微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn

JUL 20, 2010, 37(7): 999–1004
© 2010 by Institute of Microbiology, CAS

研究报告

利用 PCR-DGGE 未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析

高亦豹[1,2]　王海燕[1,2]　徐岩[1,2*]

(1. 食品科学与技术国家重点实验室 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)

摘　要: 采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术, 研究了 5 种高温和中温白酒大曲细菌群落结构, 通过优势条带切胶鉴定确定了大曲中优势细菌种属信息。结果表明, *Weissella cibaria*、*Lactobacillus helveticus*、*L. fermentum*、*L. panis* 等乳酸菌普遍存在于 5 种大曲中, *Thermoactinomyces sanguinis* 仅存在于高温曲酱曲中, 同时 DGGE 检测到了传统方法未能分离鉴定的 *Staphylococcus xylosus*、*Klebsiella oxytoca*。不同工艺大曲细菌群落结构存在明显差异, 随着制曲温度的升高, 大曲细菌多样性指数有下降趋势。PCR-DGGE 技术是一种能够快速有效地研究白酒大曲细菌群落结构的技术。

关键词: 大曲, 16S rRNA V3, DGGE, 细菌群落结构

PCR-DGGE Analysis of the Bacterial Community of Chinese Liquor High and Medium Temperature Daqu

GAO Yi-Bao[1,2]　WANG Hai-Yan[1,2]　XU Yan[1,2*]

(1. *State Key Laboratory of Food Science and Technology*, *Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education*, *Wuxi*, *Jiangsu* 214122, *China*)
(2. *School of Biotechnology*, *Jiangnan University*, *Wuxi*, *Jiangsu* 214122, *China*)

Abstract: The bacterial community structure of 5 high and medium temperature Chinese liquor Daqu were investigated using PCR-DGGE (Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) as a culture-independent method. DNA sequencing was proceeded to obtain the dominant bacterial population information. The result of DGGE profile showed that *Weissella cibaria*, *Lactobacillus helveticus*, *L. fermentum* and *L. panis* were commonly detected in all the five Daqu. *Thermoactinomyces sanguinis* was detected only in the Jiangqu sample. Compared with culture-dependent method, DGGE was able to detect *Staphylococcus xylosus* and *Klebsiella oxytoca*. The correlation between the craftwork of Daqu and the bacterial community structure was obvious. The Daqu bacterial Shannon-Wiener index decreased as the craftwork temperature of Daqu increasing. PCR-DGGE was proved to be a

基金项目：国家科技支撑计划重点项目(No. 2007BAK36B02, 2008BAI63B06); 江南大学食品科学与技术国家重点实验室目标导向课题(No. SKLF-MB-200801)
*通讯作者：Tel: 86-510-85918201; ✉ yxu@jiangnan.edu.cn
收稿日期：2010-01-19; 接受日期：2010-03-15
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

powerful tool for gaining detailed insight into the bacterial diversity of the Chinese liquor Daqu.

Keywords: Daqu, 16S rRNA V3, DGGE, Bacterial community

酒曲酿造是我国优势传统发酵食品白酒的酿造特征和精华所在, 酒曲被西方学者誉为中国的第五大发明[1]。大曲以小麦等谷物为原料, 进行固态生料发酵, 大曲作为白酒生产中微生物及酶的主要来源, 其质量直接关系到酒的出酒率及酒质。大曲按其品温不同可分为低温曲、中温曲、高温曲, 按照原料的不同又可分为多粮曲和单粮曲。由于制曲工艺的不同, 不同工艺大曲在微生物群落结构上存在一定差异性, 并直接影响酒醅发酵菌系、酶系和物系组成。一般认为, 利用中温曲酿造出的酒为浓香型白酒, 高温曲则酿造出酱香型白酒。浓香型和酱香型是中国白酒的两大典型香型, 浓香型白酒占中国白酒总产量 70%以上, 酱香型白酒的产量只有 1%左右, 但是销售额却接近 10%, 因而对中高温曲微生物的研究对我国白酒工业的发展具有重要意义。

中国白酒是世界上为数不多的以细菌为主要发酵剂的发酵食品, 无论大曲培养还是酿酒发酵都离不开细菌, 细菌为发酵产香的主要动力。茅台成品大曲中 90%以上微生物为细菌, 被定义为细菌曲, 且茅台大曲中细菌绝大多数为嗜热芽孢杆菌。梭状芽孢杆菌为浓香型白酒发酵过程中主体香己酸乙酯前体己酸的产生菌, 而乳酸菌等细菌则发酵产生乳酸及各种氨基酸, 为酯化提供前体。

我国学者对白酒微生物的研究历史久远, 但由于技术方法的限制, 对大曲微生物群落多样性的认识仅依赖于传统的形态特征、生理生化特性的分类和鉴定[2], 且传统方法研究的是体系中主要的可培养微生物, 不适应对难于培养和不能培养微生物菌群分析的需要。近年来, DGGE/TGGE (变性/温度梯度凝胶电泳)、T-RFLP 等基因指纹图谱技术, 被广泛运用于复杂环境样品微生物群落结构的研究[3−4]。其中, DGGE 技术不需要对样品微生物进行培养, 可直接研究其基因指纹图谱, 具有检测极限低、易操作、可重复性强等特点。利用分子生态技术研究中国白酒微生物群落结构逐渐成为国内外学者的研究热点, 欧洲学者也已开始了对我国大曲微生物群落结构的相关研究[5]。

针对单一品种大曲的细菌群落信息研究报道很多[6−7], 但较全面地分析中温和高温大曲中细菌群落结构的研究却未见报道。本课题组前期利用 PCR-DGGE 研究了浓香型白酒酒醅中细菌群落结构[8], 但利用分子生态技术对白酒大曲细菌群落结构的研究却未见报道。本研究采用 PCR-DGGE 技术, 通过对 5 种高温和中温大曲细菌的群落结构分析, 确定了大曲中优势细菌的群落组成并对比了不同工艺大曲细菌群落结构的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 采用江苏北部某酒厂 5 种不同工艺大曲, 大曲出房时间均为 2007 年 9 月, 取样时间为 2007 年 10 月。同一种大曲在曲房的上中下部分取 3 个曲块平行样, 使用无菌刀具将曲皮与曲心分离, 曲皮部分取大曲表皮 0–3 cm 的样品, 曲心部分取大曲中心向外 0–3 cm 部分样品。3 个平行样的曲心和曲皮分别进行混合, 混合后使用大曲粉碎机将样品粉碎, 粉碎后的样品作为一个样品进行后续分析。样品密封后, –70°C 冷冻保藏备用。表 1 列举出了大曲样品类型及工艺参数。

表 1 大曲样品信息表
Table 1 Information of Daqu samples

编号 No.	样品 Sample	类型 Type	最高品温 Highest manufacture temperature (°C)	原料 Raw material
1	酱曲	单粮曲	65	小麦
2	纯小麦中高温曲	单粮曲	60	小麦
3	纯小麦中温曲	单粮曲	55	小麦
4	7:2:1 中高温曲	多粮曲	60	小麦:大麦:豌豆比例为 7:2:1
5	7:2:1 中温曲	多粮曲	55	小麦:大麦:豌豆比例为 7:2:1

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.1.2 药品: X-gal 和 IPTG 购自上海生工生物工程公司。SYBR Green I 购自 Invitrogen 公司。dNTPs, *Taq* 酶, 连接试剂盒购自 TaKaRa 公司。PCR 扩增所用引物均由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理和总 DNA 的提取: 参见文献[9]。

1.2.2 PCR 扩增条件: 用 P2、P3 通用引物[10]进行 16S rRNA V3 可变区片段的扩增。P2: 5′-ATTACCG CGGCTGCTGG-3′; P3: 5′-CGCCCGCCGCGCGCGG CGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGG GAGGCAGCAG-3′ (40 个 GC 夹子)。PCR 反应 50 μL 体系包括 5 μL 的 10 × Buffer, 4 μL 的 25 mmol/L dNTPs 混合物, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 每种引物 25 pmol, DNA 模板用量约为 10 ng。PCR 反应程序如下: 94°C 4 min; 94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。然后进行“Reconditioning PCR”来消除普通 PCR 过程中的杂合双链 DNA 污染[11]。

1.2.3 基因组总 DNA 16S rRNA V3 区扩增片段变性梯度凝胶电泳(DGGE): 基因组总 DNA 16S rRNA V3 区扩增片段通过 DGGE (Bio-Rad Dcode mutation detection system)进行分离。丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 100%变性剂为 7 mol/L 尿素和 40%去离子甲酰胺, PCR 产物上样量为 200 ng。DGGE 变性梯度为 20%–50%, 电压 100 V, 电泳温度 60°C, 电泳时间 200 min。电泳完毕后用 SYBR green I (1 × TAE, 1:10000)染色 45 min, 通过凝胶成像系统(Bio-Rad)分析电泳结果。

1.2.4 Shannon-Wiener 多样性指数分析: 使用 Quantity One 软件对 DGGE 胶图进行计算; 按照如下公式进行多样性指数计算。公式中 H 为 Shannon-Wiener 多样性指数, s 为 DGGE 胶中条带数量, p_i 为第 i 条带灰度占该泳道总灰度的比率。

$$H = \sum_{i=1}^{s} p_i \ln p_i = -\sum_{i=1}^{s} (N_i / N) \ln (N_i / N)$$

1.2.5 PCA 分析: 使用 Quantity One 软件(Version 4.4.0, 美国 Bio-Rad 公司)对 DGGE 胶图进行计算, 然后使用 Matlab 软件(Version 7.0.1, 美国 MathWorks 公司)进行 PCA (Principal component analysis)分析。

1.2.6 DGGE 条带的回收、重新扩增、克隆、转化和比对: 参见文献[8]。

1.2.7 割胶回收条带的测序和结果分析: 每条割胶条带挑取 3 个 DGGE 比对正确的阳性单克隆送上海生工生物工程有限公司测序分析。测序引物为 pMD19T 载体测序通用引物(前端 RV-M: 5′-GAGC GGATAACAATTTCACACAGG-3′, 后端 M13-47: 5′-CAGCACTGACCCTTTTGGGACCGC-3′), 目的序列在 GenBank 数据库进行比对。

2 结果与讨论

2.1 大曲细菌 DGGE 指纹图谱及细菌多样性分析

大曲样品基因组经 PCR 扩增后获得单一目的条带, PCR 产物 DGGE 电泳后获的了 5 种大曲细菌的 DGGE 指纹图谱(图 1), 每一条泳道代表 1 种大曲样品细菌的 DGGE 指纹图谱。不同位置的条带代表不同种属细菌, 条带的荧光强度则反映了该细菌的丰富度, 条带信号越亮, 表示该种属细菌的相对数量越多。图 1 表明 5 种不同工艺大曲细菌群落结构存在明显差异, 同时各种大曲也呈现出不尽相同的优势菌条带。DGGE 图谱中多数条带是纯小麦中温大曲、纯小麦中高温大曲、7:2:1 中温大曲、7:2:1 中高温大曲 4 种浓香型大曲所共有的, 但酱曲电泳条带明显少于其他样品, 主要条带仅有 3 条。

5 种不同工艺大曲细菌多样性指数如图 2 所示。由图 2 可知, 5 种大曲中纯小麦中温大曲的细菌多样性指数最高, 而酱曲的最低。酱曲、纯小麦中温大曲、纯小麦中高温曲 3 种曲制曲原料皆为纯小麦, 酱曲在制作工艺中品温最高, 而纯小麦中温曲最低, 由多样性指数分析可知大曲细菌多样性指数: 酱曲 < 纯小麦中高温曲 < 纯小麦中温曲。对于多粮曲, 7:2:1 中温大曲细菌多样性指数也略高于 7:2:1 中高温大曲。由此可知原料相同但制曲温度不同的大曲, 大曲品温越高则细菌多样性指数越低, 其原因可能是由于高温工艺致使某些不耐高温的细菌死亡, 致使多样性指数下降。5 种大曲曲心部位细菌多样性指数均高于曲皮部位。出房期时大曲曲皮部分水分下降, 故菌数呈缓缓低落的趋势, 而曲心部分仍高于曲皮水分, 少数耐干燥菌类尚能发育, 因而曲心部位多样性指数略高于曲皮部位。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

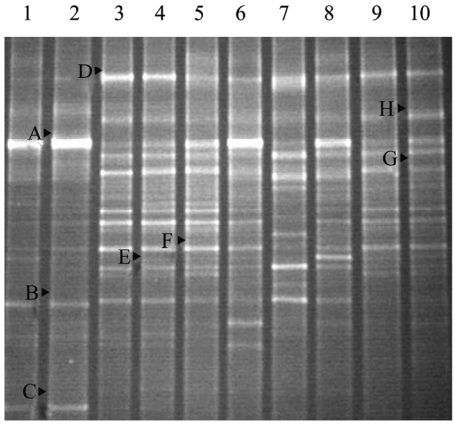

图 1　5 种大曲细菌群落 DGGE 图谱

Fig. 1　DGGE profiles of bacterial 16S rRNA V3 regions of five high and medium temperature Daqu

注: 1: 酱曲(皮); 2: 酱曲(心); 3: 纯小麦中温大曲(皮); 4: 纯小麦中温大曲(心); 5: 纯小麦中高温大曲(皮); 6: 纯小麦中高温大曲(心); 7: 7:2:1 中温大曲(皮); 8: 7:2:1 中温大曲(心); 9: 7:2:1 中高温大曲(皮); 10: 7:2:1 中高温大曲(心); 编号 A–H 对应 8 个 DGGE 切胶条带.

Note: 1: Jiangqu surface (Temperature: 65°C); 2: Jiangqu internal (Temperature: 65°C); 3: Pure wheat surface (Temperature: 55°C); 4: Pure wheat internal (Temperature: 55°C); 5: Pure wheat surface (Temperature: 60°C); 6: Pure wheat internal (Temperature: 60°C); 7: 7:2:1 surface (Temperature: 55°C); 8: 7:2:1 internal (Temperature: 55°C); 9: 7:2:1 surface (Temperature: 60°C); 10: 7:2:1 internal (Temperature: 60°C); Serial number A–H corresponding to bands excised from the DGGE gel.

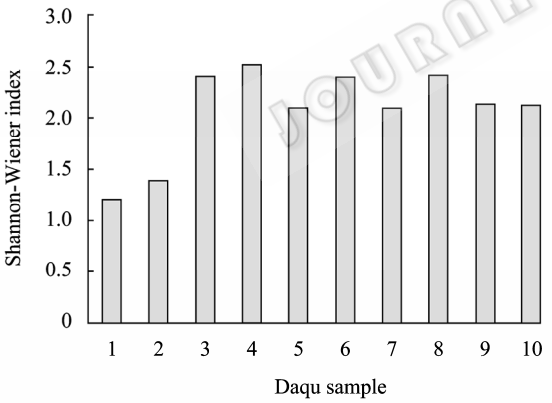

图 2　5 种大曲细菌多样性指数分析

Fig. 2　Shannon-Wiener analysis of the bacteria of five high and medium temperature Daqu

2.2　大曲细菌群落结构与工艺相关性分析

DGGE 图谱的 PCA 分析结果如图 3 所示。样品之间的距离代表了它们的差异大小。主成分因子 1 (PC1)的贡献率为 72.27%, 主成分因子 2 (PC2)的贡献率为 13.98%。

由图可知, 所有单粮曲主要分布在 PC1 方向上, 依次按照酱曲、纯小麦中高温曲、纯小麦中温曲方向延伸。这说明选用同样的原料制曲时, 制曲品温的高低对大曲中细菌群落组成的影响非常显著。多粮曲则主要分布在 PC2 方向上。多粮曲中含有多种谷物原料, 不同谷物的营养成分及其特性存在不同。豌豆的特点是豆皮柔薄、蛋白质含量高、总氮含量较高、粘性大、透气性差、压火、水份和热量不容易散失、易提温增香。大麦在磨碎成粗粉后, 皮多、粒粗、疏松、易透气, 大曲微生物容易生长繁殖, 水份和热量也容易散失, 故有“上火快, 退火亦快”的缺点。因此谷物的特性会对细菌的生长和代谢产生影响, 相应就削弱了品温的影响程度。

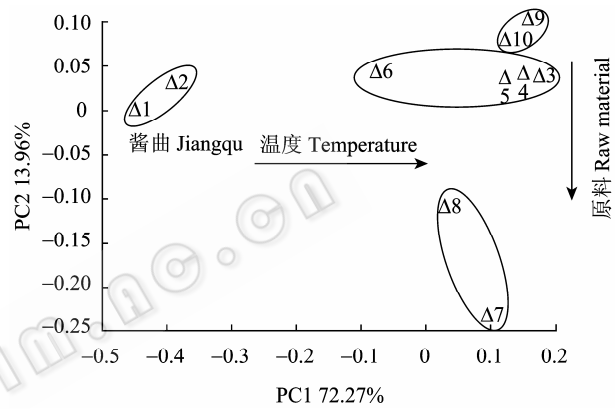

图 3　5 种大曲细菌 DGGE 图谱的 PCA 分析

Fig. 3　PCA analysis of the 16S rRNA V3-DGGE band patterns in the gel of five high and medium temperature Daqu

由图 3 可知, 酱曲与其他工艺大曲在菌群结构上显示出明显差异, 酱曲独特的高温工艺可能致使某些不耐高温细菌死亡, 使细菌种类和数量均会减少, 导致其群落结构明显区别于其他大曲。

2.3　DGGE 图谱中主要条带的分子鉴定

为近一步研究不同工艺大曲细菌菌群组成, DGGE 电泳后(图 1), 对其中 8 个主要条带进行切胶回收、克隆、比对和测序(结果见表 2)。测序结果经 GenBank 数据库比对后, 相似率均大于 98%, 比对结果显示乳酸菌、高温放线菌、葡萄球菌、克雷伯氏菌等多个种属的细菌存在于 5 种大曲中。

与传统分离培养方法研究相比, 本研究首次揭示了白酒大曲中乳酸菌的种多样性, 多种乳酸菌存在于不同工艺大曲中。条带 D、G、H 对应同源性最高的菌种分别为 *Weissella cibaria*、*L. helveticus*、*L. fermentum*, 与条带 E、F 同源性最高的皆为 *L. panis*。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

乳酸菌是白酒生产中非常重要的微生物之一, 由它代谢产生大量乳酸, 与酵母产生的酒精合成乳酸乙酯, 乳酸乙酯含量的多少在一定程度上决定了浓香型大曲酒的质量, 同时在酿造过程中乳酸菌具有促进美拉德反应、促进酿酒的发酵、维护与保持酿酒微生态环境等作用[12]。*L. panis* 和 *L. fermentum* 为乳酸异型发酵, 发酵己糖可产生乳酸、乙醇、二氧化碳等。*L. helveticus* 是酸奶发酵中常用菌株, 该菌同型乳酸发酵, 发酵己糖产生乳酸。*Weissella cibaria* 也广泛存在于烧酒发酵过程中[13]。大曲中乳酸菌是大曲及窖池发酵过程中乳酸的重要产生菌, 但其种多样性及在中国白酒发酵过程中的具体生产应用尚待进一步研究。

表 2 16S rRNA V3 区基因的 PCR-DGGE 切胶条带的测序结果分析

Table 2 Sequencing results of the bands cut from the 16S rRNA V3 DGGE gels

条带 Band	编号 Accession No.	菌株 Closest relative	相似性 Identity (%)
A	EU266748	*Staphylococcus xylosus*	98
B	AM160650	*Klebsiella oxytoca*	99
C	AJ251778	*Thermoactinomyces sanguinis*	98
D	AB362617	*Weissella cibaria*	100
E	AY323494	*Lactobacillus panis*	99
F	AY323494	*Lactobacillus panis*	99
G	EU483108	*Lactobacillus helveticus*	100
H	EU420175	*Lactobacillus fermentum*	99

注: 表中测序比对结果均为 GenBank 比对后出现的第一个比对结果.

Note: The result of sequence analysis was obtained as the first result of GenBank alignment list.

本研究同时发现了传统培养方法未报道的 *Staphylococcus xylosus* 和 *Klebsiella oxytoca*。与条带 A 同源性最高的是 *Staphylococcus xylosus*, 该菌在 5 种大曲中均存在, 且处于一定的优势地位。*Staphylococcus xylosus* 是香肠发酵的重要菌种之一[14]。通过传统平板分离方法利用 MSA 培养基分离得到了该菌, 初步研究发现该菌具有一定的产脂肪酶及 3-甲基丁醇的能力, 其具体功能有待进一步探索。与条带 B 同源性最高的为 *Klebsiella oxytoca*, 该菌尚未在白酒大曲、酒醅中分离得到, Lutfu 等在小麦根系中曾分离到该菌, 并研究了其在根系固氮中的作用[15]。分析可能是由大曲原料将该菌带入大曲中。

条带 C 仅存在于酱曲中, 测序结果显示与之同源性最高的为 *Thermoactinomyces sanguinis*。放线菌普遍存在于酿酒环境中, 但国内对酿酒过程中的放线菌研究大多只停留在传统的分离鉴定上, 未能对其在酿酒过程中的具体功能进行相关深入研究。*Thermoactinomyces sanguinis* 属于高温放线菌属, 高温放线菌具有典型放线菌形态, 系统进化却更接近于芽胞杆菌[16]。*Thermoactinomyces sanguinis* 具有较强的耐高温能力, 因而在酱曲的高温制作工艺过程中得以存活。由于高温曲以高温培菌, 在细菌菌群构成上以高温嗜热菌为主。浓香型大曲以中温培菌, 因此菌群则以常温菌为主。两类大曲菌群不同的代谢特征对白酒风味形成将产生不同影响, 表现出白酒的特有风格。由于原材料类别及比例、生产工艺等的不同, 同一香型的不同风格白酒在大曲微生态组成上可能不同甚至有较大的差异。同时, 酵母及霉菌是大分子物质的降解和乙醇产生中不可缺少的微生物区系, 因而大曲中酵母和霉菌的群落分析有待做进一步研究和探讨。

3 结论与讨论

本研究证明, PCR-DGGE 是一种能够快速有效地研究白酒大曲微生物菌群结构的技术。通过 PCR-DGGE 分析 5 种高温和中温大曲细菌群落结构, 结果表明不同工艺大曲细菌群落结构存在明显差异。*Weissella cibaria*、*L. helveticus*、*L. fermentum*、*L. panis* 等乳酸菌普遍存在于不同工艺大曲中, *Thermoactinomyces sanguinis* 仅存在于高温曲酱曲中, 该菌具有较强的耐高温能力而在酱曲的高温制作工艺过程中得以存活。随着制曲温度的增高, 大曲细菌多样性指数有下降趋势。

与传统方法相比, PCR-DGGE 极大拓展了对大曲微生物多样性的研究, 通过 DGGE 鉴定出了 *Staphylococcus xylosus*、*Klebsiella oxytoca* 等传统方法未报道的菌种, 同时也揭示了白酒大曲中乳酸菌的种群多样性。但要了解大曲微生物的生态功能, 仍需要得到它们的纯培养, 传统分离培养工作仍然是研究微生物多样性不可缺少的手段。运用

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

PCR-DGGE 基因指纹图谱技术分析白酒大曲的微生物群落结构, 将其与传统的菌种分离鉴定、白酒风味组成分析等手段相结合, 对判断和鉴定白酒生产中与特征风味物质相关的关键微生物、指导生产工艺改进, 具有重要的理论和实践意义。

参 考 文 献

[1] 方心芳. 曲孽的起源和发展//《生物学史专辑》编纂组. 科技史文集. 第 4 辑. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 140−149.

[2] 廖建民, 姚万春, 唐玉明, 等. 浓香型曲药细菌初步分类鉴定研究. 酿酒, 2001, **28**(5): 42−43.

[3] 宋巍, 安德荣, 刘雪, 等. DGGE 分析东江流域农村饮用水源中微生物多样性及其与环境因子相关性. 微生物学通报, 2009, **36**(9): 1311−1317.

[4] Jany JL, Barbier G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*, 2008, **25**(7): 839−848.

[5] Nout JR. KNAW Research Programm. Http://www.onderzoekinfortie.nl/n/oi/nod/onderzoek/OND1335853/. 06−11−2009.

[6] Wang CL, Shi DJ, Gong GL. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, **24**(10): 2183−2190.

[7] 杨代永, 范光先, 汪地强, 等. 高温大曲中的微生物研究. 酿酒科技, 2007(5): 37−41.

[8] Wang HY, Zhang XJ, Zhao LP, *et al*. Analysis and comparison of the bacterial community in fermented grains during the fermentation for two different styles of Chinese liquor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008(35): 603−609.

[9] 张晓君, 许泓瑜, 许正宏, 等. 镇江香醋醋酸发酵过程中细菌群落组成分析. 微生物学通报, 2007, **34**(4): 646−649.

[10] Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(3): 695−700.

[11] Zhang XL, Yan X, Gao PP, *et al*. Optimized sequence retrieval from single bands of TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, **60**(1): 1−11.

[12] Lonvaud-Funel A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, **76**(4): 317−319.

[13] Endo A, Okada S. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during Shochu fermentation by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, **99**(3): 216−221.

[14] Stahnke LH. Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus*. *Meat Science*, 1994(38): 39−53.

[15] Lutfu CM, Evans HJ, Seidler RJ. Characteristics of nitrogen fixing *Klebsiella oxytoca* isolated from wheat roots. *Plants and Soils*, 1981(61): 43−64.

[16] Yoon JH, Park YH. Phylogenetic analysis of the genus *Thermoactinomyces* based on 16S rDNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000(50): 1081−1086.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn