

文章编号:1673-1689(2008)02-0078-06

绍兴黄酒麦曲中真菌的初步研究

陆健¹, 曹钰¹, 方华¹, 李旺军¹, 谢广发², 邹慧君², 胡志明²

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

摘要:对绍兴黄酒麦曲中的真菌组成和特性、以及制曲过程中的变化进行了初步研究。运用分离培养方法, 共获得 16 种丝状真菌, 分子鉴定结果显示, 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。运用 RISA 图谱法分析制曲过程中真菌的变化, 并结合序列测定技术比较制曲始末的真菌种类, 显示出种群结构发生了显著变动。对 7 株主要丝状真菌的产酶特性进行调查, 结果显示, 纯培养条件下只有曲霉属的真菌产酶, 但在混合培养体系中, 产酶种类或数量变化显著。

关键词:绍兴黄酒; 麦曲; 真菌; RISA

中图分类号:TS 261.1

文献标识码:A

Fungal Community of Wheat Qu of Shaoxing Rice Wine

LU Jian¹, CAO Yu¹, FANG Hua¹, LI Wang-jun¹,

XIE Guang-fa², ZOU Hui-jun², HU Zhi-ming²

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Zhejiang Guyue Longshan Shaoxing Wine Co. Ltd., Shaoxing 312000, China)

Abstract: Fungal community of wheat Qu of Shaoxing rice wine was studied by conventional dilution plate method. 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 fungi in wheat Qu. A culture-independent method RISA, ribosomal intergenic spacer analysis, combining with sequencing were used to analyze the change during the Qu-making process. The results showed the fungal community in wheat Qu changed distinctly during the process. Five kinds enzymes produced by seven filamentous fungi strains were investigated. The results showed only *Aspergillus* genus produce enzymes under pure culture, whereas the kind and quantity of enzymes varied obviously through two-strain culture.

Key words: Shaoxing rice wine; wheat Qu; fungal community; RISA

收稿日期: 2006-12-21.

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0532); 江苏省“青蓝工程”项目; 绍兴市重点科研工业项目(2006A21036).

作者简介: 陆健(1968-), 男, 江苏太仓人, 工学博士, 教授, 主要从事酿酒微生物与酶技术的研究.

Email: jlu@jiangnan.edu.cn

黄酒是中国的三大酒之一,“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的相辅相成。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。黄酒酿造所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,造就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(ribosomal intergenic spacer analysis, RISA)、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)、末端限制性酶切片段多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)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。

已有的研究结果表明,真菌尤其是丝状真菌对麦曲的功能发挥着重要作用。作者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进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 样品与培养基

麦曲:绍兴某黄酒公司提供。

分离培养基:察氏培养基、土豆琼脂培养基(PDA)、麦汁琼脂培养基,均加入30 mg/L的链霉素抑制细菌生长和200 mg/L的脱氧胆酸钠抑制菌丝蔓延。

斜面培养基:PDA培养基;麸皮培养基;麸皮:水=1:1。培养基均采用0.1 MPa下灭菌20 min。

1.2 真菌的分离及鉴定

1.2.1 真菌的分离培养 对麦曲样品进行稀释分离,采用3种培养基分别进行培养。将所得的单菌落转接到相同的培养基(察氏培养基)中,根据形态

的差异挑出不同的真菌。

1.2.2 染色体DNA的提取、核糖体内转录间隔区(ITS)的扩增和克隆测序 采用氯化苄法^[6]提取菌株的染色体DNA。核糖体内转录间隔区的PCR扩增引物为pITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3')和pITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[7]。50 μ L的PCR反应体系:40 μ L ddH₂O、5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer(含MgCl₂)、1 μ L 4 $\times$ dNTP、1 μ L pITS1、1 μ L pITS4、1 μ L DNA模板。PCR扩增条件为:95 $^{\circ}$ C变性5 min,冰上加入1 μ L Taq酶。94 $^{\circ}$ C变性30 s,58 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,共30个循环。然后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。保存于-20 $^{\circ}$ C备用。PCR反应结果用2 g/dL的琼脂糖凝胶电泳检测,拍照。PCR产物经纯化,用pMD18-T连接,转化*E. coli*,PCR扩增验证插入片断。测序由宝生物工程大连有限公司完成。

1.2.3 ITS序列的比较和同源性分析 测序结果经DNAMAN 3.0软件去载体后,将序列提交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 3.0软件分析克隆子的序列与GenBank收录序列的相似性。

1.3 RISA法分析制曲过程的真菌变化

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,加入无菌生理盐水浸提。浸提液无菌过滤,滤液离心,收集沉淀,用于提取总DNA。

1.3.2 总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纯化后,用4 g/dL聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。电泳结束后,溴化乙锭染色拍照,回收样品中的各条带,置于1.5 mL的离心管中,供回收使用。

1.3.3 基因克隆和序列分析 加入50 μ L的洗脱缓冲液^[8](500 mmol/L乙酸铵,10 mmol/L乙酸镁,1 mmol/L EDTA,0.1% SDS)在放有PAGE条带的离心管中,37 $^{\circ}$ C水浴5 h,12 000 g离心10 min,取上清液,用PCR Purification Kit回收DNA。然后以纯化DNA为模板,按1.2.2方法进行序列克隆,测序结果按1.2.3方法进行分析。

1.4 麦曲真菌的产酶特性

1.4.1 真菌的固态培养 取30 $^{\circ}$ C培养3 d的试管斜面菌种,加入无菌生理盐水洗下孢子,无菌条件下过滤至带玻璃珠的无菌三角瓶中摇匀,血球计数板计数,将孢子浓度调至10⁶个/mL,制成孢子悬浮

液。取1 mL孢子悬浮液接入麸皮培养基中,或按1:1接入待混合培养的真菌孢子悬液,30℃静置培养,每隔4 h摇瓶一次,进行纯种及混合固态培养。

1.4.2 酶液的制备与测定 固态培养后,向麸曲中加入生理盐水,于30℃、120 r/min条件下振荡浸提1 h。三层纱布过滤,所得滤液分别用于测定 α -淀粉酶、糖化酶、蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶的活性。

1.4.3 酶活分析方法及单位定义 α -淀粉酶、糖化酶、蛋白酶、纤维素活力的测定参照中华人民共和国行业标准,木聚糖酶活力按文献[9]测定,所有酶活均用 μ /g干曲表示。

2 结果与分析

2.1 绍兴黄酒麦曲中真菌的系统分离及鉴定

采用土豆琼脂、麦汁琼脂、察氏培养基3种不同的培养基对麦曲样品进行梯度稀释、系统分离,真菌总菌落数达 2.7×10^6 个/g麦曲。从3 000多个菌落中根据菌落形态^[9]的差异共获得16种不同真菌,均为丝状真菌,编号JZQ-1~JZQ-16。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%。

对各株真菌纯培养物进行ITS序列扩增和测序,与GenBank数据库中最相似序列的比对结果见表1。

鉴定结果显示,从麦曲中分离获得的16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*)、鲁西坦念珠霉(*Issatchenkia orientalis*)、克鲁赛念珠霉(*Clavispora lusitaniae*)、互格链格孢(*Alternaria alternata*)、苹果链格孢(*Alternaria mali*)、尖孢枝孢(*Cladosporium cladosporioides*)、芽孢枝孢(*Cladosporium oxysporium*)。其中前5种是绍兴黄酒麦曲中的主要真菌。

从分离培养的结果可以看出,毛霉目的犁头霉属、根霉属、毛霉属在麦曲中的数量高达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。研究结果与以往对绍兴黄酒麦曲微生物的研究结论有较大差异^[11]。

2.2 运用RISA图谱法研究制曲过程中真菌的变化

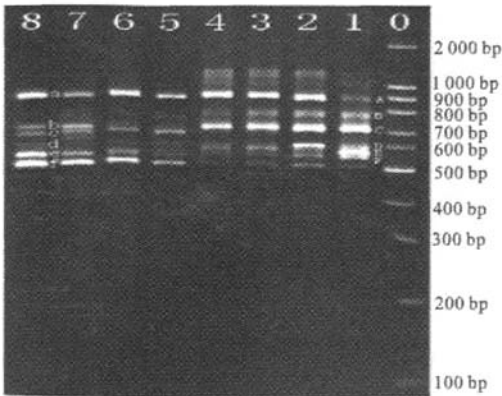
黄酒生麦曲的制作过程是一个开放的微生物的培养过程,因而采用传统的微生物分离培养方法不仅工作量巨大,而且不能清晰反映出制曲过程中麦曲微生物生长变化情况。相比而言,分子水平的研究方法不仅可以大大降低工作量,而且在研究微生物种群结构、动态变化等方面非常便捷。

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

Tab.1 Alignment of sequenced clone to its most similar GenBank sequence

分离菌株	ITS 片断长度/bp	序列号	相似性/%	相似菌株
JZQ-1	856	AF117937	99	<i>Absidia corymbifera</i>
JZQ-2	678	AY803931	99	<i>Rhizopus oryzae</i>
JZQ-3	627	AF461764	100	<i>Rhizomucor pusillus</i>
JZQ-4	595	AY373857	100	<i>Aspergillus oryzae</i>
JZQ-5	597	AY373851	100	<i>Aspergillus fumigatus</i>
JZQ-6	566	AY373888	99	<i>Emmericella nidulans</i>
JZQ-7	599	AY213633	100	<i>Aspergillus niger</i>
JZQ-8	573	AF125936	100	<i>Penicillium thiersii</i>
JZQ-9	590	AY213676	98	<i>Penicillium oxalicum</i>
JZQ-10	568	AY373868	99	<i>Aspergillus sydowii</i>
JZQ-11	509	AY939808	100	<i>Issatchenkia orientalis</i>
JZQ-12	382	AY939812	100	<i>Clavispora lusitaniae</i>
JZQ-13	569	AY154682	100	<i>Alternaria alternata</i>
JZQ-14	570	AY154683	100	<i>Alternaria mali</i>
JZQ-15	552	AF393689	100	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
JZQ-16	550	AF393720	100	<i>Cladosporium oxysporium</i>

运用基于 PCR 的核糖体内转录间隔区分析法 (RISA)对绍兴黄酒麦曲制作过程中真菌的变化进行分析,结果见图 1。



Lane 0: 100bp Ladder Marker; Lane 1~8: different day during the Qu-making process, represent 1, 2, 3, 4, 7, 10, 17, 24 respectively

图 1 制曲过程中不同时间点的麦曲样品的 RISA 图谱
Fig. 1 RISA analysis of ITS rRNA gene fragments of fungi obtained after using PCR amplification on samples of the microbial community at different time of Qu-making process

从图 1 中可看出,在制曲过程中的不同时间,麦曲中的优势真菌不同。制曲过程中优势真菌的种类先增加,随后减少。第 3 天和第 4 天的图谱条带基本相同,结合制曲过程中的温度变化情况,此时麦曲品温分别达 55 ℃和 51 ℃。分析认为,在这

么高的温度下曲中的真菌已停止生长,故这两天的 RISA 图谱基本相同。

此外,第 17 天和第 24 天的 RISA 图谱条带也基本相同,表明从制曲的第 17 天开始,麦曲中的主要微生物已占绝对优势,种群结构稳定不再发生变化,此时糖化酶的活力处在较高水平,达到1 012 U/g 干曲。从真菌的角度来看,在制曲的第 17 天就可出曲房了。

对制曲过程第 1 天和第 24 天的条带进行回收、克隆、测序,结果见表 2。从表 2 可以看出,在制曲过程的第 1 天和第 24 天,麦曲样品中的优势真菌发生了很大的变化,大部分优势霉菌不相同,仅有伞枝犁头霉(*Absidia corymbifera*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)相同,但代表这两种微生物的条带在亮度上有差异,说明在制曲始末两者在麦曲样品中的数量和比例不同。RISA 图谱及序列分析结果都表明在制曲过程中,麦曲中的真菌种群结构发生了显著的变动。

2.3 麦曲中主要真菌的产酶特性

2.3.1 7 株真菌纯种培养条件下的产酶情况 在黄酒酿造中,通常认为传统生麦曲既是糖化发酵粗酶剂,又作为少量酿酒原料和营养物质。麦曲中真菌的产酶特性是值得关注的。选取分离获得的麦曲中 7 株真菌(伞枝犁头霉、米根霉、微小毛霉、米曲霉、烟曲霉、构巢裸孢壳、黑曲霉)进行纯种培养,调查各菌株的产 α -淀粉酶、糖化酶、蛋白酶、木聚糖酶、纤维素酶的情况,结果见表 3。

表 2 RISA 图谱中部分条带的测序鉴定

Tab. 2 Identities of bands from RISA analysis of the fungal community from wheat Qu

条带	ITS 片断长度/bp	序列号	相似性/%	相似菌株
8-a	853	AF117937	99.1	<i>Absidia corymbifera</i>
8-b	776	Z95943	99.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
8-c	678	AY803931	99.5	<i>Rhizopus oryzae</i>
8-d	628	AF461764	100	<i>Rhizomucor pusillus</i>
8-e	597	AY373857	100	<i>Aspergillus oryzae</i>
8-f	565	AY373888	99.4	<i>Emericella nidulans</i>
1-A	854	AF117937	99.1	<i>Absidia corymbifera</i>
1-B	未鉴定出 ^b			
1-C	777	Z95943	99.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1-D	569	AY154682	100	<i>Alternaria alternata</i>
1-E	558	AY373885	98.6	<i>Eurotium amstelodami</i>
1-F	548	AY787697	99.1	<i>Epicoccum nigrum</i>

a. RISA 图谱分离条带鉴定的序列与 GenBank 中已有序列的相似性比较。b. 由于技术原因未能从 RISA 图谱分离鉴定出相应条带。

表 3 7 株真菌的产酶情况
Tab. 3 The activity of enzymes produced by seven filamentous fungi strains (单位: U/g 干曲)

编号	菌 株	α -淀粉酶	糖化酶	蛋白酶	木聚糖酶	纤维素酶
1	<i>Absidia corymbifera</i> AC-14	ND	ND	ND	ND	ND
2	<i>Rhizopus oryzae</i> RO-02	ND	ND	ND	ND	ND
3	<i>Rhizomucor pusillus</i> RP-09	ND	ND	ND	ND	ND
4	<i>Aspergillus oryzae</i> AO-01	112.5	1359.4	817.6	ND	ND
5	<i>Aspergillus fumigatus</i> AF-02	ND	368.9	507.8	ND	ND
6	<i>Emericella nidulans</i> EN-05	ND	ND	ND	ND	ND
7	<i>Aspergillus niger</i> AN-13	ND	ND	429.1	3318.0	93.52

ND:表示没有酶活或在所用测定方法下酶活太低而不能测出。

从表 3 可以看出,7 株麦曲中的主要真菌,仅 *Aspergillus oryzae* AO-01、*Aspergillus fumigatus* AF-02、*Aspergillus niger* AN-13 能够产降解小麦和糯米原料的酶,其中 *A. oryzae* AO-01 和 *A. fumigatus* AF-02 产能降解淀粉原料的糖化酶, *A. niger* AN-13 产能降解木聚糖和纤维素的木聚糖酶和纤维素酶。

从纯种制曲应用于酿造的角度看, *A. oryzae* AO-01 的糖化酶活力最高达 1 359.4 U/g 干曲,可快速降解淀粉原料,能用作黄酒纯种制曲的菌株。 *A. fumigatus* AF-02 糖化酶活力低,仅 368.9 U/g 干曲,分解淀粉的能力低,不宜单一用作纯种制曲。

而其它的 5 株丝状真菌由于不产液化酶和糖化酶,不能将淀粉原料分解为酵母能利用的葡萄糖。

2.3.2 真菌混合培养时的产酶状况 麦曲作为一个微生物的混合培养体系,其中含有的不同的微生物之间存在着一定的相互作用,势必会影响到它的代谢活动。

选择纯种培养时产酶的 *A. oryzae* AO-01、*A. fumigatus* AF-02、*A. niger* AN-13 分别与其它真菌两两混合培养,测定混合培养体系产生的 α -淀粉酶、糖化酶、蛋白酶、木聚糖酶和纤维素酶的活力,结果见表 4。

表 4 真菌两两混合培养的产酶情况
Tab. 4 The effect of each two mold mixed culture on enzyme production (单位:U/g 干曲)

编号	混合培养的菌株	α -淀粉酶	糖化酶	蛋白酶	木聚糖酶	纤维素酶
4*+1	<i>A. oryzae</i> AO-01 and <i>A. corymbifera</i> AC-14	28.8	1 027.1	886.1	102.1	1.20
4*+2	<i>A. oryzae</i> AO-01 and <i>R. oryzae</i> RO-02	50.4	1 092.5	770.2	ND	1.17
4*+3	<i>A. AO-01</i> and <i>R. pusillus</i> RP-09	69.6	1 151.9	946.4	108.3	1.51
4*+5*	<i>A. oryzae</i> AO-01 and <i>A. fumigatus</i> AF-02	72.1	1 149.9	904.4	109.8	1.48
4*+6	<i>A. oryzae</i> AO-01 and <i>E. nidulans</i> EN-05	67.2	1 106.0	949.1	102.9	1.42
4*+7*	<i>A. oryzae</i> AO-01 and <i>A. niger</i> AN-13	105.1	1 113.7	3 710.6	129.8	1.57
5*+1	<i>A. fumigatus</i> AF-02 and <i>A. corymbifera</i> AC-14	ND	96.7	564.0	ND	ND
5*+2	<i>A. fumigatus</i> AF-02 and <i>R. oryzae</i> RO-02	ND	193.8	643.5	ND	ND
5*+3	<i>A. fumigatus</i> AF-02 and <i>R. pusillus</i> RP-09	ND	147.3	570.1	49.9	ND
5*+6	<i>A. fumigatus</i> AF-02 and <i>E. nidulans</i> EN-05	ND	42.5	767.8	320.2	ND
5*+7*	<i>A. fumigatus</i> AF-02 and <i>A. niger</i> AN-13	ND	ND	780.0	605.9	ND
7*+1	<i>A. niger</i> AN-13 and <i>A. corymbifera</i> AC-14	ND	ND	801.7	913.2	ND
7*+2	<i>A. niger</i> AN-13 and <i>R. oryzae</i> RO-02	ND	ND	728.2	1 528.4	32.7
7*+3	<i>A. niger</i> AN-13 and <i>R. pusillus</i> RP-09	ND	146.7	122.6	919.3	ND
7*+6	<i>A. niger</i> AN-13 and <i>E. nidulans</i> EN-05	ND	ND	573.3	759.2	ND

* 单独培养时,菌株产酶;ND:表示没有酶活或在所用测定方法下未检测出酶活。

A. oryzae AO-01 与其它 6 株真菌混合培养时, α -淀粉酶、糖化酶活力均有所下降,蛋白酶活力

均有所提高。特别是 *A. oryzae* AO-01 和 *A. niger* AN-13 的混合培养体系,蛋白酶活力高达

3 710.6 U/g 干曲,分别是 *A. oryzae* AO-01 和 *A. niger* AN-13 纯种培养的 4.5 倍和 8.6 倍。此外混合培养体系还或多或少的检测出木聚糖酶和纤维素酶活力。

A. fumigatus AF-02 与其它 5 株真菌混合培养时,糖化酶活力都大幅下降,而蛋白酶活力都有所提高。尤其是与 *A. niger* AN-13 的混合培养体系检测不到糖化酶活力。此外,*A. fumigatus* AF-02 与 *E. nidulans* EN-05、*R. pusillus* RP-09、*A. niger* AN-13 的混合培养体系能够检测到木聚糖酶活力。

A. niger AN-13 与其它 4 株真菌混合培养时,木聚糖酶活力和纤维素酶活力均大幅下降,而蛋白酶活力均有所提高,只有与 *R. pusillus* RP-09 混合培养时蛋白酶活力下降到 122.6 U/g 干曲,却检测到了糖化酶活力 146.7 U/g 干曲。

从表 4 中可以看出,两种真菌混合培养物的产酶情况不是单个真菌产酶的简单相加。两种真菌混合培养时,代谢产酶状况从一定程度上反映出相互之间生长的影响。产酶状况的变化继而影响到对黄酒酿造原料的降解,这也可能就是纯种酿造的

黄酒口味淡薄的原因之一。

3 结 语

运用分离培养方法,共获得 16 种丝状真菌,分子鉴定的结果显示:伞枝犁头霉、米根霉、微小毛霉、米曲霉、烟曲霉是麦曲中的主要真菌。此结果不完全同于以往的研究结论,考虑到麦曲是经过自然培养形成的,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,还有待进一步研究。

运用基于 PCR 的非培养方法 RISA 图谱法分析了制曲过程中真菌的变化,并结合序列测定技术比较制曲始末的真菌种类,结果显示麦曲中真菌种群结构发生了显著变动。虽然这种方法同样具有基于 PCR 的各种分子生态学方法的缺陷,且对聚丙烯酰胺凝胶的质量和电泳条件有较高要求,但是对于分析一个微生物群落组成复杂的体系,特别是动态变化体系时非常方便、快速,且无需特殊仪器。

7 株主要丝状真菌的产酶特性结果显示,在纯培养条件下只有曲霉属的 3 株菌能够产生降解小麦和糯米原料的酶,但在混合培养体系中,产酶种类或数量都发生了明显变化。

参考文献(References):

- [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, 10 (139): 29-31.
WANG Jian-guo. Function of traditional koji in rice wine and its characteristics[J]. *China Brewing*, 2004, 10: 29-31. (in Chinese)
- [2] Van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, et al. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR[J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 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 Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 697-699.
- [4] Smit E, Leeflang P, Glandorf B. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 2614-2621.
- [5] Lord N S, Kaplan C W, Shank P, et al. Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 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.
ZHU Heng, QU Feng, ZHU Li-huang. Isolation of genomic DNA from fungi using benzyl chloride [J]. *Acta Mycologica Sinica*, 1994, 1: 34-40. (in Chinese)
- [7] White T J, Bruns T, Lee S. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. New York: New York Academic Press Inc., 1990: 315-322.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 金冬雁, 黎孟枫译, 北京: 科学出版社, 1996.
- [9] Bailey M J, Biely P, Poutanen K J. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase[J]. *Journal of Biotechnology*, 1992, 23: 257-270.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [11] 傅金泉. 黄酒生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

(责任编辑: 李春丽)