

# 环境微生物 DNA 提取方法研究进展

## Progress of Study on Extraction Methods of Environmental Microbial DNA

阳 静<sup>1,2</sup> 张 静<sup>1,2</sup> 邹 伟<sup>1,2</sup> 赵兴秀<sup>1,2</sup> 赵长青<sup>1,2</sup>

YANG Jing<sup>1,2</sup> ZHANG Jing<sup>1,2</sup> ZOU Wei<sup>1,2</sup> ZHAO Xing-xiu<sup>1,2</sup> ZHAO Chang-qing<sup>1,2</sup>

(1. 四川理工学院, 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)

(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000, China;

2. Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong, Sichuan 643000, China)

**摘要:**环境微生物 DNA 提取是应用分子生物学技术研究微生物群落的基础, DNA 提取的纯度及其结构完整性直接影响后续试验结果。环境样品多种多样, 包括水样、土壤、活性污泥、传统发酵食品、白酒酿造环境等, 使得 DNA 的提取方法没有统一的标准。目前 DNA 的提取方法有很多, 大致可以分为直接提取法和间接提取法。直接提取法操作简便, 耗时短, 而杂质较多; 间接提取法操作复杂, 耗时长, 但纯度较高。文章在对比各种 DNA 提取方法的基础上, 重点介绍了白酒酿造环境中 DNA 的提取方法和大片段 DNA 的提取及其研究进展。

**关键词:** DNA 提取; 白酒酿造; 大片段 DNA

**Abstract:** Environmental microbial DNA extraction is the foundation of microbial community research by molecular biology techniques, and its structural integrity and the purity of DNA extracted is directly related to the subsequent experiment results. DNA extraction method is not a unified standard because of various environmental samples, including water, soil and activated sludge, the traditional fermented food, liquor-making environment, etc. Now, there are many methods of DNA extraction, they can be divided into direct and indirect extraction ones. The direct extraction methods are simple, less time-consuming, while presenting impurities. However, complex indirect extraction operations are time-consuming, but the products are pure. Based on the comparison of the different DNA extraction methods, we focus on the research progress of DNA extractions of liquor brewing environment and the large fragments.

**Keywords:** DNA extraction; liquor brewing; large fragment of DNA

从 1953 年 J.D.Watson 和 F.H.C.Crick 发现了 DNA 分子双螺旋结构到现在, 随着分子生物学的发展, 人们对 DNA 的了解越来越多。而要想研究其性质特点, 从生物中提取 DNA 是一种重要的方式。目前, 虽然从单一生物体内提取 DNA 的方法逐渐成熟, 但对于复杂的环境微生物来说同时提取多种微生物的 DNA 仍然是一个很大的挑战, 故选择一种较好的提取方法尤为重要。判断一个好的提取方法不仅仅是看其提取出来的 DNA 含量、纯度以及分子大小, 其提取出来的 DNA 能否充分反映该环境中微生物种群多样性也是关键。本文在对比了各种微生物 DNA 提取方法的基础上, 重点介绍了白酒酿造环境中 DNA 的提取方法和大片段 DNA 的提取以及其研究进展, 旨在为白酒酿造环境及其他环境微生物的 DNA 提取方法作出较为系统的总结, 为从白酒酿造环境或其他类似环境中提取 DNA 提供参考。

### 1 DNA 常规提取方法

基因组 DNA 的提取方法一般分为两类, 即直接提取法和间接提取法。直接提取法, 即利用各种物理与化学方法直接从环境样品中裂解细胞, 再从中提取 DNA。Ogram 等<sup>[1]</sup>曾运用直接法将环境中的微生物 DNA 抽提出来。直接法操作相对简便, 不需要分离细胞, 提取出来的 DNA 也更具代表性。然而, 直接法虽然产量较高, 纯度却一般较低, 因为在其提取 DNA 的过程中, 也会将其中含有的抑制剂像腐殖酸、褐菌酸等一起提取出来, 进而干扰或抑制了后续操作。间接提取法又叫细胞抽提法<sup>[2]</sup>, 即先将细胞从环境中分离出来再从中提取 DNA。Torsvik 等<sup>[3]</sup>报道了间接提取法。间接提取法提取出来的 DNA 虽然纯度较高, 然而操作较为复杂, 并且提取出来的 DNA 分子量远远少于直接法提取出来的。故对于选择直接法还是间接法提取 DNA 的关键在于预处理。

#### 1.1 预处理

在某些环境(如土壤、活性污泥、海洋沉积物、大曲等)中, 往往存在一系列杂质, 如腐殖酸<sup>[4]</sup>、褐菌素<sup>[5]</sup>和重金属离

**基金项目:**四川省教育厅项目(编号:15ZA0226); 省部级重点实验室项目(编号: NJ2014-06); 四川省教育厅项目(编号: 15ZB0204)

**作者简介:**阳静, 男, 四川理工学院在读本科生。

**通信作者:**张静(1981—), 女, 四川理工学院讲师, 博士。

E-mail: jingzhang3019@126.com

**收稿日期:**2017-01-07

子<sup>[6]</sup>等,而正是由于这些杂质,在进行环境微生物 DNA 提取时,对其产率与效率造成不同程度的抑制,因而预处理在 DNA 提取过程中尤为重要。此处以对腐殖酸的处理为例进行详细叙述。

腐殖酸拥有独特的结构,为极性化合物,可以抑制 SDS、溶菌酶及蛋白酶 K 等的活性<sup>[7]</sup>。目前,去腐的方法有很多,常用的方法有硫酸铝法、PVPP 法、CTAB 法、氯化铯密度梯度离心法、交联葡聚糖和琼脂糖凝胶过滤树脂、离子交换和高效分子量排阻层析、电洗脱等方法<sup>[8]</sup>。氯化铯密度梯度离心法与其他方法相比较复杂、昂贵且费时<sup>[9]</sup>,因此一般不选用。有人也利用焦磷酸钠(磷酸四钠)<sup>[10]</sup>和磷酸五钠(STPP)<sup>[11]</sup>与其发生反应进而将其除去。席峰等<sup>[12]</sup>在经过多种缓冲液进行预处理比较后,得出了一种优化后的脱腐缓冲液(100 mmol/L Tris, pH 10.0, 100 mmol/L Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 100 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 1.0% PVP, 100 mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100, 4.0% 脱脂奶粉),此种缓冲液比传统的 TENP 等缓冲液脱腐作用更好。此外,宋培勇等<sup>[13]</sup>利用芬顿试剂(即过氧化氢与亚铁离子组成的混合溶液)在提取 DNA 过程中对土壤中的腐殖酸进行脱腐处理,芬顿试剂具有一定脱腐能力,并且对 DNA 片段降解影响不大。

## 1.2 细胞裂解

DNA 的提取效率与细胞的裂解效率呈正相关,因此有效裂解细胞的方法对 DNA 的提取尤为关键,同时也需要考虑到 DNA 片段是否在裂解细胞的过程中受损。细胞裂解的方法主要分为三类,即物理法、化学法与生物酶法。

1.2.1 物理法 物理法即利用外力破坏细胞结构使其内容物溶出,主要有液氮冻融法、玻璃珠振荡法、液氮研磨法、超声振荡法(ultrasonication)和微波热休克法(microwave heating)等<sup>[14]</sup>。物理法由于操作较为剧烈,所以往往不容易得到大片段 DNA<sup>[15]</sup>。超声法是一种较为剧烈的裂解方法,其设备费用较低、速度快、操作较为简单,且能有效提取 DNA。但是其超声的时间对 DNA 的提取效率有比较大的影响。万晶晶等<sup>[16]</sup>发现功率为 50 Hz 的超声波在 27 s 时有最大 DNA 提取效率。曲艳玲<sup>[17]</sup>对液氮冻融法和液氮研磨法提取活性污泥 DNA 进行了对比,发现用液氮冻融法提取 DNA 腐殖酸等含量较低,蛋白质去除得较彻底。吕新等<sup>[18]</sup>通过比较得出利用玻璃珠振荡法提取出来的 DNA 量较多,但腐殖酸污染较严重。

1.2.2 化学法 化学法是利用一些化学试剂对细胞进行破壁裂解。常用的方法有十二烷基硫酸钠(SDS)法和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法或两者的结合使用。SDS 是一种阴离子表面活性剂,能与膜脂蛋白相互作用进而破坏细胞膜结构。而 CTAB 是一种阳离子去污剂,能够与核酸形成复合物<sup>[19]</sup>。比起试剂盒法,SDS 法和 CTAB 法成本低, DNA 产量高、降解少<sup>[20]</sup>。此外, Faria Fatima 等<sup>[21]</sup>在 SDS 与 CTAB 结合的情况下,又添加了甘露醇后提取的 DNA 产量高且腐殖酸的污染较小。

1.2.3 生物酶法 生物酶法是利用溶菌酶、蜗牛酶、蛋白酶 K 等裂解细胞。一般情况下,化学法与酶法联合使用效果

更好<sup>[15]</sup>。

一般来说,在加入溶菌酶后,控制温度在 37 °C 左右,而添加蛋白酶 K 后,控制温度在 60 °C 左右<sup>[22-23]</sup>。然而,将蛋白酶 K 置于 37 °C 下<sup>[24]</sup>,或将溶菌酶置于 65 °C 下<sup>[25]</sup>,也能提取到较长的 DNA 片段。曲衍洪等<sup>[26]</sup>发现在环氧丙烷皂化废水活性污泥中溶菌酶最适温度为 45 °C,而非一般认为的 37 °C,表明在不同的环境中提取 DNA,酶的最适作用温度也会发生变化。

通常会用上述 3 种方法或 2 种方法结合起来提取 DNA,如闫亮珍等<sup>[14]</sup>将化学—物理法与酶—化学—物理法相比较,得出酶—化学—物理法提取的 DNA 能更好地体现生物多样性,且操作上更方便、简洁。王晓辉等<sup>[6]</sup>对化学法与酶—化学法进行了比较,结果证明化学—酶法既得到了大片段 DNA,又保证了 DNA 的高浓度。

## 1.3 蛋白质的去除

细胞裂解之后,裂解液中除了 DNA 外还含有大量的蛋白质,为了进一步纯化 DNA,就必须除去蛋白质。一般会使用苯酚—氯仿—异戊醇(25:24:1)与氯仿—异戊醇(24:1)来抽提蛋白质<sup>[27]</sup>。此外,还可以利用高盐法与苯酚—氯仿—异戊醇或氯仿—异戊醇结合除蛋白质,无论是先加盐还是后加盐,均比不加盐溶液提取的效果好<sup>[17-28]</sup>。

## 1.4 DNA 沉淀

用来沉淀 DNA 的试剂一般为无水乙醇或异丙醇。用无水乙醇沉淀,通常情况下用 2~3 倍体积无水乙醇在 -20 °C 过夜沉淀或者在 -70 °C 沉淀 1 h,沉淀效果比较明显,乙醇易挥发除去,但一般总体积较大。而用异丙醇沉淀,通常仅用 0.5~0.6 倍体积异丙醇,虽在室温下沉淀下来的 DNA 量多,但易使盐类共沉淀,且异丙醇难以挥发除去,必须用 70% 乙醇洗涤。因而在加入同样多的试剂时,异丙醇沉淀下来的 DNA 远远多于乙醇沉淀下来的<sup>[29]</sup>。闫建芳等<sup>[30]</sup>指出用异丙醇沉淀 DNA 时沉淀时间过长会降低 DNA 的纯度。Zhang Xin 等<sup>[31]</sup>曾用异丙醇在 -20 °C 下沉淀,而陈琰等<sup>[27]</sup>认为将异丙醇在 -20 °C 沉淀会有盐离子共沉淀出来,影响后续操作。此外, DNA 含有大量的磷酸基团而带负电,当被大量带正电荷的基团中和后更容易沉淀出来,因此异丙醇还可以结合醋酸钠<sup>[32]</sup>一起使用来增强 DNA 的沉淀效果。另外, Tanima Paul 等<sup>[33]</sup>利用聚乙二醇(PEG)和 NaCl 溶液也可以达到沉淀 DNA 的目的。

## 2 白酒窖池微生物 DNA 的提取

白酒的生产以窖池为基础,发酵过程是庞大微生物种群在窖池的糟醅和窖泥中进行复杂物质能量代谢的过程。窖池微生物构成极其多样复杂,这些复杂的微生物在窖池中生长、繁殖、新陈代谢,产生各种代谢产物和酶,发生各种生化反应,最后形成白酒中各种呈香物质和重要有效成分。前人已经在窖池微生物的分析方面作了大量的研究,但是人们对于微生物的认识基本都是依赖于形态特征、生理学特性等传统的分类鉴定方法<sup>[34-35]</sup>,对可培养的微生物进行研究,而对占微生物总体 99% 以上的不可培养微生物的研究较少<sup>[36]</sup>。

宏基因组学技术的出现,使得人们对大量不可培养微生物

物的研究成为现实,微生物基因的可探测空间显著增大。另外,随着分子生物学技术的发展,白酒窖池微生物多样性的研究也已经不局限在可培养微生物的范围<sup>[37]</sup>。作为宏基因组学和微生物群落分子分析方法的基础,最重要的环节就是从样品中尽量提取出高质量并具有代表性的微生物总基因组 DNA。

### 2.1 大曲中 DNA 提取

环境中普遍含有的腐殖酸在大曲中也存在,因而,在大曲中提取微生物基因组 DNA 时需要进行脱腐处理。然而,先对曲样进行脱腐处理会使提取到的 DNA 总量变少<sup>[4]</sup>。不同时期的大曲曲块硬,水分较少,进而导致其具有高吸水性,如不进行蒸馏水反复洗涤,则会导致抽提液被其过度吸收,进而加入的溶菌酶等酶不起作用<sup>[14]</sup>,所以,可以先对其进行充分研磨后再加入抽提液。

对大曲提取的方法无非也是分为物理法、化学法和酶法。闫亮珍等<sup>[14]</sup>采用酶—物理—化学法提取大曲 DNA,与纯物理法相比,获得了质量及纯度更好的 DNA,且后续试验表明酶—物理—化学法提取获得的高质量 DNA 能全面反映汾酒酿造过程中的微生物群落结构多样性。

### 2.2 酒醅中 DNA 提取

就酒糟的预处理来说,因为其含有酒精等微生物的次级代谢产物,因而将对后续加入的溶菌酶、溶壁酶、蛋白酶 K 等活性产生不利影响,故可用无菌水对其反复洗涤,进而有利于 DNA 的提取<sup>[14]</sup>。而沈才萍等<sup>[38]</sup>在此基础上,采用 SDS 高盐+蛋白酶 K 的方法提取得到酒醅中的微生物总 DNA,分别利用无菌水、TENP 以及 PBS 缓冲液对糟醅进行预处理,结果证明,用 PBS 缓冲液预处理后获得的基因组 DNA 其 DGGE 图谱中条带明亮、丰度高,能很好地反映样品细菌的多样性,有利于相关分子生物学分析。李德林等<sup>[39]</sup>对比了 SDS 高盐提取法和 CTAB 提取方法在酒醅中微生物基因组 DNA 提取的效果,发现石英砂+CTAB 法获得的 DNA 浓度最大,而液氮+SDS+溶菌酶法获得的总 DNA 纯度最高。

### 2.3 窖泥中 DNA 提取

对于窖泥微生物 DNA 的提取是近几年才发展起来的,但并没有找到一种专有的从窖泥微生物中提取 DNA 的方法。窖泥水分较多,故在预处理时常采用冷冻干燥窖泥的方法<sup>[40]</sup>除去窖泥水分。边名鸿等<sup>[41]</sup>采用在高盐提取缓冲液中裂解细胞并在加入 SDS、溴化十六烷基三甲胺和蛋白酶 K 后持续加热 2~3 h 的方法成功将窖泥微生物 DNA 提取出来,扩增古菌 16S rDNA 序列,构建了古菌 16S rDNA 文库。刘金英等<sup>[42]</sup>用不同方法提取窖泥的微生物 DNA,结果表明用化学—酶法提出的 DNA 产率高且较纯,并且在粗提取过程中,还发现了 DNA 含量与液相层中的黄褐色深度呈正比关系。

## 3 大片段 DNA 的提取

环境微生物中可培养微生物仅占不到 1%<sup>[43]</sup>,严重影响了人们对环境微生物的了解及利用,故建立一个宏基因组文库对微生物的研究及利用尤为重要。宏基因组揭示了生物群落多样性,进而反映了基因组的编码功能多样性,且其中

绝大部分是未知基因<sup>[44]</sup>。根据插入 DNA 片段的大小,宏基因组文库常常被划分为小插入片段文库和大插入片段文库两大类<sup>[45]</sup>。稳定的大片段基因组文库能保证基因簇的完整性,更利于目的基因的结构及功能分析<sup>[46]</sup>,因此大片段 DNA 的提取,是建立高质量宏基因组文库的关键。

大片段 DNA 的提取既可以利用间接提取法,也可以利用直接提取法。直接提取法相对间接提取法耗时短,但非 DNA 物质残留较多,且有可能对 DNA 进行降解,从而提取不到大片段的 DNA<sup>[47]</sup>,因此在直接提取前必须进行必要的预处理,除去大部分对 DNA 提取有较大影响的杂质。蒋云霞等<sup>[48]</sup>通过改良后的高盐、SDS-CTAB 热裂解直接提取法与电洗脱法联用能高效构建红树林土壤微生物大片段宏基因组文库,其包含克隆子的平均插入片段均大于 35 kbp。但仅用 CTAB、SDS 等基因组 DNA 常用提取方法则因为提取过程需要较多步骤的震荡等操作会使基因组 DNA 断裂,无法获得大片段 DNA。而低熔点琼脂糖包埋法则可以保护 DNA 免受降解,尽可能地减少裂解处理过程中的药物和机械损伤<sup>[49]</sup>,是一种高效、简便的大片段 DNA 制备方法。苟敏等<sup>[50]</sup>通过用琼脂糖包埋法,与试剂盒法及 CTAB 法对比发现,琼脂糖包埋法提取出来的 DNA 分子片段最长,且纯度较高。

## 4 总结及展望

随着人们对微生物 DNA 提取手段的改进,涌现了各种各样高效的提取方法。如何快速、经济地从各种复杂的样本中提取高纯度、高产量的 DNA 已经成为生物研究的一个非常重要的基础。而普遍适用的即为酶—化学结合法提取 DNA,然而,由于在不同样品中存在样品本身各自特性的差异,还没有一种方法可以适用于所有的样品,也没有一种方法可以满足所有的后续试验的要求,故在选择 DNA 提取方法时,要根据样品的特性和试验的目的选择合适的方法。本文对近年来国内外的各种 DNA 提取方法进行比较表明:简化操作程序,缩短操作时间,减少提取过程中对 DNA 的损伤,保护 DNA 的完整性,已成为环境微生物 DNA 研究的发展趋势。

### 参考文献

- [1] OGRAM A, SAYLER G S, BARKAY T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments [J]. *Microbio Methods*, 1987, 7(2/3): 57-66.
- [2] 陈竹, 陈元彩, 付时雨, 等. 环境样品中 DNA 提取方法的研究进展[J]. *环境污染与防治*, 2007, 29(7): 537-540.
- [3] TORSVIK V L, GOKSOY J. Determination of bacterial DNA in soil[J]. *Soil Biology Biochemistry*, 1978, 10(1): 7-12.
- [4] 潘明, 袁城金, 王世宽. 浓香型大曲中微生物总 DNA 的 PCR 优化[J]. *中国酿造*, 2012, 31(3): 108-110.
- [5] GUTHRIE J N, MORIARTY D J W, BLACKALL L L. DNA extraction from coral reef sediment bacteria for the polymerase chain reaction[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 43(2): 73-80.
- [6] 王晓辉, 黄李淑馨, 白凤武, 等. 海洋底泥环境 DNA 提取与纯

- 化方法比较研究[J]. 大连理工大学学报, 2014, 54(3): 272-277.
- [7] MORE M I, HERRICK J B, SILVA M C, et al. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(5): 1 572-1 580.
- [8] 李靖宇, 赵吉, 边玉, 等. 湿地土壤微生物 DNA 提取及其脱腐技术[J]. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1 130-1 137.
- [9] 崔彬彬, 李云, 冯大领, 等. 杨树叶绿体分离及叶绿体 DNA 提取方法的研究[J]. 保定学院学报, 2006, 19(2): 25-27.
- [10] 傅莲英, 席峰, 袁建军, 等. 海水养殖沉积环境微生物总的提取方法研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(6): 841-846.
- [11] FLORENCE Braun, JÉRÔME Hamelin, GAËLLE Gévaudan, et al. Development and Application of an Enzymatic and Cell Flotation Treatment for the Recovery of Viable Microbial Cells from Environmental Matrices Such as Anaerobic Sludge[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(24): 8 487-8 493.
- [12] 席峰, 傅莲英, 王桂忠, 等. 海洋沉积物 DNA 提取前的简易脱腐方法研究[J]. 高技术通讯, 2006, 16(5): 539-533.
- [13] 宋培勇, 梁飞, 徐华谷, 等. 芬顿试剂在土壤 DNA 提取中的脱腐殖酸效果[J]. 腐殖酸, 2014(5): 20-23.
- [14] 闫亮珍, 李晓然, 全哲学, 等. 汾酒大曲和酒醅样品 DNA 提取方法的优化[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(3): 32-36.
- [15] 赵裕栋, 周俊, 何璟. 土壤微生物总 DNA 提取方法的优化[J]. 微生物学报, 2012, 52(9): 1 143-1 150.
- [16] 万晶晶, 张汝嘉, 邢德峰, 等. 超声波破碎法提取活性污泥 DNA 及其 DGGE 分析[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2008, 40(4): 559-562.
- [17] 曲艳玲. 活性污泥 DNA 提取及其微生物群落分析研究[D]. 北京: 北京工商大学, 2007: 18-28.
- [18] 吕新, 陈丽华, 李胡仁. 4 种不同土壤微生物 DNA 提取方法对 DGGE 分析微生物群落的影响[J]. 福建农业学报, 2012, 27(4): 367-372.
- [19] 郑璐, 高乃云. 环境样品中 DNA 提取方法的研究进展[J]. 给水排水, 2010, 46(5): 175-178.
- [20] CHEN Hong, RANGASAMY Murugesan, TAN Sek Yee, et al. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles[J]. Plos One, 2010, 5(8): 1-6.
- [21] FARIA Fatima, NEELAM Pathak, SMITA Rastogi Verma. An Improved Method for Soil DNA Extraction to Study the Microbial Assortment within Rhizospheric Region[J]. Molecular Biology International, 2014, doi:10.1155/2014/518960.
- [22] BENJAMIN E R Rubin, JON G Sanders, JARRAD Hampton Marcell, et al. DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure[J]. Microbiology Open, 2014, 3(6): 910-921.
- [23] KAZUYA Watanabe, SATOSHI Yamamoto, SANAE Hino, et al. Population Dynamics of Phenol-Degrading Bacteria in Activated Sludge Determined by *gyrB*-Targeted Quantitative PCR[J]. Applied And Environmental Microbiology, 1998(4): 1 203-1 209.
- [24] EVGENIA Blagodatskaya, SERGEY Blagodatsky, TRAUTE-HEIDI Anderson, et al. Microbial Growth and Carbon Use Efficiency in the Rhizosphere and Root-Free Soil[J]. PLoS One, 2014, 9(4): 1-9.
- [25] 张琳, 熊格生, 吴莎莎, 等. 沼气池污泥微生物总 DNA 提取方法的比较[J]. 激光生物学报, 2011, 20(6): 847-854.
- [26] 曲衍洪, 田琳, 李玉梅, 等. 环氧丙烷皂化废水活性污泥 DNA 提取方法的比较和优化[J]. 生物加工过程, 2015, 13(1): 42-46.
- [27] 陈琰, 艾云灿. 大片段 DNA 提取和纯化的优化方案[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(9): 5 096-5 097.
- [28] 毛丹丹, 许培雅. 应用于 PCR-DGGE 分析的活性污泥微生物总 DNA 提取方法比较[J]. 环境工程学报, 2013, 7(3): 1 189-1 195.
- [29] CULLEN D W, HIRSCH P R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR[J]. Biochemistry, 1998, 30(8/9): 983-993.
- [30] 闫建芳, 刘秋, 张璐, 等. 一种活性污泥总 DNA 提取方法的优化[J]. 环境工程学报, 2012, 6(3): 1 000-1 004.
- [31] 张春辉, 赵树欣, 梁慧珍. 高温大曲中细菌总 DNA 提取方法比较[J]. 酿酒科技, 2008(10): 54-56.
- [32] ZHANG Xin, ZHANG He, PU Jin-ji, et al. Development of a Real-Time Fluorescence Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Quantitative Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soil[J]. FEMS Microbiology, 2013, 349(2): 127-134.
- [33] TANIMA Paul, SEMANTI Basu, KEKA Sarkar. SPION-mediated soil DNA extraction and comparative analysis with conventional and commercial kit-based protocol[J]. 3 Biotech, 2014, 4(6): 669-677.
- [34] 谢军, 罗惠波, 边名鸿, 等. 酒曲中产香微生物的筛选及其生长特性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 22-25, 86.
- [35] 叶光斌, 王彩虹, 王毅, 等. 清香型大曲细菌群落结构的比较分析[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 11-15, 73.
- [36] 甄攀. 窖泥微生态研究[D]. 自贡: 四川理工学院, 2010: 4-5.
- [37] 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: 8.
- [38] 沈才萍, 李德林, 沈才洪, 等. 酒醅微生物 DNA 提取预处理方法研究[J]. 四川理工学院学报, 2013, 26(3): 16-20.
- [39] 李德林, 敖宗华, 邓波, 等. 酒醅微生物总 DNA 提取方法的研究[J]. 酿酒科技, 2014(1): 33-37.
- [40] 汤斌, 刘金英, 周庆伍, 等. 浓香型白酒窖泥中细菌多样性的免培养技术分析[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7): 43-47.
- [41] 边名鸿, 叶光斌, 杨晓东, 等. 酱香型窖泥古菌群落结构的研究[J]. 酿酒科技, 2012(8): 51-53.
- [42] 刘金英, 汤斌. 浓香型白酒窖泥中总 DNA 提取方法的研究[J]. 安徽工程大学学报[J], 2013, 28(3): 8-11.
- [43] MARON P A, RANJARD L, MOUGEL C, et al. Metaproteomics: A New Approach for Studying Functional Microbial Ecology[J]. Microbiology Ecology, 2007, 53(3): 486-493.
- [44] CULLIGAN E P, SLEATOR R D, MARCHESI J R, et al. Metagenomics and novel gene discovery Promise and potential for novel therapeutics[J]. Virulence, 2014, 5(3): 399-412.

(下转第 215 页)

- age[J]. Journal of Food Process Engineering, 2008, 34(4): 1 156-1 171.
- [41] SILVA-PEREIRA M C, TEIXEIRA J A, PEREIRA-JÚNIOR V A, et al. Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae, (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 61(1): 258-262.
- [42] LIU Bin, HAN Xu, ZHAO Hui-ying, et al. Preparation and characterization of intelligent starch/PVA films for simultaneous colorimetric indication and antimicrobial activity for food packaging applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157: 842-849.
- [43] ABREU A S, OLIVEIRA M, DE S A, et al. Antimicrobial nanostructured starch based films for packaging[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 129: 127-134.
- [44] MORRO A, CATALINA F, CORRALES T, et al. New blends of ethylene-butyl acrylate copolymers with thermoplastic starch Characterization and bacterial biodegradation[J]. Carbohydrate Polymers, 2016(10): 149-168.
- [45] 庄海宁, 金征宇, 张燕萍. 微孔淀粉在食品微胶囊化中的应用[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 129-132.
- [46] ZHANG Li, WANG Ying, LIU Hua, et al. Developing hydroxypropyl methylcellulose/hydroxypropyl starch blends for use as capsule materials[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 73-79.
- [47] 曹余, 何绍凯, 刘全亮, 等. 空心胶囊用马铃薯复合改性淀粉的制备[J]. 绿色科技, 2016(4): 196-199.
- [48] NAZILA Oladzadabbasabadi, SHOKOUFEH Ebadi, ABDORREZA Mohammadi Nafchi, et al. Functional properties of dually modified sago starch/ $\kappa$ -carrageenan films; An alternative to gelatin in pharmaceutical capsules[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 160: 43-51.
- [49] 周雨佳, 肖茜, 邓放明. 纳米淀粉的制备及其在可食性薄膜中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(9): 229-232.

(上接第 178 页)

- [4] 廖文艳, 周凌华, 王荫榆, 等. 近年来益生菌肠道功能作用机制及研究方法的进展[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(2): 184-189.
- [5] 李琴, 张世春, 曾晓燕, 等. 益生菌营养及保健作用[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(2): 106-108.
- [6] MARTENSSON O, OSTEBO R, HOLST O. The effect of yoshurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products[J]. Food Research International, 2002(35): 775-784.
- [7] 纵伟, 盛欣昕, 谭洪卓, 等. 益生菌发酵苦荞粉酶解液制备工艺研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 14-17.
- [8] 万萍. 食品分析与实验[M]. 北京: 中国纺织出版社, 2015.
- [9] 顾国贤. 酿酒工艺学[M]. 2 版. 北京: 中国轻工业出版社, 2012: 113.
- [10] 王春萍, 高丽鹃, 潘志芬, 等. 青藏高原青稞农家品种淀粉颗粒结合蛋白组成及 GBSSI 基因 5 前导序列的多态性[J]. 作物学报, 2012, 38(7): 1 148-1 154.
- [11] 万萍, 张宇, 杨兰, 等. 响应面法优化苦荞干黄酒主发酵工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(11): 1 185-1 191.
- [12] 李秀霞, 王珍, 李娇, 等. 响应面法优化盐藻油的超声波辅助提取工艺[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(8): 203-207.

(上接第 194 页)

- [27] 孙伟峰. 利用酶法和外加香料法对下部烟叶的增香提质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 14-21.
- [28] 邱晔, 卢伟, 王建, 等. 造纸法烟草薄片对卷烟一氧化碳碳排放量影响研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2010(S1): 130-133.
- [29] 葛少林. 造纸法再造烟叶热解过程与烟气组分调控技术研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2014: 33-43.
- [30] 梅秦源. 造纸法重组烟叶品质提升及保香性能研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2014: 27-28.
- [31] 黄强, 李楠, 蒋元力. 固定化酶反应器制备新型烟草保润剂的研究[J]. 郑州大学学报: 工学版, 1999, 20(4): 50-52.
- [32] 蒋次清, 王岚, 廖臻, 等. 微波马弗炉测定烟草中灰分的研究[J]. 安徽农业科学, 2012(7): 3 980-3 980.
- [33] 王相凡. 碳酸钙加入量对造纸法再造烟叶的影响[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(24): 162-163.
- [34] 曾健, 陈克复, 谢剑平, 等. 碳酸钙对造纸法再造烟叶片基的影响[J]. 烟草科技, 2013(10): 5-16.
- [35] 罗冲, 胡惠仁, 温洋兵. 填料在造纸法烟草薄片生产中的应用研究[J]. 中华纸业, 2012, 33(16): 22-25.
- [36] 王浩雅, 殷艳飞, 杨帅, 等. 碳酸钙添加量对再造烟叶物理性能与烟气指标的影响[J]. 中华纸业, 2015, 36(12): 22-26.
- [37] 高文花. 特种植物废弃物高效利用技术的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013: 68-71.

(上接第 210 页)

- [45] STREIT W R, SCHMITZ R A. Metagenomics-the key to the uncultured microbes [J]. Current Opinion in Microbiology, 2004, 7(5): 492-498.
- [46] CHUNG E J, LIM H K, KIM J C, et al. Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in Escherichia coli [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(3): 723-730.
- [47] KAKIRDE K S, PARSLEY L C, LILES M R. Size Does Matter: Application-driven Approaches for Soil Metagenomics[J]. Soil Biol Biochem, 2010, 42(11): 1 911-1 923.
- [48] 蒋云霞, 郑天凌. 天然红树林土壤微生物大片段宏基因组文库的构建[J]. 环境科学, 2007, 28(11): 2 609-2 614.
- [49] KIM U J, BIRREN B W, SLEPAK T, et al. Construction and Characterization of a Human Bacterial Artificial Chromosome Library[J]. Genomics, 1996, 34(2): 213-218.
- [50] 苟敏, 曲媛媛, 周集体, 等. 活性污泥宏基因组 Fosmid 文库的构建[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2012, 40(1): 120-124.