

克隆文库分析镇江香醋发酵过程中乙偶姻合成基因的多样性*

刘娜¹ 陆震鸣¹ 王丽娟¹ 余永健⁴ 李国权⁴ 史劲松^{1,2} 许正宏^{1,2,3**}

¹江南大学药学院, 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122

²国家固态酿造工程技术研究中心 泸州 646000

³中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津市工业生物系统与过程工程重点实验室 天津 300308

⁴江苏恒顺醋业股份有限公司 镇江 212043

摘要 乙偶姻是传统发酵食醋重要的风味物质,也是食醋中活性物质川芎嗪形成的重要前体。采用克隆文库分析方法对镇江香醋醋醅中乙偶姻合成途径的两个关键酶(乙酰乳酸合成酶ALS,乙酰乳酸脱羧酶ALDC)的基因多样性进行分析。结果表明,ALS基因克隆文库中相对丰度最大为*Lactobacillus buchneri* (65.7%),其次为*Acetobacter pasteurianus* (21.3%)、*L. reuteri* (10.2%)、*L. casei* (1.9%)、*L. brevis* (0.9%);而ALDC基因克隆文库中*A. pasteurianus* (91.2%)占绝对优势,且呈现丰富的种内基因多样性,另外还有少量*L. fermentum* (8.8%)。因此,*Acetobacter*和*Lactobacillus*可能是醋醅微生物群落中利用丙酮酸合成乙偶姻的主要参与者;本研究可为解析多菌种醋酸发酵过程中乙偶姻微生物合成机理奠定研究基础,同时为其他微生物群落功能的研究提供参考。(图5表1参28)

关键词 镇江香醋;乙偶姻;基因多样性;克隆文库;微生物群落;乙酰乳酸合成酶;乙酰乳酸脱羧酶

CLC TS264.22 : Q785

Clone library analysis of enzyme genes in metabolic pathway for acetoin production in the fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar*

LIU Na¹, LU Zhenming¹, WANG Lijuan¹, YU Yongjian⁴, LI Guoquan⁴, SHI Jinsong^{1,2,3**} & XU Zhenghong^{1,2,3**}

¹School of Pharmaceutical Science, Key Laboratory of Industrial Microbiology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

²National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, China

³Tianjin Key Laboratory for Industrial Biological Systems and Bioprocessing Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

⁴Jiangsu Hengshun Vinegar Industry Co., Ltd., Zhenjiang 212043, China

Abstract This research aimed to study the gene diversity of two key enzymes in the acetoin pathway in the vinegar *Pei* and to lay foundation for the functional microbial community reconstruction. Degenerate primers were designed, validated and used for the amplification of gene coding for acetolactate synthase (ALS) and acetolactate decarboxylase (ALDC) in vinegar *Pei*. Then two gene clone libraries were established respectively and analyzed by rarefaction curve, cluster analysis and phylogenetic analysis. Two pairs of degenerate primers were validated to be of high specificity and used for the clone libraries construction. Sequences in ALS clone library were clustered to 6 Operational Taxonomic Units (OTUs) and the most abundant species was proved to be *Lactobacillus buchneri* (65.74%). Sequences in ALDC clone library were clustered to 16 OTUs and the most abundant species was *Acetobacter pasteurianus* (91.23%). The research found that *Lactobacillus* and *Acetobacter* might be the main functional genera for the production of ALS and ALDC in the vinegar *Pei*.

Keywords Zhenjiang aromatic vinegar; acetoin; gene diversity; clone library; microbial community; acetolactate synthase; acetolactate decarboxylase

中国传统发酵食醋具有悠久的历史,是人民日常生活中重要的调味品和保健食品。传统食醋的生产过程主要分为酒

精发酵、醋酸发酵和陈酿3个阶段,其中醋酸发酵阶段多采用天然开放式多菌种固态发酵工艺,是食醋风味物质生成的重要阶段。醋酸发酵过程醋醅中的复杂微生物群落能够利用谷物和酒醅中的营养物质代谢生产多种食醋风味化合物。近年来随着分子生态学技术的发展,我国学者对醋酸发酵过程中微生物群落的多样性和演替规律认识逐渐深入^[1-3],但是对于食醋微生物群落功能的研究报道尚较少。

本课题组在前期研究中发现镇江香醋中川芎嗪(四甲

收稿日期 Received: 2016-01-28 接受日期 Accepted: 2016-03-04

*国家自然科学基金项目(31271922, 31530055)和国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2012AA021301, 2013AA102106, 2014AA021501)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31271922, 31530055), and the National High-tech R & D Program of China (863 Program, 2012AA021301, 2013AA102106, and 2014AA021501)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhenghuxu@jiangnan.edu.cn)

基吡嗪)的含量较高^[4],是其具有心脑血管保健作用^[5-7]的重要物质基础。前期研究表明,在醋酸发酵阶段的醋醅中川芎嗪仅少量积累(75.9 μg/g醋醅),而乙偶姻则大量形成(10.2 mg/g醋醅)^[8]。醋醅中的乙偶姻能够进一步在食醋煎煮、陈酿阶段通过化学反应^[9-11]大量生成川芎嗪。乙偶姻主要的微生物合成途径^[12-15]如图1所示,丙酮酸在乙酰乳酸合成酶(EC 2.2.1.6, acetolactate synthase, ALS)的作用下转化为乙酰乳酸,又经乙酰乳酸脱羧酶(EC 4.1.1.5, acetolactate decarboxylase, ALDC)催化生成乙偶姻。目前对于醋酸发酵阶段醋醅中哪些微生物参与了乙偶姻的生物合成尚缺少深入了解。

本研究采用克隆文库分析的方法,对醋醅中乙偶姻合成途径关键步骤的两个酶ALS、ALDC的微生物基因多样性进行分析。首先根据醋醅微生物群落的物种多样性特点设计出ALS、ALDC基因扩增的特异性简并引物,然后通过PCR、克隆文库的非培养手段挖掘醋醅中含有这两种酶编码基因的微生物种属信息。本研究可为明确传统发酵食醋中乙偶姻的形成机制,解析食醋微生物群落功能奠定研究基础。

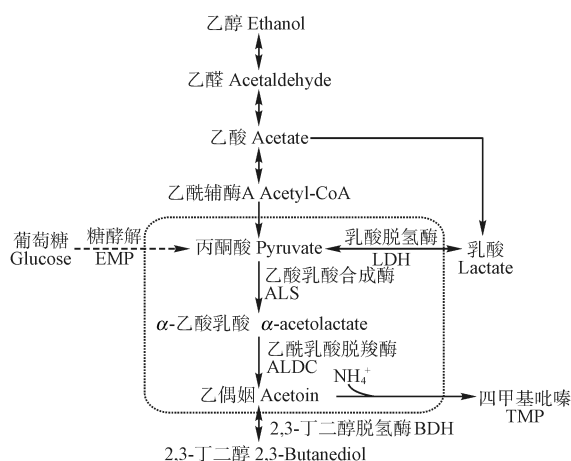


图1 醋醅中乙偶姻的微生物合成途径。ALS: 乙酰乳酸合成酶; ALDC: 乙酰乳酸脱羧酶; EMP: 糖酵解途径; LDH: 乳酸脱氢酶; BDH: 2,3-丁二醇脱氢酶; TMP: 川芎嗪。

Fig. 1 Biosynthesis pathway of acetoin in vinegar. ALS: Acetolactate synthase; ALDC: Acetolactate decarboxylase; EMP: Embden-Meyerhof-Parnas pathway; LDH: Lactate dehydrogenase; BDH: 2,3-Butanediol dehydrogenase; TMP: Tetramethylpyrazine.

1 材料与方法

1.1 实验材料

醋醅样品采自镇江香醋醋酸发酵池,在醋酸发酵阶段跟踪取样,每天在发酵池的中心位置取样并混匀后分装于塑封

袋中并于-80℃保存^[16]。

1.2 总DNA提取

1.2.1 醋醅总DNA提取 将第0-20天醋醅以等质量比例混合均匀,取5 g混合醋醅于陶瓷研钵中,加入适量液氮研磨3-4次至粉末状,后续使用DNA提取试剂盒PowerSoil DNA Isolation Kit (Mobio, 美国)进行提取^[17],具体操作见说明书。提取的醋醅总DNA于-20℃保存。

1.2.2 纯菌总DNA提取 取过夜纯培养细菌菌液,按照细菌基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)(捷瑞,中国)说明书提取后存于-20℃。

1.3 简并引物的设计与验证

1.3.1 简并引物的设计 从NCBI数据库中分别查找编码ALS、ALDC的氨基酸序列,使用Mega 6.05软件^[18]进行多序列比对,剔除高度相似序列后确定高度保守区域;采用CODEHOP (COnsensus-DEgenerate-Hybrid Oligonucleotide Primers)策略^[19],针对保守区域序列分别设计用于扩增ALS和ALDC编码片段的简并引物,将搜索结果中符合要求的各条引物保留,并根据实验要求选择合适的上下游引物进行初步PCR扩增,筛选出最佳上下游引物组合。

1.3.2 简并引物的验证^[20] 以44株从醋醅中分离获得的微生物菌株DNA为模板,分别采用简并引物als-f/r与aldc-f/r(表1)PCR扩增对应基因片段。PCR反应体系为:模板50 ng, dNTP Mix 2.0 μL, 10 × Ex Taq Buffer 2.5 μL, 上下游引物各1.0 μL, Ex Taq聚合酶0.2 μL, 双蒸水补足至25.0 μL。PCR扩增条件为:95℃预变性5 min; 95℃变性1 min, 56℃退火1 min, 72℃延伸90 s (aldc-f/r为40 s),共30个循环;72℃终延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测并于凝胶成像仪下拍照观察,将大小正确条带保留并回收送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 PCR扩增与克隆文库的构建

1.4.1 PCR扩增 以醋醅总DNA为模板,分别采用简并引物als-f/r与aldc-f/r PCR扩增对应基因片段。PCR反应体系与扩增条件同1.3.2。

1.4.2 PCR产物回收及克隆测序 PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,并用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(离心柱型)(捷瑞,中国)纯化回收,与pMD19-T载体16℃连接16 h,转化*Escherichia coli* JM109感受态细胞,挑取大量克隆子(>100个)过夜培养后,经菌落PCR验证,将阳性克隆子送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5 克隆文库分析

1.5.1 OTU聚类分析 OTU (Operational Taxonomic Units, 操作分类单元)是人为将序列按照相似度进行划分的分类单元。使用Mothur软件^[21]去除克隆文库中嵌合体序列,使用

表1 简并引物信息

Table 1 Degenerate primers information

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	简并度 Degeneracy	退火温度(θ/℃) Annealing temperature	扩增长度(bp) Product size
als-f	GGCATGAACAGAATGCCgbywyatggc	96	57	1100
als-r	CACATCTTTGCGGCTatnsccangg	32		
aldc-f	CAACACGGAGACTTCggnatnggnac	64	55	420
aldc-r	GTCTTCGCTTAGGAAGTGCmrrtgrwance	128		

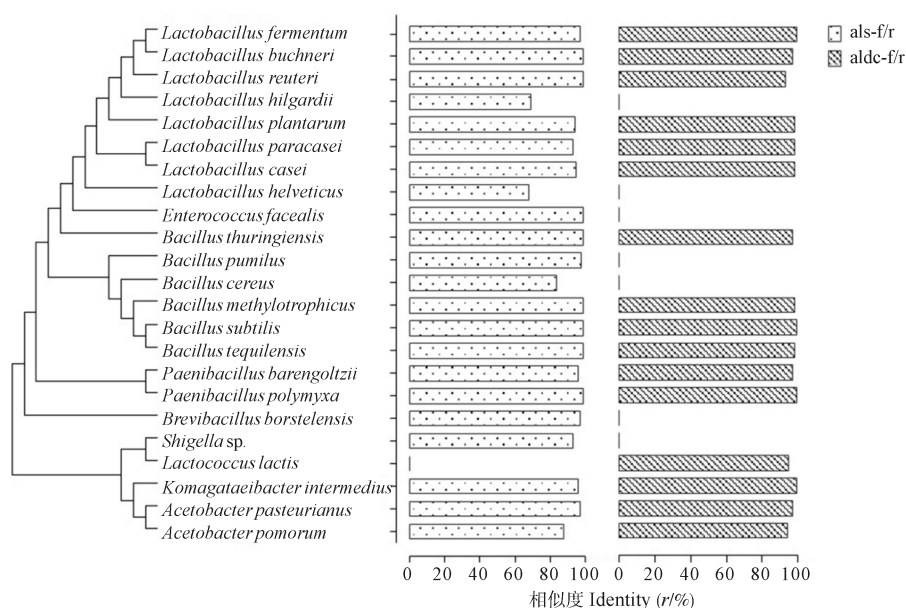


图2 简并引物验证结果。

Fig. 2 Validation of degenerate primers.

Mega 6.05去除各序列中载体及引物序列,统一序列方向;使用Mothur软件将克隆文库中所有有效序列进行多序列比对,剪切后使两端对齐,输出为fasta文件;使用Mothur软件对克隆文库进行OTU聚类分析。

1.5.2 多样性分析 采用覆盖率 (Coverage C)^[22]和稀缺曲线 (Rarefaction curve)^[21]评价所建克隆文库的多样性。覆盖率理论上表示克隆文库中所包含微生物种类占醋醅样品中含此基因的全部微生物种类的比例,计算公式为 $C = 1 - n_i/N$ (N 代表文库的克隆总数, n_i 代表该文库中仅有1个克隆的OTU的数量)。利用Mothur软件绘制稀缺曲线,以评估所见文库是否能较好反映环境微生物的多样性。

1.5.3 系统发育分析 在每个OTU中挑选一个代表序列,使用NCBI中BLAST功能 (<http://blast.be-md.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列比对^[23],将相似度最高的序列下载作为参比序列,使用Mega 6.05将参比序列与各OTU代表序列共同进行多序列比对并剪切至两端对齐,采用Neighbor-Joining法^[24]构建系统发育树,bootstrap值设为1 000以评估树的稳定性。

2 结果与分析

2.1 简并引物设计与验证结果

本研究从NCBI数据库中选取编码酶ALS的氨基酸序列26条,共来自*Lactobacillus*、*Streptococcus*、*Leuconostoc*、*Staphylococcus*、*Enterobacter*、*Lactococcus*、*Bacillus*、*Paenibacillus*等13个属,根据其保守区域设计引物als-f/r,目标序列长度1 100 bp左右;选取编码酶ALDC的氨基酸序列19条,共来自*Lactobacillus*、*Acetobacter*、*Streptococcus*、*Leuconostoc*、*Staphylococcus*、*Lactococcus*、*Bacillus*、*Paenibacillus*等11个属,根据其保守区域设计引物aldc-f/r,目标序列长度420 bp左右。

用于引物验证的菌株均筛选自醋醅,PCR产物测序后在

NCBI中进行BLAST比对,确认相似度较高的序列是否为编码该酶的基因,比对结果正确的菌株及相似度结果如图2所示。引物验证结果显示,两对引物均能正确扩增多个种属的目的片段,另外,未能正确扩增的种属经文献及数据库查证尚无该基因相关报道,由此可确定这两对引物特异性良好,适用于克隆文库的构建。

2.2 醋醅中PCR扩增结果

利用引物als-f/r与aldc-f/r对醋醅总DNA样品进行PCR扩增,结果显示分别在1 100 bp (图3A) 与420 bp (图3B) 左右有单一明亮的扩增条带,将此条带回收纯化后用于克隆文库的构建。

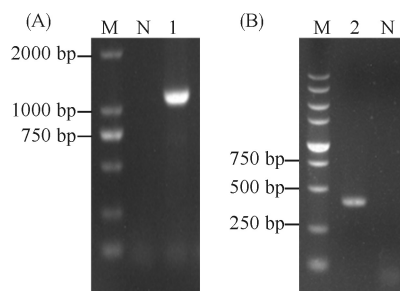


图3 醋醅中PCR扩增结果。M: DNA Marker; N: 空白对照; 1: 乙酰乳酸合成酶PCR产物; 2: 乙酰乳酸脱羧酶PCR产物。

Fig. 3 Analysis of PCR products using degenerate primers in vinegar *Pei*. M: DNA marker; N: Negative control; Lane 1: PCR product of acetolactate synthase using vinegar *Pei* total DNA as template; Lane 2: PCR product of acetolactate decarboxylase using vinegar *Pei* total DNA as template.

2.3 克隆文库多样性评价

计算克隆文库覆盖率并绘制稀缺曲线以评价所建克隆文库多样性。当cutoff值设为0.03时,ALS、ALDC文库的覆盖率 (Coverage C) 分别为98.73%、90.82%,说明ALS文库覆盖率已达到较高水平,而ALDC文库覆盖率略低,但仍高于

90%, 可用于后续分析。当cutoff值设为0.03时, ALS、ALDC文库的稀疏曲线如图4所示, 曲线代表了文库中包含不同克隆子数目时可划分的OTU数目变化, 从图中可知, 随着克隆子数目的增加, OTU数目趋向平稳, 即增幅逐渐变小, 表明库中克隆子可基本涵盖醋醅环境中含有此基因片段的大多数的细菌类群。

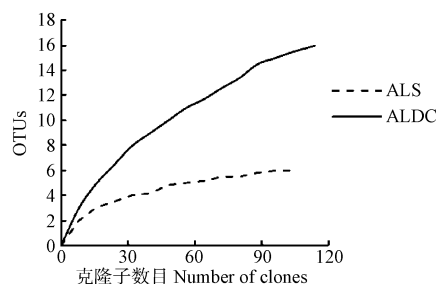


图4 克隆文库稀疏曲线。ALS: 乙酰乳酸合成酶文库; ALDC: 乙酰乳酸脱羧酶文库; OTU: 操作分类单元。

Fig. 4 Rarefaction curves of two clone libraries. ALS: Clone library of acetolactate synthase; ALDC: Clone library of acetolactate decarboxylase; OTU: Operational Taxonomic Units.

2.4 克隆文库OTU聚类及系统发育分析

ALS克隆文库共获得108条序列, 其与NCBI中已报道的ALS编码序列相似度在67%-98%之间, 分别属于5个不同的种, 聚类分析后可划分为6个OTU, 每个OTU选出一个代表序列与其参比序列进行系统发育分析, 结果见图5A。丰度最高的OTU1序列占总克隆子数目的65.74%, 但其与参比序列*L. buchneri* (CP002652.1, CP003043.1)的相似度仅有67%-69%; OTU2序列占比19.44%, 与参比序列*A. pasteurianus* (HF677570.1)相似度达97%; OTU3序列占比10.19%, 与参比序列*L. reuteri* (CP002844.1)相似度仅73%; OTU4序列占比1.85%, 与参比序列*A. pasteurianus* (HF677570.1)相似度达94%, 略低于OTU2; OTU6序列占比0.93%, 与参比序列*L. brevis* (CP005977.1)相似度仅75%, 与OTU1序列相似度较高, 故在图5A中OTU1与OTU6聚类在同一分支。聚类分析结果说明*L. buchneri*是ALS文库的最优势种群, *Lactobacillus*属是最优势属, 且种间多样性较丰富; *A. pasteurianus*为相对弱势种群, 且多样性较弱。

ALDC克隆文库共获得114条序列, 其与NCBI中已报道的ALDC编码序列相似度在68%-98%之间, 分别属于2个不同的种, 但聚类分析后可划分为16个OTU, 每个OTU选出一个代表序列与其参比序列进行系统发育分析, 结果见图5B。在16个OTU中, 10个OTU的参比序列均为*A. pasteurianus* 386B (HF677570.1), 2个OTU的参比序列均为*A. pasteurianus* IFO 3283-12 (AP011170.1), 但相似度在68%-98%之间, *Acetobacter*属总占比91.23%, 处绝对优势; 另外, OTU5 (5.26%)、OTU12 (0.88%)、OTU14 (0.88%)的参比序列为*L. fermentum* F-6 (CP005958.1), 与其相似度96%、77%、77%; OTU6 (1.75%)的参比序列为*L. fermentum* IFO 3956 (AP008937.1), 与其相似度为97%。聚类分析结果说明*A. pasteurianus*是ALDC文库的最优势种群, 且多样性丰富。

3 讨论与结论

镇江香醋酿造过程中风味物质的形成与微生物群落结构的变化密切相关^[16], 国外围绕乳制品^[25]、土壤^[26]、奶酪^[27]、肠道^[28]等环境中物质代谢与微生物群落具体关系已展开大量研究, 如Reichardt N等(2014)通过定位关键基因并构建克隆文库明确了肠道中丙酮酸合成的主要微生物^[20]。然而, 国内外对中国传统酿造食醋中两者具体关系尚未有研究报道。本研究从乙偶姻入手, 首次将传统酿造食醋中风味物质与微生物群落结构关联起来。

为了使克隆文库能最大限度还原醋醅原位情况, 本研究采用CODEHOP策略设计简并引物, 验证结果(图2)显示两对引物均能扩增出多个种属的正确基因片段, 特异性及简并性较好。利用简并引物所构建的克隆文库分析结果显示(图5), *L. buchneri*是ALS文库中丰度最高的微生物, 预示其可能在丙酮酸到乙酰乳酸的合成过程中起到重要作用, 其他微生物包括*A. pasteurianus*、*L. casei*、*L. reuteri*、*L. brevis*; *A. pasteurianus*是ALDC文库中丰度最高的微生物, 且种内基因多样性丰富, 预示其可能在乙酰乳酸到乙偶姻的合成过程中起到重要作用。另外, 许伟等利用PCR-DGGE、qPCR及克隆文库等技术手段证明, 醋酸发酵过程中细菌以*Lactobacillus*、*Acetobacter*、*Gluconacetobacter*为主, 另有少量的*Staphylococcus*、*Enterobacter*、*Pseudomonas*、*Flavobacterium*和*Sinorhizobium*^[11-12]。综合此结论及本研究两个基因的克隆文库结果可以推测, 醋醅中丙酮酸到乙偶姻的合成代谢主要是由*Acetobacter*及*Lactobacillus*共同完成, 两类微生物之间ALS和ALDC的基因功能互补可能达到了合成乙偶姻的目的。

本文中所构建的ALS克隆文库和ALDC克隆文库所用的醋醅样品为整个发酵过程样品的混合物, 未考虑发酵不同阶段微生物群落结构会产生变化的情况, 因此文库分析的结果可能随发酵时间不同而产生明显变化。另外, 本研究仅针对醋醅微生物宏基因组进行克隆文库分析, 基因多样性分析结果仅能反映微生物群落的基因组水平情况, 而并未考虑基因的转录表达情况, 进一步研究可采用转录组学、蛋白质组学的分析手段进行完善。

本文通过克隆文库分析的方法, 发现了*Acetobacter*和*Lactobacillus*中多种微生物可能共同参与了镇江香醋醋醅中丙酮酸合成乙偶姻的过程, 其中*L. buchneri*、*A. pasteurianus*、*L. reuteri*、*L. casei*、*L. brevis*可能是ALS的主要贡献者, 而ALDC的来源可能主要为*A. pasteurianus*。本研究可为解析多菌种醋酸发酵过程中乙偶姻微生物合成机理奠定研究基础。

参考文献 [References]

- Xu W, Huang ZY, Zhang XJ, Li Q, Lu ZM, Shi JS, Xu ZH. Monitoring the microbial community during solid-state acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar [J]. *Food Microbiol*, 2011, **28** (6): 1175-1181
- 许伟, 张晓君, 许泓瑜, 许正宏, 赵立平. 镇江香醋醋酸发酵过程中细菌群落组成分析[J]. *微生物学通报*, 2007, **34** (4): 646-649 [Xu W, Zhang XJ, Xu HY, Xu ZH, Zhao LP. Analysis of bacterial communities in aerobic solid-fermentation culture of Zhenjiang Hengshun vinegar [J]. *Microbiol Chin*, 2007, **34** (4): 646-649]
- Li S, Li P, Feng F, Luo LX. Microbial diversity and their roles in the

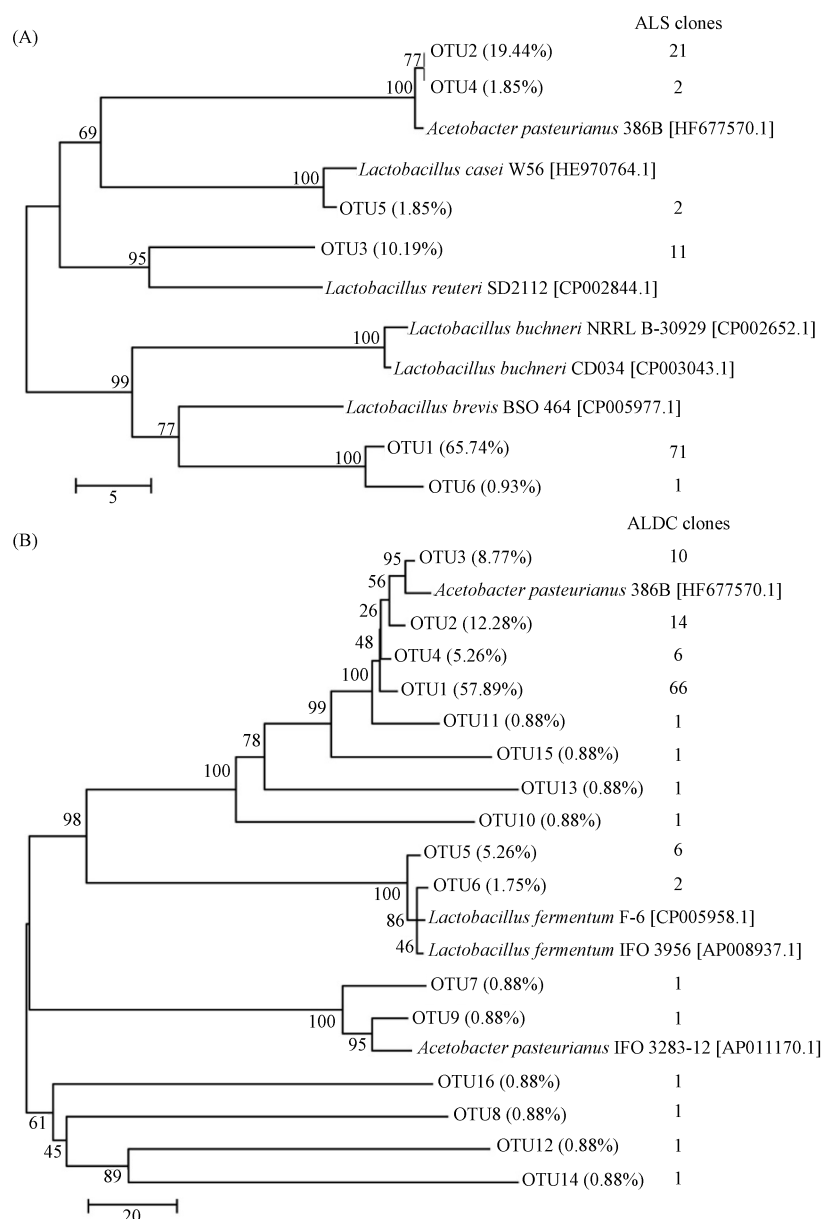


图5 克隆文库OTU聚类及系统发育分析结果. ALS: 乙酰乳酸合成酶; ALDC: 乙酰乳酸脱羧酶.

Fig. 5 The phylogenetic trees and OTU analysis of two clone libraries. ALS: Acetolactate synthase; ALDC: Acetolactate decarboxylase.

- vinegar fermentation process [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, **99** (12): 1-28
- 贺铮怡, 敖宗华, 吴珏, 李国权, 陶文沂. 镇江香醋中川芎嗪的测定及生成机理的研究[J]. *中国调味品*, 2004 (2): 36-39 [He ZY, Ao ZH, Wu J, Li GQ, Tao WY. Study on the mensuration of tetramethylpyrazine in Zhenjiang vinegar and its generant mechanism [J]. *Chin Condiment*, 2004 (2): 36-39]
 - Fushimi T, Tayama K, Fukaya M, Kitakoshi K, Nakai N, Tsukamoto Y, Sato Y. Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats [J]. *J Nutr*, 2001, **131** (7): 1973-1977
 - Kondo S, Tayama K, Tsukamoto Y. Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, **65** (12): 2690-2694
 - Xu QP, Tao WY, Ao ZH. Antioxidant activity of vinegar melanoidins [J]. *Food Chem*, 2007, **102** (3): 841-849
 - Xu W, Xu QP, Chen JH, Lu ZM, Xia R, Li GQ, Xu ZH, Ma YH. Ligustrazine formation in Zhenjiang aromatic vinegar: changes during fermentation and storing process [J]. *J Sci Food Agric*, 2011, **91** (9): 1612-1617
 - Shu CK. Pyrazine formation from amino acids and reducing sugars, a pathway other than strecker degradation [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, **46** (4): 1515-1517
 - Zhu BF, Xu Y. A feeding strategy for tetramethylpyrazine production by *Bacillus subtilis* based on the stimulating effect of ammonium phosphate [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010, **33** (8): 953-959
 - Xiao ZJ, Hou XY, Lyu X, Xi LJ, Zhao JY. Accelerated green process of tetramethylpyrazine production from glucose and diammonium phosphate [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2014, **7** (1): 1-8

- 12 Li SB, Liu LM, Chen J. Compartmentalizing metabolic pathway in *Candida glabrata* for acetoin production [J]. *Metab Eng*, 2015, **28**: 1-7
- 13 Zhang X, Zhang RZ, Bao T, Rao ZM, Yang TW, Xu MJ, Xu ZH, Li HZ, Yang ST. The rebalanced pathway significantly enhances acetoin production by disruption of acetoin reductase gene and moderate-expression of a new water-forming NADH oxidase in *Bacillus subtilis* [J]. *Metab Eng*, 2014, **23** (2): 34-41
- 14 Xiao ZJ, Lu JR. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: a review [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, **32** (2): 492-503
- 15 李树波, 高翔, 刘立明, 陈坚. 微生物生产3-羟基丁酮研究进展[J]. 生物加工过程, 2011, **9** (6): 63-68 [Li SB, Gao X, Liu LM, Chen J. Progress in microbial production of 3-hydroxybutanone [J]. *Chin J Bioproc Eng*, 2011, **9** (6): 63-68
- 16 Wang ZM, Lu ZM, Yu YJ, Li GQ, Shi JS, Xu ZH. Batch-to-batch uniformity of bacterial community succession and flavor formation in the fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar [J]. *Food Microbiol*, 2015, **50**: 64-69
- 17 Santos SS, Nielsen TK, Hansen LH, Winding A. Comparison of three DNA extraction methods for recovery of soil protist DNA [J]. *J Microbiol Methods*, 2015, **115**: 13-19
- 18 Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, **30** (4): 2725-2729
- 19 Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31** (13): 3763-3766
- 20 Reichardt N, Duncan SH, Young P, Belenguer A, McWilliam Leitch C, Scott KP, Flint HJ, Louis P. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota [J]. *ISME J*, 2014, **8** (6): 1323-1335
- 21 Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75** (23): 7537-7541
- 22 Xia BC, Treves DS, Zhou JZ, Tiedje JM. Soil microbial community diversity and driving mechanisms [J]. *Progr Nat Sci*, 2001, **11** (11): 20-26
- 23 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (8): 3389-3402
- 24 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, **4** (6): 406-425
- 25 McInnis EA, Kalanetra KM, Mills DA, Maga EA. Analysis of raw goat milk microbiota: Impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity [J]. *Food Microbiol*, 2015, **46** (46): 121-131
- 26 Sanford RA, Wagner DD, Wu QZ, Chee-Sanford JC, Thomas SH, Cruz-Garcia C, Rodriguez G, Massol-Deya A, Krishnani KK, Ritalahti KM, Nissen S, Konstantinidis KT, Löffler FE. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109** (48): 19709-19714
- 27 Wolfe BE, Dutton RJ. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems [J]. *Cell*, 2015, **161** (1): 49-55
- 28 Walker AW, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota [J]. *Trends Microbiol*, 2014, **22** (5): 267-274