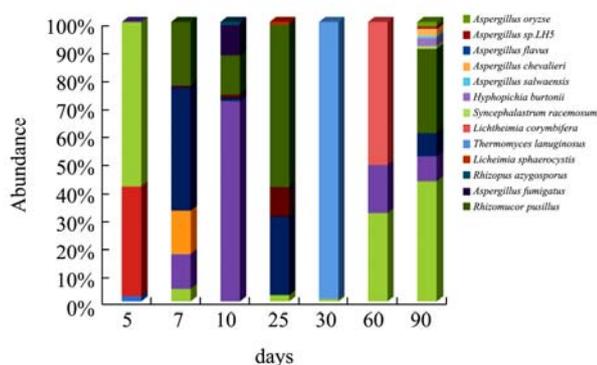


图3 不同时期大曲中霉菌的分布

Fig.3 The Distribution of Mold in Daqu in Different Periods

根据对193株酵母菌的ITS4/5区序列比对鉴定的结果以及前期平板计数的结果对不同时期大曲中的霉菌进行统计分析。如图3所示,大曲生产顶温期(7~10 d)霉菌的种群数量较多,其数量也较多,推测原因可能是部分霉菌都比较耐高温,而其他酵母或者细菌在高温下种群数量都一定程度的减少,使得霉菌在大曲的水分与养分方面没有竞争。第30 d,霉菌的种群数量和数量都呈现大幅下降,推测原因可能是因为大曲的水分和养分开始减少影响了大部分霉菌的生长。第90 d大曲基本达到成品曲的水平,这时期微生物的种类很丰富,各种菌群达到了一种比较平衡的状态。

3 结论

3.1 本文通过传统的平板计数的方法对大曲培菌过程中的霉菌的种群变化进行了初步的统计分析,发现顶温区(7~10 d)霉菌数量最多,其次是在成品大曲(90 d),在顶温区(7~10 d)主要以卷枝毛霉(*Mucor circinelloides f. circinelloides*)、微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*)以及牛根毛霉(*Rhizomucor tauricus*),在成品大曲(90 d以后)主要是以多枝横梗霉(*Lichtheimia ramosa*)、微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*)以及卷枝毛霉(*Mucor circinelloides f. circinelloides*),其中多枝横梗霉(*Lichtheimia ramosa*)、微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*)在大曲整个培菌期间都呈稳定趋势,说明它们对大曲的品质好坏起着至关重要的作用。吕梅等人从高温大曲中分离的多枝横梗霉,发现其具有产酯酶的能力^[12],而且一些研究中发现多枝横梗霉具有产 β -葡萄糖苷酶的能力^[13,14],该酶是一种能催化水解芳基或羟基与糖基原子团之间的糖苷键生成葡萄糖的酶^[15]。作为纤维素酶水解纤维素过程中微小根毛霉最后一步关键酶,把纤维二糖和短链的纤维寡糖分解为可利用的葡萄糖^[16,17]。而微小根

毛霉(*Rhizomucor pusillus*)在一些研究中则发现其有优良的产淀粉酶能力^[18,19]在60 d霉菌数量在整个培菌期间最少,主要是以多枝横梗霉(*Lichtheimia ramosa*)、*Lichtheimia corymbifera*。在第30 d主要以嗜热子囊菌(*Thermomyces lanuginosus*)为主,在该期间主要处于大曲的打搅阶段,即将曲块转过集中且不留缝隙,存放15~30 d。故推测该菌不光在耐高温,可能在耐低氧浓度等方面也要优于其他霉菌。从种类丰度方面来看,在第30 d霉菌的种类丰度是最低的,而在成品曲(90 d以后)种类丰度最高,这也进一步说明,曲房氧浓度对于霉菌的生长繁殖至关重要。

3.2 目前,对微生物的研究主要分为表型特征鉴定法和基因型鉴定法。表型特征鉴定法是与微生物分离相结合的,这种方法工作量大,准确率低,但是能得到活的菌株,利于后续研究。如Chang-lu Wang等通过表型特征鉴定法对茅台大曲中的微生物进行了系统的分离鉴定^[20]。基因型鉴定法多是对样品进行总DNA的提取之后,通过对微生物通用保守序列的比对,从而可以分析鉴定出样品中可培养以及不可培养的微生物,具有快速准确等优点,但是多数得不到活的菌株,不利于后续深入研究。人们采用基因型鉴定法对微生物的群落研究应用已经很广泛, Jia Zheng等采用DGGE与PLFA结合的方法现代分子生物学的方法对不同窖龄窖泥的微生物进行了分析研究^[21]; Zhang Liqiang等运用PCR-DGGE技术解析了不同类型大曲中微生物的组成差异^[22],但是大曲中仍然存在很多不可培养的微生物,它们的存在影响着大曲的品质。所以不论是传统的表型特征鉴定方法还是现代的分子生物学方法都有着自身的优缺点。由于微生物极其微小,区别于动植物单纯的通过表型特征是不能将它们进行确切分类的。

3.3 虽然目前随着各种分离技术的进步,能分离出来的微生物越来越多,但是在实验室条件下能分离出来的微生物仍占不到环境微生物的10%^[23-26]。因此对环境微生物群落的研究不能局限在传统分离培养的基础上,必须结合现代分子生物学的方法,这样才能对可培养微生物和非可培养微生物有一个系统的认识。

参考文献

- [1] 李欣,王彦华,林静怡,等.高通量测序技术分析酱香型白酒酒醅的微生物多样性[J].福建师范大学学报(自然科学版), 2017,33(1):51-59
- LI Xin, WANG Yan-hua, LIN Jing-yi, et al. Analysis of Maotai liquor fermented grains of microbial diversity of high-throughput sequencing technology [J]. Journal of Fujian

- Normal University (Natural Science Edition), 2017, 33(1): 51-59
- [2] 任飞,周红海,韩珍珠.夏季浓香型大曲生产的工艺控制[J].酿酒科技,2007,8:56-58
REN Fei, ZHOU Hong-hai, HAN Zhen-qiong. Process control of Luzhou flavor Daqu production in summer [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2007, 8: 56-58
- [3] 许德富,沈才萍.制约大曲质量品质的条件剖析及前景展望[J].酿酒科技,2003,30(5):33-34
XU De-fu, SHEN Cai-ping. The condition analysis and prospect of restricting Daqu quality and quality [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2003, 30(5): 33-34
- [4] 唐玉明,沈才洪.酒曲理化品质指标相关性探讨[J].酿酒科技,2006,7:37-41
TANG Yu-ming, SHEN Cai-hong. Investigation on the correlations of physicochemical indexes of starter [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2006, 7: 37-41
- [5] 余伟民,曾志,吴生文,等.红曲霉对特香型白酒风味风格物质影响[J].中国酿造,2012,31(3):87-91
YU Wei-min, ZENG Zhi, WU Sheng-wen, et al. Influence of *Monascus* on the style and flavor components of special-flavor liquor [J]. China Brewing, 2012, 31(3): 87-91
- [6] 张应莲,黄永光,邱树毅.酱香大曲中白地霉产蛋白酶固态发酵条件及其优化[J].中国酿造,2012,31(3):35-38
ZHANG Ying-lian, HUANG Yong-guang, QIU Shu-yi. Solid-state fermentation condition and its optimization of protease production by *Geotrichum candidum* in Moutai-flavor Daqu [J]. China Brewing, 2012, 31(3): 35-38
- [7] 天津酿酒厂.试用黑曲霉 UV-11 生产白酒小结[J].黑龙江发酵,1978,4:38-45
Tianjin brewery. Production of white wine by *Aspergillus niger* UV-11 [J]. Heilongjiang Fermentation, 1978, 4: 38-45
- [8] 赵东,胡晓龙,彭志云,等.浅谈红曲霉在白酒中的应用[J].酿酒,2010,37(2):11-13
ZHAO Dong, HU Xiao-long, PENG Zhi-yun, et al. Elaborates the application of monascus in liquor industry [J]. Liquor Making, 2010, 37(2): 11-13
- [9] Lin C C S, Fung D Y. Conventional and rapid methods for yeast identification [J]. Crit. Rev. Microbiol., 1987, 14(4): 273-289
- [10] 李晓然.基于核糖体 RNA 高通量测序分析微生物群落结构[D].上海:复旦大学,2011
LI Xiao-ran. Using ribosomal RNA pyrosequencing to explore the microbial community structure [D]. Shanghai: Fudan University, 2011
- [11] 阮运杰.DNA 凝胶电泳分析系统研究[D].哈尔滨:哈尔滨工程大学,2012
RUAN Yun-jie. Analysis system of DNA gel electrophoresis [D]. Harbin: Harbin Engineering University, 2012
- [12] 吕梅,陈茂彬,镇达.浓香型大曲产酯酶菌株 HSM 的分离及产酶营养条件研究[J].酿酒科技,2014,1:12-15,20
LV Mei, CHEN Mao-bin, ZHEN Da. Isolation of esterase-producing strain HSM from strong-flavor daqu and study on its esterase-producing nutritional conditions [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2014, 1: 12-15, 20
- [13] Garcia N F L, Santos F R D S, Gonçalves F A, et al. Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa*, in agro industrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2015, 18(4): 314-319
- [14] Gonçalves F A, Leite R S R, Rodrigues A, et al. Isolation, identification and characterization of a novel high level β -glucosidase-producing *Lichtheimia ramosa* strain [J]. Biocatalysis & Agricultural Biotechnology, 2013, 2(4): 377-384
- [15] Edwin Clifford Webb. Enzyme nomenclature: recommendations of the nomenclature committee of the international Union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes [M]. San Diego: Academic Press, 1992
- [16] 曾青兰.纤维素酶研究进展[J].现代农业科学,2007,6:42-46
ZENG Qing-lan. Research progress of cellulase [J]. Modern Agricultural Sciences, 2007, 6: 42-46
- [17] 郭敏辰,郑建丰.黑曲霉液体发酵纤维素酶的研究[J].酿酒科技,1998,3:25-28
WU Min-chen, ZHENG Jian-feng. Study on the culture conditions of *Aspergillus* to produce cellulose [J]. Liquor-Making Science & Technology, 1998, 3: 25-28
- [18] Turchi S L, Becker T. Improved purification of α -amylase isolated from *Rhizomucor pusillus*, by affinity chromatography [J]. Current Microbiology, 1987, 15(4): 203-205
- [19] 任颢珂,陈莉,卢红梅,等.茅台地区酱香型酒糟中高温真菌的分离鉴定[J].中国酿造,2017,36(2):69-74
REN Xie-ke, CHEN Li, LU Hong-mei, et al. Isolation and identification of thermophilic fungi from Moutai-flavor vinasse in Moutai area [J]. China Brewing, 2017, 36(2): 69-74
- [20] Chang-lu Wang, Dong-jian Shi, Guo-li Gong.

- Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24(10): 2183-2190
- [21] Jia Zheng, Ru Liang, Liqiang Zhang, et al. Characterization of microbial communities in strong aromatic liquor fermentation pit muds of different ages assessed by combined DGGE and PLFA analyses [J]. *Food Research International*, 2013, 54: 660-666
- [22] Zhang Liqiang, C Wu, X Ding, et al. Characterizations of microbial communities in Chinese liquor fermentation starters Daqu using nested PCR-DGGE [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014, 30(12): 3055-3063
- [23] Lane D J. *Nucleic acids techniques in bacterial systematic* [M]. New York: John Wiley & Sons, 1991
- [24] Thompson J R, Marcelino L A, Polz M F. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR' [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(9): 2083-2088
- [25] Hamady M, Walker J J, Harris J K, et al. Error-correcting bar coded Primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex [J]. *Nature Methods*, 2008, 5(3): 235-237
- [26] Suzuki M T, Taylor L T, DeLong E F. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4605-4614