

绍兴黄酒麦曲中真菌多样性的研究

曹 钰^{1,2}, 陆 健^{1,2,*}, 方 华², 李旺军², 谢广发³, 邹慧君³, 胡志明³

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122 3. 浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司, 浙江 绍兴 312000)

摘 要: 运用传统分离培养方法和 RISA 图谱分析方法, 结合序列测定技术对绍兴黄酒麦曲中真菌的多样性进行了研究。通过纯培养的方式对绍兴黄酒麦曲进行分离, 并运用 ITS 序列分析技术对获得的不同菌株进行了分类鉴定, 结果显示在分离获得的 16 种丝状真菌中, 伞枝犁头霉、米根霉、微小毛霉、米曲霉、烟曲霉是麦曲中的主要真菌。RISA 图谱分析结果表明这一非培养方法可应用于麦曲中主要真菌的组成研究。此外, 运用 RISA 图谱技术比较了位于不同区域工厂的麦曲真菌多样性, 结果显示不同生产区域的麦曲中优势真菌的组成不同, 证实周边地域环境是影响麦曲中真菌多样性的重要因素。

关键词: 绍兴黄酒; 麦曲; RISA; 真菌多样性

Fungal Diversity of Wheat *Qu* of Shaoxing Rice Wine

CAO Yu^{1,2}, LU Jian^{1,2,*}, FANG Hua², LI Wang-jun², XIE Guang-fa³, ZOU Hui-jun³, HU Zhi-ming³

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

3. Zhejiang Guyue Longshan Shaoxing Wine Co. Ltd., Shaoxing 312000, China)

Abstract: Fungal diversity of wheat *Qu* of Shaoxing rice wine was studied by conventional dilution plate method and a culture-independent method RISA (ribosomal intergenic spacer analysis), combining with sequencing. Sixteen kinds of filamentous fungi were separated from wheat *Qu* and identified by internal transcribed spacer sequencing technology. Among all cultures, *Absidia corymbifera*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus fumigatus* were major fungus in wheat *Qu*. The results of RISA fingerprint analysis showed this culture-independent method could be used to study fungal diversity of wheat *Qu*. Different kinds of wheat *Qu* from three rice wine factories were compared by RISA fingerprint analysis method. The results showed the main fungi in wheat *Qu* from three districts were different obviously, and proved that regional environment factors influenced the wheat *Qu* fungal community significantly.

Key words: Shaoxing rice wine; wheat *Qu*; RISA; fungal diversity

中图分类号: TS262.4 Q939.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0277-06

“以麦制曲, 用曲酿酒”是中国黄酒的特色。麦曲在黄酒酿造中具有极其重要的地位, 被喻为“酒之骨”。麦曲质量的优劣直接影响到黄酒的产量和质量, 其内在品质与黄酒品质之间相辅相成。在黄酒发酵中麦曲具有复合糖化发酵粗酶制剂的功能, 并且赋予了黄酒独特的色、香、味。黄酒酿造用的麦曲是采用固态培养体系, 在人工创造的培养条件下自然培育而形成的^[1]。麦曲中的微生物来源包括环境空气、制曲用水、制曲工具以及小麦原料等带入的微生物, 受到诸多方面的因

素影响, 形成了麦曲中的极其复杂的微生物群落。

通常, 对于微生物体系的研究往往采用梯度稀释分离培养的方法进行, 但是由于分离培养条件的选择性限制, 对于复杂体系及其动态变化往往很难再现样本中的存在状况。近年来, 基于 PCR 扩增的分子生物技术^[2-5], 如核糖体内转录基因间隔区分析(RISA, ribosomal intergenic spacer analysis)、变性梯度凝胶电泳(DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis)、温度梯度凝胶电泳(TGGE, temperature gradient gel electrophoresis)、

收稿日期: 2007-02-28

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0532); 工业生物技术教育部重点实验室开放课题(KLIB-KF200709); 江苏省“青蓝工程”资助项目; 绍兴市重点科研工业项目(2006A21036)

作者简介: 曹钰(1971-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事微生物方面的研究。E-mail: tsaoy5@jiangnan.edu.cn

* 通讯作者: 陆健(1968-), 男, 教授, 博士, 主要从事发酵工程、酿造微生物和酶学研究。E-mail: L_jian8@yahoo.com.cn

末端限制性酶切片多态性(T-RFLP, terminal restriction fragment length polymorphism)等非培养的微生物分子生态学方法, 在环境样本的真菌多样性研究中, 能够较快捷、客观地反映微生物的存在状况和变化。

本实验采用传统分离培养方法和核糖体内转录基因间隔区分析(RISA)技术, 对绍兴黄酒麦曲这一复杂微生物体系中的真菌多样性进行研究。

1 材料与方法

1.1 样品来源

麦曲由绍兴的黄酒公司(下属三个工厂A、B、C)提供。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 纯培养物的分离

采用察氏培养基、土豆琼脂培养基、麦芽汁培养基对麦曲中的真菌进行稀释分离, 培养基中均加入30mg/L的链霉素抑制细菌生长和200mg/L的脱氧胆酸钠抑制菌丝蔓延。将所得到的单菌落转接到相同的培养基中, 通过形态的差异挑选出不同的真菌。

1.2.2 DNA的提取、克隆筛选和序列分析

菌株染色体的提取参照朱衡等^[6]的方法提取, ITS rDNA的PCR扩增引物为pITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和pITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[7](上海生工生物工程公司)。50μl PCR反应体系: 41μl ddH₂O、5μl 10×PCR缓冲液(含MgCl₂)、1μl 4×dNTP(上海申能博彩生物有限公司)、1μl pITS1、1μl pITS4、1μl DNA模板(1×10⁻³pmol/μl)。PCR扩增条件为95℃变性5min, 冰上加入1μl Taq酶。94℃变性30s, 58℃退火30s, 72℃延伸45s, 共30个循环。然后72℃延伸10min。保存于-20℃备用。PCR反应结果用2%的琼脂糖凝胶电泳检测, 拍照。

PCR产物经割胶纯化, 用pMD18-T(宝生物工程大连有限公司)连接, 转化*E. coli* JM109后, 通过PCR扩增验证插入片段。测序由宝生物工程大连有限公司完成。

1.2.3 纯培养物的显微形态观察

斜面保藏的纯培养物接种到察氏培养基上, 30℃培养5~7d, 乳酸石炭酸棉兰染色, 高倍镜下(40×16)观察形态, 数码显微摄影。

1.3 核糖体内转录基因间隔区分析(RISA)

1.3.1 麦曲样品处理

无菌条件下, 将粉碎好的麦曲加入带玻璃珠的三角瓶中, 加入无菌生理盐水洗涤麦曲, 将悬浮液纸过滤后, 滤液经离心收集沉淀, 用于提取总DNA。

1.3.2 DNA的提取与PCR扩增

DNA的提取和PCR扩增参照1.2.2, PCR产物经PCR Purification Kit(上海华舜生物工程公司)纯化后, 进行4%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电压100V。电泳结束后, 溴化乙锭染色15min。紫外拍照后, 回收样品中的各条带, 置于1.5ml的离心管中, 供回收使用。

1.3.3 基因克隆和序列分析

加入50μl的洗脱缓冲液^[8](500mmol/L乙酸铵、10mmol/L乙酸镁、1mmol/L EDTA、0.1% SDS)于放有PAGE条带的离心管中, 37℃水浴5h, 12000×g离心10min, 取上清, 用PCR Purification Kit回收DNA。然后以纯化DNA为模板, 序列克隆按1.2.2方法进行。测序结果提交GenBank数据库, 利用Blastn软件进行序列比对, 选取序列最相近的1个GenBank收录序列, 用DNAMAN软件分析克隆子的序列与GenBank收录序列的相似性。

2 结果与分析

2.1 运用传统分离培养方法研究麦曲中真菌的多样性

2.1.1 真菌的分离

对A厂麦曲样品采用不同的培养基进行梯度稀释分离, 从3000多个菌落中根据菌落形态^[9]的差异共分得不同真菌16种, 均为丝状真菌, 编号JZQ-1~JZQ-16, 各菌株的数量和所占比例分别见图1和图2。

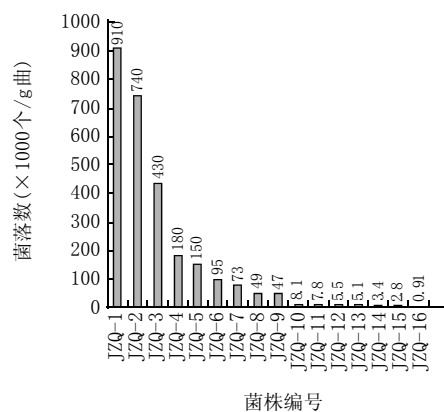


图1 每克麦曲中各分离菌株的菌落数

Fig.1 Number of clones in wheat Qu per gram

结果显示从麦曲中可分离出来的丝状真菌总菌落数达 2.7×10^6 个/g麦曲, 其中JZQ-1~JZQ-5的菌落数均在 10^5 个/g麦曲以上, 占分离总菌落数的89%, 初步认为这5株丝状真菌是麦曲中的主要真菌。JZQ-6~JZQ-9的菌落数均在 10^4 个/g麦曲以上, 约占分离总菌落数的10%, 而JZQ-10~JZQ-16的数量级均在 10^3 , 数量在已分离的丝状真菌中所占比例小于2%。

2.1.2 真菌的鉴定

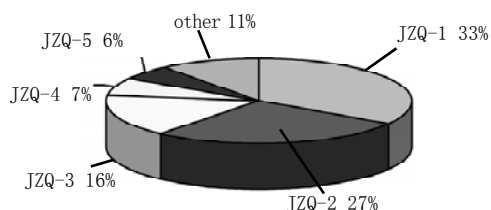


图2 各分离菌株所占比例

Fig.2 Percentage of fungal clones obtained from wheat Qu

由于真菌的形态特征复杂,且少数形态特征和生理生化指标随着环境的变化而不稳定,为避免经典分类依据引起的分类分歧,同时还采用已被广泛应用于微生物菌种鉴定的rDNA序列测定技术。由于rDNA客观存在着广泛的保守区域和进化水平不同的区域,适用于不同等级的分类研究。对于真菌而言,5.8S rRNA序列进化缓慢且相对保守,而核糖体内转录基因间隔区(internal transcribed spacer, ITS)由于不加入成熟核糖体,在进化过程中承受的自然选择压力小,序列的进化速率相对较快,能容忍更多的变异,在绝大多数的真核生物中表现出了极为广泛的序列多态性。这使得ITS序列(ITS1-5.8S-ITS2)兼具高度的保守性和差异性,已被应用于种及种以下分类单元的鉴定^[10-12],鉴定方法具有操作简便,特异性高、准确可靠等优点。

对A厂麦曲中分离获得的16株纯培养物,进行ITS序列扩增和测序,并将测序结果提交GenBank数据库,利用Blast工具与GenBank中最相似序列进行比对,结果见表1。

表1的鉴定结果显示,从A厂麦曲中分离获得的16

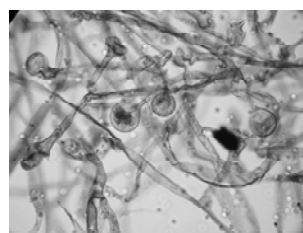
表1 16株丝状真菌的ITS1-5.8S-ITS2序列与GenBank最相似序列的比对结果

Table 1 Most similar ITS sequences of clones with sequences obtained from GenBank

| 菌株 | ITS 片断长度(bp) | 序列相似度 (%) | 比对结果 | 接受号 |
|--------|--------------|-----------|-------------------------------------|----------|
| JZQ-1 | 856 | 99 | <i>Absidia corymbifera</i> | EF136359 |
| JZQ-2 | 678 | 99 | <i>Rhizopus oryzae</i> | EF136360 |
| JZQ-3 | 627 | 100 | <i>Rhizomucor pusillus</i> | EF136361 |
| JZQ-4 | 595 | 100 | <i>Aspergillus oryzae</i> | EF136362 |
| JZQ-5 | 597 | 100 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | EF136363 |
| JZQ-6 | 566 | 99 | <i>Emmericella nidulans</i> | EF136364 |
| JZQ-7 | 599 | 100 | <i>Aspergillus niger</i> | EF136365 |
| JZQ-8 | 573 | 100 | <i>Penicillium thiersii</i> | EF136366 |
| JZQ-9 | 590 | 98 | <i>Penicillium oxalicum</i> | EF136367 |
| JZQ-10 | 568 | 99 | <i>Aspergillus sydowii</i> | EF136368 |
| JZQ-11 | 509 | 100 | <i>Issatchenkia orientalis</i> | EF136369 |
| JZQ-12 | 382 | 100 | <i>Clavispora lusitaniae</i> | EF136370 |
| JZQ-13 | 569 | 100 | <i>Alternaria alternata</i> | EF136371 |
| JZQ-14 | 570 | 100 | <i>Alternaria mali</i> | EF136372 |
| JZQ-15 | 552 | 100 | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | EF136373 |
| JZQ-16 | 550 | 100 | <i>Cladosporium oxysporium</i> | EF136374 |

种丝状真菌,分别为伞枝犁头霉(*Absidia corymbifera*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)、微小毛霉(*Rhizomucor pusillus*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、构巢裸孢壳(*Emmericella nidulans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、*Penicillium thiersii*、草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)、赛氏曲霉(*Aspergillus sydowii*)、*Issatchenkia orientalis*、鲁西坦念珠菌(*Clavispora lusitaniae*)、链格孢(*Alternaria alternata*)、苹果链格孢(*Alternaria mali*)、芽孢枝孢(*Cladosporium cladosporioides*)、尖孢枝孢(*Cladosporium oxysporium*)。各株真菌纯培养物的显微形态图见图3。

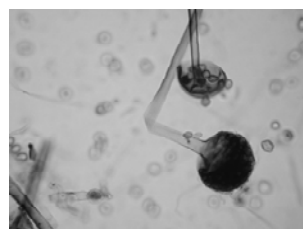
结合表1和图2的结果分析麦曲中的丝状真菌,可以看出,属于毛霉目的犁头霉属、根霉属、毛霉属在麦曲中的数量相当大,达到76%,而曲霉属虽然只占总数的18.7%,但是种类却是最多的,有5个不同的种。



JZQ-1



JZQ-2



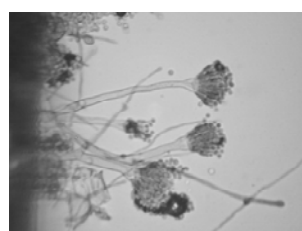
JZQ-3



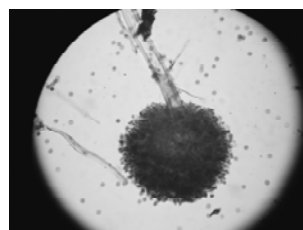
JZQ-4



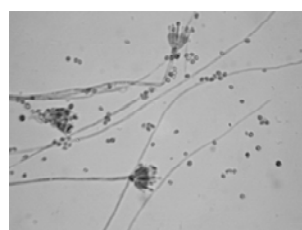
JZQ-5



JZQ-6



JZQ-7



JZQ-8

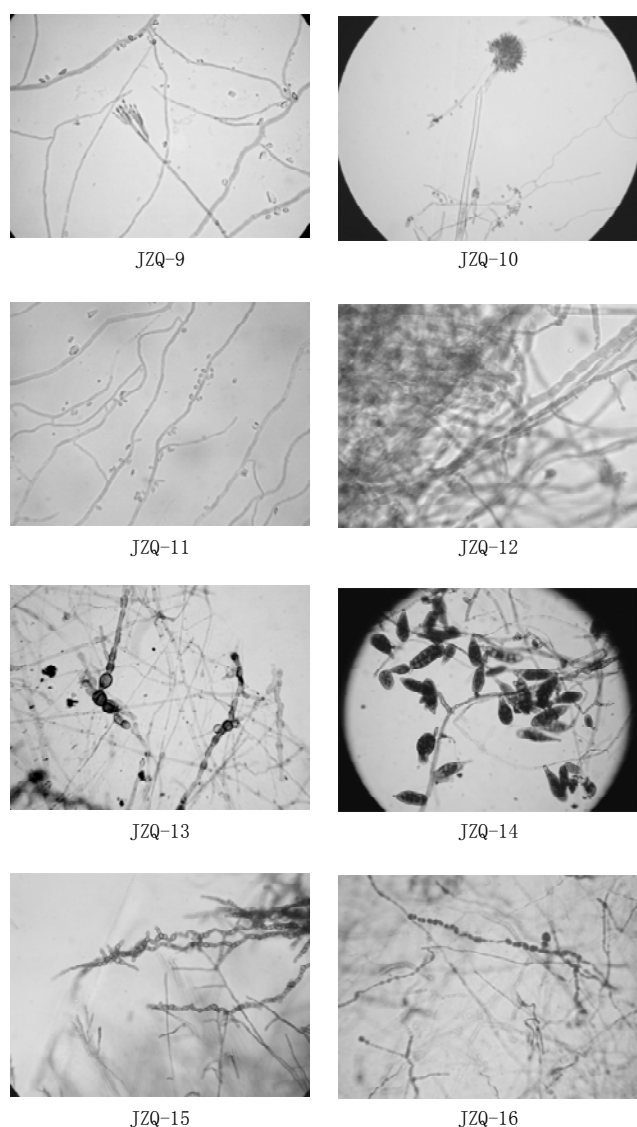


图3 16株丝状真菌的显微形态
Fig.3 Photomicrograph of fungal clones obtained from wheat Qu

此外青霉属只占很小的比例3.5%，而链格孢属、枝孢属所占的比例则相当微弱。

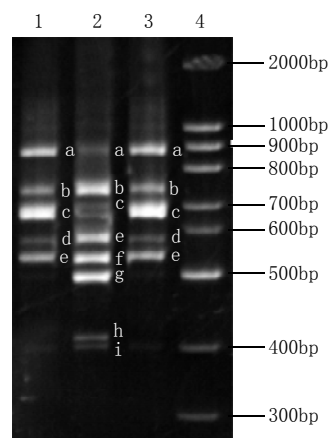
分离和鉴定的结果显示伞枝犁头霉、米根霉、微小毛霉、米曲霉、烟曲霉是绍兴黄酒麦曲中的主要真菌。研究结果与上世纪六十年代，对绍兴黄酒麦曲微生物的整理结论相比有较大差异。以往的总结性认识研究认为：采用自然培育方法的传统麦曲中主要含黄曲霉（或米曲霉）、根霉、毛霉和少量的黑曲霉、灰绿曲霉、青霉、酵母等^[13]。此后有关黄酒麦曲微生物的研究认为主要霉菌是米曲霉、根霉、毛霉、犁头霉，除米曲霉外，根霉、毛霉等均未鉴定到种的水平^[14]。

2.2 RISA 图谱分析

RISA 图谱分析的原理是根据不同微生物的 ITS 序列长度不同，在凝胶中具有不同的迁移速度，而聚丙烯稀

酰胺凝胶电泳(PAGE)的分辨率非常高，在1000bp内能将长度相差1bp的不同DNA片断分开^[15]。

提取麦曲样品中微生物的总DNA，经PCR扩增，应用PAGE分离麦曲中真菌的ITS序列，得到的RISA图谱如图4所示。



泳道1~3分别来自A、B、C三个工厂的样品；泳道4：100bp Ladder Marker。

图4 A、B、C工厂麦曲中真菌的RISA图谱

Fig.4 RISA fingerprint of wheat Qu from A, B and C factories

结果显示三厂麦曲样品的扩增条带分布在300~900bp之间。A厂(1号样)和C厂(3号样)的图谱在条带数目和位置、条带亮度上完全相同，暗示两厂麦曲样品中的优势真菌的种类相同。而B厂(2号样)的图谱无论是在条带数目、位置，相同位置出现的条带亮度上，都有别于其他两厂，反映出该厂麦曲样品中优势真菌的种类更丰富，且条带所代表的真菌在样品中的数量或比例不同于A、C两工厂。

将图谱中A、B、C工厂的麦曲样品的各条条带经胶回收、克隆测序，结果见表2。测序结果证实A、C两厂具有完全相同的优势真菌组成，即伞枝犁头霉、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、微小毛霉、米曲霉、构巢裸孢壳。而B厂的真菌组成中不仅包括了A、C两厂中的5种真菌，还包括热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、鲁西坦念珠霉。

虽然三个黄酒工厂的制曲工艺相同，但是由于麦曲的制作过程是一个开放的体系，麦曲中的微生物经自然培育而形成，因而地域环境因素势必影响到成品麦曲中的优势真菌的组成。从地理位置上看，A、C两厂相距5公里左右，而B厂与A、C两厂均相距25公里左右。三个工厂麦曲样品的RISA图谱及条带测序结果证实了周边地域环境确实对麦曲中的真菌组成具有影响。

此外，用RISA图谱法分析获得的A厂麦曲样品的真菌组成多样性结果，与传统分离培养法得到的结果之间存在一定的差异。RISA图谱(1号泳道)表明A厂麦曲

中,酿酒酵母是一种主要真菌。而在传统分离方法中并未分离出酿酒酵母,分析认为这是由于培养基和培养条件的设定限制,此外还可能是由于制曲过程中,麦曲的品温可以高达 55℃,而且成品麦曲的水分含量只有 12.5%,因而最终在成品麦曲中存在的酿酒酵母活菌数非常少;另一方面,传统分离培养法表明米根霉、烟曲霉是 A 厂麦曲中的一种主要真菌,但在 RISA 图谱条带测序结果却未反映出。从图 4 中分析认为,极有可能源于 RISA 图谱中片长相近的条带分离效果不能达到理想状态,导致回收测序时的条带信息丢失。在多个领域的研究表明没有单独的一种方法能全面反映出复杂体系中的组成多样性,因此,结合传统分离培养法和微生物分子生态学方法来研究麦曲中的真菌,可以更客观地反映出麦曲中的真菌组成多样性。

表2 A、B、C 三个黄酒工厂麦曲样品的 RISA 图谱条带测序结果
Table 2 Alignment of sequenced clone to its most similar GenBank sequence from RISA fingerprint of the three factories' samples

| 菌株 | ITS 片断 长度(bp) | 序列相似度 (%) | 比对结果 |
|---------|------------------|--------------|---------------------------------|
| A 厂麦曲样品 | | | |
| 1-a | 853 | 99 | <i>Absidia corymbifera</i> |
| 1-b | 776 | 99 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| 1-c | 628 | 100 | <i>Rhizomucor pusillus</i> |
| 1-d | 597 | 100 | <i>Aspergillus oryzae</i> |
| 1-e | 565 | 99 | <i>Emericella nidulans</i> |
| B 厂麦曲样品 | | | |
| 2-a | 855 | 99 | <i>Absidia corymbifera</i> |
| 2-b | 771 | 99 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| 2-c | 678 | 99 | <i>Rhizopus oryzae</i> |
| 2-d | 628 | 100 | <i>Rhizomucor pusillus</i> |
| 2-e | 597 | 100 | <i>Aspergillus oryzae</i> |
| 2-f | 565 | 99 | <i>Emericella nidulans</i> |
| 2-g | 529 | 98 | <i>Candida tropicalis</i> |
| 2-h | 条带未能回收 | | |
| 2-i | | | |
| | 382 | 100 | <i>Clavospora lusitaniae</i> |
| C 厂麦曲样品 | | | |
| 3-a | 853 | 99 | <i>Absidia corymbifera</i> |
| 3-b | 776 | 99 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| 3-c | 628 | 100 | <i>Rhizomucor pusillus</i> |
| 3-d | 597 | 100 | <i>Aspergillus oryzae</i> |
| 3-e | 565 | 99 | <i>Emericella nidulans</i> |

3 讨 论

麦曲是传统黄酒浓醪发酵的物质基础,也是奠定黄酒风格的重要保障。它是以小麦和水为原料,在特定的季节条件下,通过控制生产过程中的温度和水分,在开放式培养环境中,将源于小麦本身、制曲工具所携带、空气中的微生物富集而形成。成品麦曲中含有丰富的微生物及酶系,并且最终整体参与到黄酒发酵中,

奠定黄酒的风格。国内以往针对黄酒麦曲微生物的认识基于经验居多,研究内容仅局限于分离其中的主要产糖化酶的真菌。在上世纪六七十年代的中国酒曲和窖泥微生物研究中,曾对黄酒酒药中的酵母和麦曲中产糖化酶的霉菌开展过分离及部分产酶特性研究,并在此基础上进行了纯种熟麦曲的生产革新,但由此带来的风味变差等不良后果始终困扰着黄酒行业,反映出麦曲中微生物的多样性是黄酒风味的必要基础。另一方面,当今的全球性气候变化、转基因植物的种植、污染造成环境中微生物的变异等问题都有可能对传统黄酒的生产造成不可预测的影响。所以非常有必要开展传统酿造的基础研究,了解麦曲中的微生物尤其是真菌的多样性,认识功效微生物的组成及进行功能解析。

然而麦曲中的微生物极其复杂,应用传统分离培养方法在涉及多个样本及动态变化研究中,不仅工作量巨大,而且在分析时往往束手无策。近年来以分子生物学技术为基础的微生物分子生态学,在研究复杂微生物的种群结构和功能,动态变化以及与环境间的相互关系方面,具有传统方法无法比拟的优势,成为阐述微生物的多样性的强有力技术手段。将微生物分子生态技术在传统酿造领域中加以应用,开展麦曲中真菌多样性的研究,为分析环境因素与麦曲形成的相关性,以及科学阐述黄酒的地域性特征奠定基础,并将为进一步解析黄酒发酵中麦曲的功能和影响等机理问题提供依据,而这些基本问题的突破,能够加速传统酿造行业的技术变革。

本研究中首先采用察氏、土豆琼脂、麦芽汁三种培养基对 A 厂麦曲中的真菌进行大规模的稀释分离,并对获得的纯培养物进行了分子鉴定。分离鉴定的结果认为伞枝犁头霉、米根霉、微小毛霉、米曲霉、烟曲霉是麦曲中的主要丝状真菌,结果不完全同于以往的经验性结论,这一差异是否源于几十年来的周边自然生态环境的变化而导致,尚需进一步研究论证,有关工作目前正在进行。

本实验运用 RISA 指纹图谱技术来研究麦曲样品中的真菌多样性,具有方便、快速的优点,但这种方法对聚丙烯酰胺凝胶的质量和电泳条件有较高要求,而且同样也具有基于 PCR 的各种分子生态学方法的缺陷。在对比采用 RISA 图谱和稀释分离培养两种方法对 A 厂麦曲中优势微生物的分析中,得到的结果存在一定偏差,反映出对于一个微生物群落组成复杂的体系,目前所用的任何单一方法都不能穷尽认识,采用传统分离培养法和分子方法相结合更能反映麦曲中真菌的本来面目。

此外运用 RISA 图谱法和条带测序对绍兴 3 个黄酒厂的麦曲样品中的真菌多样性进行了分析,结果证实了周边地域环境的确对麦曲中的真菌组成具有影响。而组成结构总是和特定的功能相联系的。作为地域特色鲜明的

黄酒行业,深入认识麦曲中的微生物组成结构,及其与周边环境因素的确切关系,将为科学地阐述麦曲的功能,阐明黄酒的地域特征奠定基础,为保护和发展黄酒这一东方瑰宝提供科学依据。

参考文献:

- [1] 汪健国. 传统麦曲在黄酒酿造中的作用和特色[J]. 中国酿造, 2004, 139(10): 29-31.
- [2] TUINEN D V, JACQUET E, ZHAO B. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR[J]. Mol Ecol, 1998(4): 879-887.
- [3] PENNANEN T, PAAVOLAINEN L, HANTULA J. Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples[J]. Soil Biol Biochem, 2001, 33: 697-699.
- [4] SMIT E, LEEFLANG P, GLANDORF B, et al. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 2614-2621.
- [5] LORD N S, KAPLAN C W, SHANK P. Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 42: 327-337.
- [6] 朱衡, 翟峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌DNA[J]. 真菌学报, 1994(1): 34-40.
- [7] WHITE T J, BRUNS T, LEE S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//PCR protocols: A guide to methods and applications. New York Academic Press Inc, 1990, 315-322.
- [8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 2版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [9] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [10] 余仲东, 张星耀, 曹支敏. 真菌核糖体基因间隔区研究概况[J]. 西北林学院学报, 2000, 15(2): 107-112.
- [11] HERAS-VAZQUEZ F J L, MINGGORANCE-CAZORLA L, CLEMENTE-JIMENEZ J M. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers[J]. FEMS Yeast Res, 2003(3): 3-9.
- [12] 匡治州, 许杨. 核糖体rDNA ITS序列在真菌学研究中的应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(2): 120-122.
- [13] 傅金泉. 黄酒生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [14] 毛青钟. 黄酒机制生麦曲与传统生麦曲的比较探讨[J]. 中国酿造, 2005(5): 42-44.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆手册[M]. 黄培堂, 等译. 3版. 北京: 科学出版社, 2002.