餐厨垃圾乳酸发酵过程中的微生物多样性分析

刘建国[1], 汪群慧[1*], 王爽[1], 孙晓红[2], 仇天雷[2], 李焕[1]
(1. 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083; 2. 北京市农林科学院农业生物技术研究中心, 北京 100089)

摘要: 采用PCR-DGGE等分析手段, 研究了餐厨垃圾乳酸发酵过程中的微生物种群动态变化. 结果表明, 餐厨垃圾不灭菌而接种的开放式发酵体系中微生物的多样性高于灭菌后接种的非开放式发酵体系, 而乳酸产量也是前者高于后者. 说明发酵体系中的微生物多样性与乳酸产量有很大的相关性. 通过对部分条带的测序可知, 餐厨垃圾开放式发酵体系中除含有接种用的嗜淀粉乳杆菌外, 还含有很多土著乳酸菌, 如 *Lactobacillus* sp. 、*Lactobacillus casei* 和 *Lactobacillus plantarum*, 以及土著水解菌, 如假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)等, 这些土著菌的存在是促进乳酸发酵的重要因素. PCR-DGGE结合技术对于成分复杂的餐厨垃圾中的细菌种群结构的动态变化分析是可行的.

关键词: 餐厨垃圾; 乳酸发酵; 微生物多样性分析; 嗜淀粉乳杆菌; PCR-DGGE
中图分类号: X172; X705 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2012)09-3236-05

Analysis of Microbial Community Structure in Lactic Acid Fermentation from Kitchen Waste

LIU Jian-guo[1], WANG Qun-hui[1], WANG Shuang[1], SUN Xiao-hong[2], QIU Tian-lei[2], LI Huan[1]
(1. School of Civil and Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China; 2. Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract: In this study, PCR-DGGE was used to analyze the microbial community structure in lactic acid fermentation from kitchen waste. The results showed that with *Lactobacillus amylophilus* inoculation, both the microbial diversity and lactic acid production in the open fermentation system were higher than those in the sterilized fermentation system. These results indicated that the microbial diversity and the lactic acid production have great correlation in the kitchen waste fermentation system. Through analyzing the sequence of some DNA bands excised from the DGGE gel, it showed that in addition to the inoculation of *Lactobacillus amylophilus* there were some indigenous lactic acid bacteria, such as *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and indigenous hydrolytic bacteria, such as *Pseudomonas* sp.. These indigenous bacteria can help to promote lactic acid production. PCR-DGGE is feasible for analyzing the dynamic changes of microbial community structure in kitchen waste with complicated composition.

Key words: kitchen waste; lactic acid fermentation; microbial diversity analysis; *Lactobacillus amylophilus*; PCR-DGGE

餐厨垃圾含有丰富的营养成分, 利用其发酵生产乳酸是实现资源化的有效途径之一[1,2]. 乳酸作为一种重要的有机酸, 广泛应用于食品、化工等多种领域, 聚乳酸类可生物降解塑料的开发使"白色污染"的问题得到减轻[3], 更显示出乳酸在包装材料等方面的巨大潜力. 本课题组前期已对餐厨垃圾乳酸发酵过程的工艺优化做了深入的研究, 发现底物不灭菌时乳酸产率更高[4], 采用基质不灭菌的开放式发酵, 接种自行筛选的解淀粉乳酸细菌, 比不接种发酵的乳酸浓度高19.2%[5]. 推测可能灭菌杀死了垃圾中大部分微生物, 而开放式发酵中由于垃圾存在各种代谢类型的微生物, 可降解蛋白质、纤维素等大分子, 提高了乳酸菌可利用的小分子化合物的含量, 从而使乳酸产量增加[6]. 但是, 目前对于开放式发酵提高乳酸产量的机制只有简单的推测, 缺乏足够的理论依据.

变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术由Muyzer等[7]于1979年最先提出, 用来检测DNA片段中的点突变, 1993年Muzyer等[8]首次将DGGE技术应用于微生物生态学研究. 近年来, PCR-DGGE技术在微生物群落多样性和种群动态监测中得到了广泛应用, 如用于活性污泥、土壤、底泥等环境样品中的微生物多样性检测. 傅以钢等[9]用DGGE指纹图谱技术对污泥堆肥工艺的细菌种群动态变化进行了研究, 张春林[10]运用DGGE分析了内蒙古发酵酸粥中的微生物多样性, 但关于餐厨垃圾的乳酸发酵过程的PCR-DGGE的研究分析未见报道.

本研究运用PCR-DGGE方法研究餐厨垃圾不同发酵条件下的微生物种群变化, 以阐明主要微生

收稿日期: 2011-11-14; **修订日期:** 2012-02-16
基金项目: 国家自然科学基金项目(50978028); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20090010)
作者简介: 刘建国(1980~), 男, 博士, 主要研究方向为固体废弃物, E-mail: jgliu_yxc@163.com
* **通讯联系人**, E-mail: wangqh59@sina.com

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物种群间的相互竞争、协同的动态关系,解释餐厨垃圾不灭菌的开放式发酵产乳酸量高的生物学机制,丰富乳酸发酵理论,以期为餐厨垃圾回收再利用的发酵过程提供更多的信息.

1　材料与方法

1.1　实验材料

餐厨垃圾取自北京科技大学学生食堂,挑去大块杂质后经绞碎保存于 -20℃冰箱待用. 由于餐厨垃圾中淀粉含量相对较高(约 50%),为了获得较好的发酵结果,实验所用菌种为嗜淀粉乳杆菌,购买于中国普通微生物菌种保藏管理中心.

1.2　乳酸发酵方法

不灭菌而接种的开放式发酵: 按固液比 1∶2(餐厨垃圾/水,$g \cdot mL^{-1}$) 配制成培养基,按 0.2 g(菌体湿重) /100 mL(餐厨垃圾培养基) 接入嗜淀粉乳杆菌,通入高纯氮气生成厌氧环境,密封后 35℃下发酵,每隔 24 h 取样,经离心机(eppendorf centrifuge, 5417C) 固液分离后的上清液再经 0.45 μm 膜过滤后用高效液相色谱仪(日本岛津公司,LC-20AT) 分析乳酸浓度; 而离心后的固相样品用作微生物的群落分析.

灭菌后接种的非开放式发酵: 将餐厨垃圾用灭菌锅(HV50,Hirayama,Japan) 在 120℃高温灭菌 20 min 后再接嗜淀粉乳杆菌,在上述同样条件下进行发酵、取样和分析.

既不灭菌也不接种的开放式发酵: 作为对照,餐厨垃圾既不灭菌也不接种嗜淀粉乳杆菌,在上述同样条件下进行发酵、取样和分析.

1.3　乳酸测定方法

采用日本岛津公司高效液相色谱仪 LC-20AT,检测器为 UV-VIS 检测器: SPD(紫外分光检测) -20A; 色谱柱: Inertsil ODS-SP (5μm 4.6 mm × 250 mm),保护柱: Inertsil ODS-SP 5 μm; 超纯水(pH 用磷酸调至 2.5 ~ 3.0) 作为流动相; 流速为 0.8 $mL \cdot min^{-1}$; 柱温为室温; 进样量为 5 μL; 二极管阵列检验波长为 210 nm.

利用超纯水作为流动相,使用前将超纯水的 pH 值用磷酸调到 2.5 ~ 3.0. 将流动相溶液用 0.45 μm 孔径的微孔滤膜过滤,再经超声波脱气. 洗液的使用及配制,在使用柱子前先利用色谱纯甲醇清洗系统 0.5 ~ 1 h,然后利用甲醇和超纯水(体积比 15∶85) 的混合液洗脱柱子再次冲平基线,最后换成超纯水流动相.

1.4　微生物多样性分析方法

(1) 基因组 DNA 的提取和纯化

DNA 的提取采用 Zhou 等[11] 提出的蛋白酶 K-CTAB 法,粗提后的 DNA 溶液采取 Promega 公司的 Wizard 少量 DNA 纯化系统对总 DNA 进行纯化. 取粗提及纯化后的 DNA 溶液 5 μL 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测.

(2) 基因组 DNA 的 PCR 扩增

采用对大多数细菌的 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物[12] 对 F338-GC (CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG) 和 R518(ATTACCGCGGCTGCTGG) 对纯化后的 DNA 进行 PCR 扩增(EDC-810,北京东胜创新生物科技有限公司). PCR 反应体系: 1 μL 模板,4 μL dNTP 混合溶液(终浓度为 1 $pmol \cdot \mu L^{-1}$),引物(10 $mmol \cdot L^{-1}$) 各 1 μL, 10 × PCR 反应缓冲液(已加 $MgCl_2$) 5 μL,*Taq* DNA 聚合酶 1 μL,加无菌 Milli-Q 水补足至 50 μL. PCR 反应扩增条件为: 94℃预变性 3 min; 接下来是 94℃变性 60 s,57℃退火 90 s,72℃延伸 90 s,30 个循环; 72℃延伸 10 min. PCR 扩增结束,使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测.

(3) PCR 产物变性梯度凝胶电泳(DGGE) 分析

PCR 扩增结束,采用变性梯度凝胶电泳系统(DCode™ Universal Detection System,Bio-Rad,USA) 对 PCR 产物进行基因突变检测. 本实验的电泳条件为凝胶变性梯度 30% ~60%,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%,电泳温度 60℃,电泳电压 100 V,电泳时间 6 h. 电泳结束后,将凝胶进行银染,用凝胶成像分析系统(Gel Doc 2000,Bio-Rad,USA) 观察凝胶上的条带并拍照. 使用 Quantity One 对 DGGE 图谱进行自动优化处理,去除背景噪音,分析得到样品的相似性矩阵.

(4) 目的条带测序

从 DGGE 图谱中选取目的条带进行切割回收. 回收的条带转移到 1.5 mL 离心管中,用枪头挤碎,加入 30 μL TE 缓冲液,4℃浸泡过夜,反复冻融 1 到 3 次,取 1 μL 为模板重新进行 PCR 扩增,用 DGGE 检查回收条带的纯度和分离状况. 重复上述步骤,直到 DGGE 鉴定为单一条带后,取 20 μL PCR 扩增产物送交测序,获得不同的 16S rDNA 序列,将测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析,找到最相似菌株,获得各条序列的同源性信息.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2 结果与讨论

2.1 发酵过程中乳酸浓度变化

按 1.2 节所述的乳酸发酵方法，分别进行了餐厨垃圾不灭菌而接种嗜淀粉乳杆菌的开放式发酵、餐厨垃圾灭菌后接种嗜淀粉乳杆菌的非开放式发酵和既不灭菌也不接种的开放式发酵. 3 种发酵过程的乳酸浓度变化如图 1 所示.

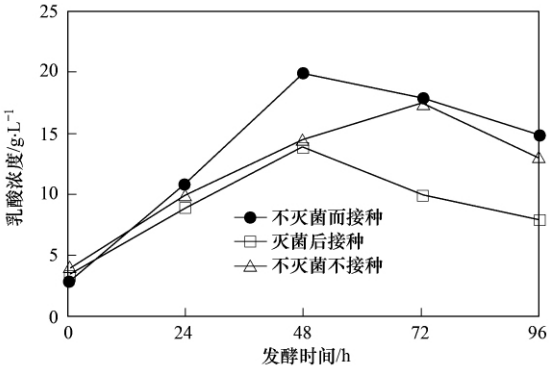


图 1 3 种条件下的乳酸浓度随发酵时间变化

Fig. 1 Time courses of lactic acid production under different fermentation conditions

由图 1 可知，餐厨垃圾不灭菌而接种的开放式发酵所产乳酸的速率大于其他 2 种，且获得最高乳酸产量的顺序为: 不灭菌而接种 > 不灭菌不接种 > 灭菌后接种.

不灭菌体系的产乳酸量高于灭菌体系可能是因为乳酸发酵存在水解、糖化、乳酸化阶段，水解阶段需要水解菌(或水解酶) ，废物中如存在能分泌糖化酶的细菌，也可促进糖化，不灭菌体系的餐厨垃圾中本身含有大量的土著菌，它们可分解出许多水解酶和糖化酶等胞外酶，这些酶可将餐厨垃圾中的淀粉、蛋白质等大分子物质逐级水解、糖化为乳酸菌可以利用的糖、氨基酸(作为氮源) 等小分子物质，进而促进了乳酸的产生. 而餐厨垃圾经蒸汽灭菌后，其中大部分的土著菌群被高温蒸汽杀死，乳酸的产生主要依靠外加嗜淀粉乳杆菌的作用，部分原料不能转化为乳酸菌可利用的物质，因此最终其乳酸的产量不如开放式发酵的乳酸产量高.

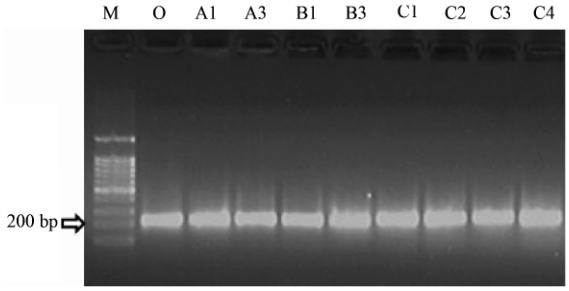
既不灭菌也不接种的对照实验中，即使没有外加嗜淀粉乳杆菌，餐厨垃圾利用自身的土著菌群也产生了较多的乳酸，这意味着土著菌中也存在较多的土著乳酸菌. 由此可推测，不灭菌的开放式发酵体系的微生物多样性应该高于灭菌的非开放式发酵体系，为了证实这一点，对 3 种发酵过程进行了下述的微生物群落分析.

2.2 发酵样品基因组 DNA 的提取与纯化

取餐厨垃圾部分发酵样品进行 PCR-DGGE 的分析. 首先采用蛋白酶 K-CTAB 法对基因组总 DNA 进行提取，提取后的样品中含有较多的腐殖酸等其它杂质，不能直接进行 PCR 等后续实验操作. 使用 Wizard DNA Clean-Up System 对粗提 DNA 进行纯化，纯化后所得 DNA 条带亮度明显，说明用文中所述的 DNA 提取方法可以顺利地从发酵样品中提取出总 DNA 片段，没有导致严重的 DNA 断裂. 纯化后提高了总 DNA 的纯度与浓度，有利于后续的 PCR 扩增.

2.3 发酵样品的 PCR 扩增结果

以细菌 16S rDNA V3 序列的通用引物 F338-GC 和 R518 对纯化后的发酵样品 DNA 进行 PCR 扩增反应. PCR 扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳后用 EtBr 染色，紫外灯下经凝胶成像系统检测拍照，PCR 扩增结果如图 2 所示.



O 代表餐厨垃圾初始样品(即发酵 0 h) ; A1、A3 代表灭菌后接种发酵第 1 d 和第 3 d 样品; B1、B3 代表不灭菌不接种发酵的第 1 d 和第 3 d 样品; C1、C2、C3、C4 代表不灭菌而接种发酵的第 1 ~ 4 d 的样品，下同

图 2 发酵样品的 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 2 PCR electrophoresis image of samples

图 2 中的片段长度约为 200 bp，条带单一，亮度明显，表明获得了高产量和高特异性的 PCR 产物，均可作为变性梯度凝胶电泳(DGGE) 的样品.

2.4 发酵样品的细菌种群 DGGE 指纹图谱结果与多样性分析

餐厨垃圾糖化发酵的样品 PCR 扩增产物经 DGGE 分离出数目、强度和迁移位置都不同的条带(见图 3) ，这些不同位置的条带代表着不同的细菌种群，同时也可以看出细菌的种类和数目在发酵过程中的演替规律. 由 DGGE 图谱(图 3) 可以看出，不同发酵条件下餐厨垃圾样品中的细菌 16S rDNA 序列使用 PCR-DGGE 分析得到了比较好的分离，条带位置清晰，亮度明显. 不灭菌的开放式发酵后试

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

样(无论接种与否)的微生物多样性明显高于灭菌的非开放式发酵后试样. 这 2 种不灭菌的开放式发酵中,条带 a、b、c、d 几乎存在于整个发酵过程,说明这些条带所代表的细菌为土著菌,具有广泛的适应性. 而接种比未接种的发酵试样中增加了条带 e,条带 e 的强度没有随着发酵时间而增强. 但这些条带哪个代表土著乳酸菌、哪个代表接种的嗜淀粉乳杆菌,哪个代表其他菌种需要在下述目的条带测序结果中证实.

由图 3 还可知,灭菌后餐厨垃圾中的微生物多样性明显低于灭菌前的试样. 餐厨垃圾初始试样中存在很多土著菌,但经过高温蒸汽灭菌后,其中的菌群数量大为减少,接种嗜淀粉乳杆菌后,随着发酵的不断进行,条带 e 在发酵第 1d 时亮度增加较为明显,之后保持稳定.

同时,利用 Quantity One 软件对电泳图谱进行了泳道和条带的识别后,通过系统运算得出各个样品的相似性矩阵,见表 1.

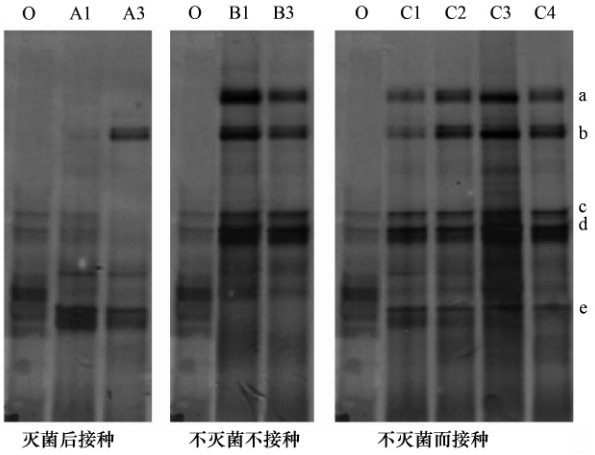


图 3　发酵样品的 DGGE 电泳图谱

Fig. 3　DGGE electrophoresis image of samples

表 1　发酵样品相似性分析结果

Table 1　Similarity analysis result of samples

	O	A1	A3	B1	B3	C1	C2	C3	C4
O	100.0								
A1	12.8	100.0							
A3	15.3	47.6	100.0						
B1	29.8	15.8	18.5	100.0					
B3	33.4	17.2	20.2	87.9	100.0				
C1	27.9	33.5	30.7	54.4	62.9	100.0			
C2	22.1	30.4	28.1	74.3	85.6	70.8	100.0		
C3	30.4	26.0	32.9	84.0	76.1	54.9	70.4	100.0	
C4	22.0	26.1	35.5	84.8	80.8	66.0	88.3	73.9	100.0

由表 1 知,最低相似度为 12.8%(样品 O 和样品 A1),即灭菌后接种发酵 1 d 后的样品与餐厨垃圾初始样品的种群结构相似性较低,同时可以看到灭菌后接种发酵的样品(样品 A)与其他的样品(样品 B 和样品 C)的相似度均较低,说明灭菌杀死了环境中大部分的微生物,使得其与开放式发酵(无论是否添加乳酸菌)样品的种群结构相差很大. 另外,样品 B 与样品 C 之间的相似度均比较高(如 B1 和 C3 的相似度为 84%),可知在开放式发酵过程中,添加嗜淀粉乳杆菌并没有使样品的种群结构发生大的变化.

2.5　目的条带的测序分析

选取 DGGE 图谱(图 3)中的部分条带,经切胶回收、PCR 重扩增和 DGGE 鉴定为单一条带后,取 20 μL PCR 扩增产物送交北京博迈德科技发展有限公司测序,一共获得 5 条不同的 16S rDNA 序列,将 5 条序列与数据库中的序列进行比对,获得各条序列的同源性信息,见表 2.

表 2　发酵样品 5 个条带的序列比对结果

Table 2　Sequence comparison result of 5 bands

条带编号	比对序列		同源性/%
	序列号	种属	
a	HQ697623	*Lactobacillus plantarum*	98
b	JF286632	Uncultured bacterium	100
c	JF767386	*Pseudomonas* sp.	98
d	HQ697665	*Lactobacillus casei*	90
e	JF811579	*Lactobacillus* sp.	100

从表 2 中可以发现,DGGE 切胶测序的 5 个条带均可以在 GenBank 中找到与其序列同源性较高(>90%)的种群. 其中条带 b 为未培养的菌种,条带 a、d 都属于乳酸菌属,它们同 *Lactobacillus plantarum* 和 *Lactobacillus casei* 的同源性分别达到了 98% 和 90%,研究表明有些乳酸菌可产生淀粉酶,如 Narita 等[13] 发现 *Lactobacillus casei* 能够产生 α-淀粉酶,故此类乳酸菌可直接利用淀粉生成乳酸; 条带 c 与假单胞菌属 *Pseudomonas* sp. 的同源性达到了 98%,假单胞菌广泛存在于土壤、水、污物及空

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

气中,以多种有机物为碳源和能源,有的可产生多种胞外酶,在其作用下可水解餐厨垃圾,因而多具有分解蛋白质、脂肪和淀粉的能力,水解产生的小分子物质可供给乳酸菌利用,进而促进了乳酸的产生. 如张志强[14] 从海洋沉积物中分离出 1 株高产淀粉酶的假单胞菌. 条带 e 与乳酸杆菌 *Lactobacillus* sp. 的同源性高达 100%,由 DGGE 图谱(图 4)可以看到不灭菌不接种中并没有出现条带 e,因此推测它有可能是本实验所添加的嗜淀粉乳杆菌,该菌在发酵初期起到了加速乳酸发酵的作用,但随着发酵不断进行并没有逐渐增强成为优势菌种,可能该菌种并不太适应餐厨垃圾这样复杂的底物,而餐厨垃圾自身存在的土著乳酸菌(条带 a、d)适应性强,其数量无衰减趋势. 这也说明了本课题组以往在开放式发酵中接种与不接种乳酸菌对产酸量影响不大的原因.

3 结论

(1) PCR-DGGE 分析的结果表明餐厨垃圾不灭菌而接种的开放式发酵体系中微生物多样性高于灭菌后接种的非开放式发酵体系,而乳酸产量也是前者高于后者. 说明发酵体系中的微生物多样性与乳酸产量有一定的相关性.

(2) 通过对部分条带的测序可知,餐厨垃圾开放式发酵体系中除含有接种用的嗜淀粉乳杆菌外,还含有很多土著乳酸菌,如 *Lactobacillus* sp. 、*Lactobacillus casei* 和 *Lactobacillus plantarum*,以及土著水解菌,如假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)等,这些土著菌的存在是促进乳酸发酵的重要因素.

(3) 接种用的嗜淀粉乳杆菌无论在开放式还是非开放式发酵,都可在一定程度上提高乳酸产量,但在发酵过程中,代表嗜淀粉乳杆菌的条带 e 并没有增强的趋势,可能该菌种不太适应餐厨垃圾这样复杂的底物,而餐厨垃圾自身存在的土著乳酸菌适应性强,其数量无衰减趋势. 因此,为节省生产成本,可不接乳酸菌种,或从餐厨垃圾中筛选出更优势的乳酸菌,经过驯化、培养后接种发酵,以显著提高乳酸产量.

(4) PCR-DGGE 结合技术对于成分复杂的餐厨垃圾中的细菌种群结构的动态变化分析是可行的. PCR-DGGE 可以帮助全面和深刻地理解餐厨垃圾发酵过程的微生物变化规律,为优化控制发酵过程提供理论基础.

参考文献:

[1] Wang X M, Wang Q H, Ren N Q, *et al*. Lactic acid production from kitchen waste with a newly characterized strain of Lactobacillus plantarum [J]. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2005, **19**(4): 383-389.

[2] Wang Q H, Wang X M, Wang X Q, *et al*. Bioconversion of kitchen garbage to lactic acid by two wild strains of Lactobacillus species [J]. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2005, **40**(10): 1951-1962.

[3] Wang Q H, Xu Z, Meng L H, *et al*. Influence of temperature on production of lactic acid from kitchen garbage [J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2003, **10**(2): 195-199.

[4] 王孝强, 汪群慧, 王旭明, 等. 餐厨垃圾发酵生产乳酸的工艺优化 [J]. 哈尔滨工业大学学报, 2009, **41**(10): 58-63.

[5] 王旭明, 汪群慧, 任南琪, 等. 解淀粉乳酸细菌在厨余垃圾乳酸发酵中的应用 [J]. 环境科学, 2006, **27**(4): 800-804.

[6] 王旭明, 汪群慧, 刘建丽, 等. 高产乳酸细菌发酵厨余垃圾生产乳酸的试验研究 [J]. 现代化工, 2005, **25**(S1): 148-150.

[7] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1998, **73**(1): 127-141.

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

[9] 傅以钢, 王峰, 何培松, 等. DGGE 污泥堆肥工艺微生物种群结构分析 [J]. 中国环境科学, 2005, **25**(S1): 98-101.

[10] 张春林. 内蒙古传统发酵酸粥中微生物多样性分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.

[11] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**(2): 316-322.

[12] 刘灿, 生吉萍, 申琳. 变性梯度凝胶电泳技术及其在食品微生物研究中的应用 [J]. 食品科学, 2009, **30**(11): 266-271.

[13] Narita J, Okano K, Kitao T, *et al*. Display of α-amylase on the surface of Lactobacillus casei cells by use of the PgsA anchor protein, and production of lactic acid from starch [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(1): 269-275.

[14] 张志强. 海洋假单胞菌 C40 产淀粉酶的发酵生产、分离纯化及性质研究 [D]. 青岛: 中国石油大学(华东), 2010.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net