

液态食品溯源无引物核酸 高效扩增新技术

王鹏飞,陶现明,董平,李敬,梁兴国*

(中国海洋大学食品科学与工程学院,山东青岛 266003)

摘要:核酸因其序列种类丰富、物化性质稳定、特异性强等优点,可用作隐形条形码标记添加到食品或原料中实现产品的溯源。传统核酸检测方法一般依赖引物对核酸进行扩增,且实际应用中易产生假阳性结果。本文使用一种新型DNA模板,无需外加引物即可以在聚合酶的作用下自行高效扩增,并将其用于溯源。这种无引物核酸高效扩增技术基于以下原理:DNA链末端的回文序列可形成发卡结构,模板自身的3'-末端作为引物实现延伸扩增。该技术可直接使用合成的40~50nt的短链DNA,具有很好的稳定性且操作简单。结果显示:该方法在单纯体系内效果良好,且在以白酒为应用对象的体系内也获得良好的效果。可以预测,无引物核酸高效扩增技术在食品的真伪鉴别及源头追溯方面会有广泛的应用前景。

关键词:食品溯源,液态食品,核酸扩增,真伪鉴别

A novel and efficient primer-free DNA amplification technique for traceability of liquid food

WANG Peng-fei, TAO Xian-ming, DONG Ping, LI Jing, LIANG Xing-guo*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Nucleic acids could be added into foods or raw materials as an invisible bar code to trace products, owing to their advantages such as sequence diversity, stable physical and chemical properties and strong specificity. But primers were needed to amplify templates in the traditional methods, which might generate false positive results. In this article, a new type of template, which could be elongated efficiently by DNA polymerase in the absence of primers, was introduced to trace products. This primer-free DNA amplification technique bases on the following principle: the palindromic sequence at the ends of the DNA chain could form a hairpin of which 3'-end stem could be used as primer and extend with 5'-end of hairpin as template. In this assay, oligonucleotides of 40~50nt were designed as template. The results showed that this method performed well both in water and real sample Chinese spirit. The stable and simple method would be a promising candidate for food traceability and food authentication.

Key words: food traceability; liquid food; nucleic-acid amplification; food authentication

中图分类号: Q819 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2014)24-0167-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.24.027

近些年来,各类液态食品,尤其是名贵液态食品制假掺假现象严重,严重损害了生产厂商和消费者的切身利益。针对这一问题,一般通过制作特有的包装和防伪标识,或进行有效登记和检查等措施进行解决。但食品外包装容易被伪造或挪用,易被划破、污染或脱落,很难实现对食品原料的追溯。为了使厂家及相关监督部门能够快速准确地鉴别液态食品的真

伪,内标物检测法(将特殊标记物掺入到液态食品内用于后续检测及溯源)这样一种新的概念被提出并逐渐获得重视。因这一方法具有辨识度高、保密性强、不易仿造等优点,被认为具有广泛的应用前景。核酸分子由于具有物理化学性质稳定,无毒无害,且序列多样(可根据需要设计),序列特异性强等优点而成为标记物的理想选择。国内外虽然已有以添加的核酸作为主要内标物的发明专利^[1-6],但未发现相关的研究论文。以食品自身DNA作为内标物也可进行品种鉴定,但因原料及加工方式等的不同会造成DNA的差异,在应用时会产生误判或灵敏度低等问题^[7-8]。因此,我们认为采用容易扩增的添加核酸可满足液态食品溯源的需求,具有很大的发展潜力,需要大量深入、细致的研究来推动这一方法在实际产品中的应用。

另一方面,在DNA从头合成的研究中,有人发现

收稿日期:2014-03-03

作者简介:王鹏飞(1987-),男,硕士研究生,研究方向:核酸化学与生物技术。

*通讯作者:梁兴国(1971-),男,博士,教授,研究方向:核酸化学与生物技术。

基金项目:“国家青年千人计划”;“长江学者和创新团队发展计划资助”;山东省自然科学基金(JQ201204)。

某些具有发卡结构的DNA,尤其是一些短链重复序列,可以在没有引物的条件下扩增变长^[9-14]。Liang等^[15-18]提出了Hairpin-elongation的扩增模型,即3'-末端形成发卡结构后可以作为模板-引物进行引物延伸反应而变长,在到达5'-末端后,重新形成发卡结构,继续延伸,这样循环往复可以得到长度不同的扩增产物,其中一些扩增产物的长度可达到10kb以上。如果设计相应的容易扩增的DNA,作为内标物添加到液态食品中进行真伪鉴定,就可以实现白酒等液态食品的有效溯源。即有目的地添加少量核酸内标物,在后续检测时使用简单高效扩增方法对内标物核酸进行放大检测。本文据此设计了可以进行无引物扩增的寡核苷酸序列,以白酒为例,探讨了它们作为内标物在真伪鉴别和溯源中的应用,开发了新的鉴别液态食品真伪及溯源的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

6条寡核苷酸单链 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1);Vent(exo-)DNA聚合酶、限制性内切酶BstUI(酶切识别序列为5'-CGCG-3')购自New England Biolabs;限制性内切酶Tsp509I(酶切识别序列为5'-AATT-3')、TaqI(酶切识别序列5'-TCGA-3'),Proteinase K 购自Thermo Scientific;dNTPs 购自天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Green I 购自Invitrogen公司;42% vol白酒 购于青岛超市。

恒温控制设备PCR仪 杭州博日科技有限公司;全波长多功能酶标仪 Thermo Scientific科技公司;伯乐凝胶成像仪 美国Bio-Rad公司。

1.2 实验方法

1.2.1 不同温度下的扩增反应 将三对单链DNA T1/T-1、B1/B-1、Q1/Q-1分别加入到扩增反应体系内,并分别在45、50、55、60、65、70、75、80℃八个温度条件下反应4h,单链种子浓度为50nmol/L;反应体系(50μL)内含有1×ThermoPol Buffer(10mmol/L KCl, 10mmol/L (NH₄)₂SO₄, 20mmol/L Tris-HCl(pH8.8 25℃), 2mmol/L MgSO₄, 0.1% Triton X-100), 20U/mL的Vent(exo-) DNA聚合酶, 0.25mmol/L的dNTPs。

1.2.2 扩增产物的定量分析 取2μL 1.2.1中扩增产物与98μL 1×SYBR Green I加入到黑色96孔板中,轻微振荡混匀,避光染色15min左右。用Varioskan Flash全波长多功能酶标仪测定荧光值,其中激发波长497nm,发射波长520nm,并根据标准曲线公式计算

扩增产物的浓度。

1.2.3 最适温度下的扩增反应 将三对单链DNA T1/T-1、B1/B-1、Q1/Q-1分别加入到扩增反应体系内,在各最适反应温度下反应2h,其中单链DNA的浓度分别为100、10、1、0.1nmol/L,空白对照组中不加入单链DNA,反应体系内其余成分同1.2.1。

1.2.4 酶切反应 1.2.3扩增反应结束后,加入1μL Proteinase K, 37℃条件下反应30min;再于65℃条件下保温20min,灭活Proteinase K。分别取10μL以上处理产物用于酶切反应,其中T1/T-1、B1/B-1反应产物分别用Tsp509I和BstUI酶切,Q1/Q-1反应产物用TaqI和Tsp509I酶切。

1.2.5 白酒贮存处理及扩增酶切反应 将单链DNA加入到市售的42% vol白酒中,混匀并于37℃条件下密封避光贮存7d。扩增时,取5μL贮存后白酒直接加入反应体系(终体积50μL,其余成分同1.2.1),在各最适温度下反应2h。酶切反应同1.2.4。

1.2.6 电泳分析 分别取5μL扩增产物和酶切产物用于凝胶电泳,扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳1h,酶切产物用2.0%琼脂糖凝胶电泳1h,EB染色20min后置于伯乐凝胶成像仪(Gel Doc XR⁺)上成像分析。

2 结果与分析

2.1 设计原理

本研究所使用的标记物为两条单链DNA,这两条DNA单链具有以下特点:其5'-末端的序列为一段回文序列,能够形成发卡结构,且该部分序列中含有一种内切酶的识别位点,该部分长度为20nt左右;其3'-末端的序列不能形成发卡结构,该部分序列中含有另一种内切酶的识别位点,该部分长度也为20nt左右;成对单链DNA中不能形成发卡结构的部分能够互补配对;单链DNA总长度为40nt左右。在实际应用中,3'-末端20nt长的序列可根据检测方法和产品批次等随意设定,以满足其作为隐形条形码的需求。

图1为整个检测过程的设计原理图,当成对单链DNA共同存在时,其互补配对部分的序列会退火结合,形成不完整的双链DNA,之后在聚合酶的作用下会补齐生成完整双链DNA;在较高的温度下,该双链DNA末端打开,形成链内发卡结构,3'-末端可作为引物在聚合酶的作用下延伸扩增,生成两条双链DNA;该双链DNA末端仍可形成链内发卡结构,继续扩增,周而复始,最终生成长链DNA。而产物序列中也含有两种内切酶的识别位点,它能够被特定内切酶所酶切,依此完成对内标物真伪的鉴定。

表1 无引物扩增用寡核苷酸序列

Table 1 Sequences of oligonucleotides for primer-free amplification

序列名称	碱基组成(5'-.....-3')	长度(nt)
T1	AATTCCTAAGAATTCCTTAAGTGTCAATCGCGACAGTGACTA	40
T-1	AATTCCTAAGAATTCCTTAAGTAGTCACTGTCGCGATGACA	40
B1	CGATATATATCGCGATATATATCGAGTGTCTCAGAGAATTAGTGACTA	47
B-1	CGATATATATCGCGATATATATCGTAGTCACTAATTCTCTGAGCACT	47
Q1	CGATATATATATCGATATATATATCGTGTCAACAATTGGAGTGACTA	46
Q-1	CGATATATATATCGATATATATATCGTAGTCACTCCAATTGTGACA	46

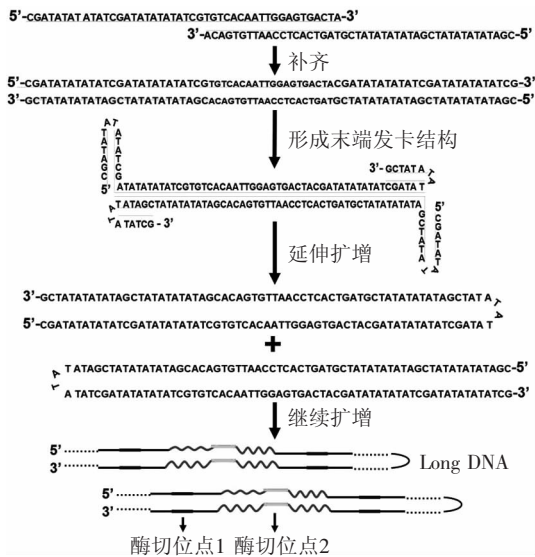


图1 无引物扩增的分子设计原理图

Fig.1 Principle of the molecular design for primer-free amplification

根据上述设计原理,设计了三对单链DNA:T1/T-1、B1/B-1、Q1/Q-1,其序列组成见表1,研究了它们的扩增特性,并对其进行了初步的应用。

2.2 温度对三对单链DNA扩增的影响

以扩增产物的浓度来评价三对单链DNA T1/T-1、B1/B-1、Q1/Q-1在不同温度下的扩增能力。图2显示,温度对三对单链DNA的扩增具有很大的影响。当反应温度低于60℃时,三对单链的产物浓度均不高(<5ng/μL),且相差不大;当反应温度升至65~75℃时,其产物浓度明显增加,能达到45℃时的5倍以上;当反应温度升至80℃时,其产物浓度又有所下降。T1/T-1、B1/B-1、Q1/Q-1三对单链DNA分别在反应温度为75、75、70℃时产物浓度最高,扩增能力最强,由此确定75、75、70℃分别为三对单链DNA的最适扩增温度,后续的扩增反应也将在其最适扩增温度下进行。在最适扩增温度下,三对单链DNA的产物浓度分别为17.1、20.7、22.4ng/μL,产物浓度相差不大,扩增能力顺序为Q1/Q-1>B1/B-1>T1/T-1。

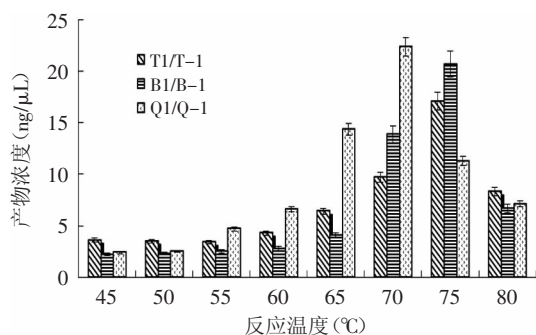


图2 反应温度对三对单链DNA扩增的影响

Fig.2 Effect of reaction temperature on the amplification of the three groups of oligonucleotides

2.3 三对单链DNA T1/T-1、B1/B-1和Q1/Q-1的扩增及酶切结果

图3为不同浓度的三对单链DNA T1/T-1、B1/B-1和Q1/Q-1在各自最适扩增温度下的产物电泳图。当种子浓度为100nmol/L (lane 1)时,图中均显示为弥散形条带,有不同长度的产物生成;与lane 1相比,lane 2~3中显示产物条带较为集中,多为大片段产物,长度在10kb以上。当反应体系内单链DNA浓度为0.1nmol/L (lane 4)时,T1/T-1、Q1/Q-1图中显示在胶孔内有少量产物生成,B1/B-1图中则显示无产物生成。空白对照 (lane C)中也显示无产物生成。

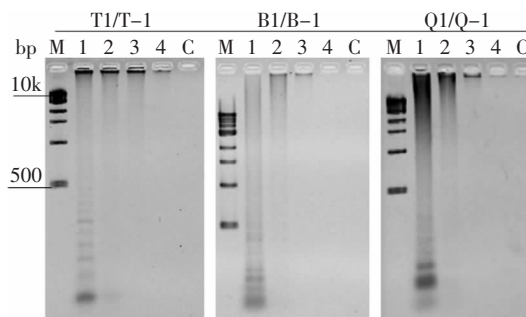


图3 三对单链DNA的恒温扩增

Fig.3 The amplification result of the three groups of oligonucleotides

注:M为DNA Ladder; lane 1~4分别表示反应体系内单链DNA浓度为100、10、1、0.1nmol/L; lane C为空白对照; 1.5%琼脂糖凝胶。

图4显示了三对单链DNA T1/T-1、B1/B-1和Q1/Q-1的扩增产物分别经过两种内切酶酶切的结果。酶切底物是种子浓度为10nmol/L时的扩增产物(图3中 lane 2)。酶切结果显示其扩增产物均能够被特定的两种内切酶所酶切,说明产物是由单链DNA按照预期的扩增方式生成;另外,图中显示酶切产物的大小不同,这可能与所使用内切酶的酶切特点不同有关。

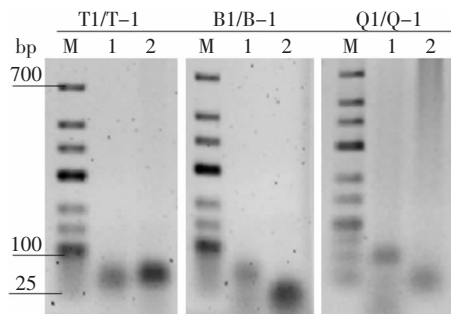


图4 扩增产物的酶切结果

Fig.4 The enzyme digestion results of amplification products
注:M为DNA Ladder; lane 1~2分别为扩增产物的两种酶切产物; 2.0%琼脂糖凝胶。

2.4 白酒处理后核酸扩增及酶切结果

以购于市面的42%vol白酒为实际应用对象,将梯度浓度的单链DNA加入到白酒中并于37℃条件下密封贮存一周后,再进行扩增及酶切处理。结果如图5所示,A图为扩增结果电泳图,其产物特征与图3中相同:当反应体系内单链DNA浓度不低于1nmol/L (lane 1~3)时,图中显示均有产物生成;当单链DNA浓度为0.1nmol/L

(lane 4)时, T1/T-1、Q1/Q-1电泳图中显示胶孔内有少量产物生成, 而B1/B-1电泳图中则显示无产物生成; 该结果与图3结果相同。B图为酶切结果电泳图, 图中显示扩增产物均能够被特定的两种内切酶所酶切。

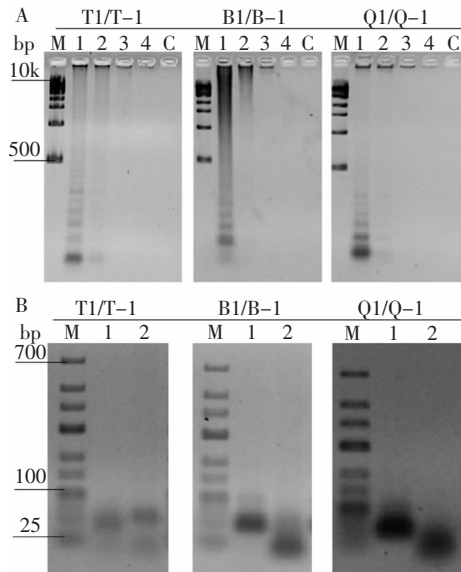


图5 白酒处理后的三对单链DNA的扩增及酶切结果
Fig.5 The amplification and enzyme digestion results of the three groups of oligonucleotides that had been added in Chinese white spirit

注: A图为扩增产物结果, M为DNA Ladder, lane 1~4分别表示反应体系内单链DNA浓度为100、10、1、0.1nmol/L, lane C为空白对照。B图为酶切结果, M为DNA Ladder, lane 1~2分别为扩增产物的两种酶切产物。

3 讨论

本实验中所设计的三对单链DNA T1/T-1、B1/B-1和Q1/Q-1均能够在聚合酶的作用下延伸扩增, 当两条单链DNA结合生成双链DNA后, 其3'-末端会形成链内发卡结构, 这是该扩增反应进行的前提。在设计序列时, 单链DNA的5'-末端必须为回文序列, 这样才能保证其互补链上的3'-末端能够形成发卡结构, 这是该单链DNA设计的关键点。实验中所使用的Vent(exo-)DNA聚合酶是一种嗜热聚合酶, 且具有链置换活性, 这也是DNA链扩增延伸的必要条件; 高温使双链DNA的末端解链进而形成链内发卡结构, 链置换作用则保证DNA链的继续延伸。另外, 在该序列中加入两种内切酶的酶切位点, 这有利于后续的鉴定, 实验结果显示扩增产物能够被两种内切酶所酶切, 证实了扩增产物确实是由成对单链DNA按照所设计的方式扩增生成。

在探究三对单链DNA的最适扩增温度时, 反应时间为4h, 这样能够保证产物浓度在酶标仪标准曲线的线性检测范围内; 三对单链DNA的扩增能力不同, 且最适温度在70~75℃之间, 这与其末端发卡结构的长度以及碱基组成有着密切关系。对比T1/T-1和Q1/Q-1, 它们的末端发卡结构中都含有7对碱基。而据有关DNA重复序列扩增特性的相关研究, AA/TT

的最适扩增温度高于AT/AT, 且前者的 T_m 更高^[11], 这应该是T1/T-1最适反应温度高于Q1/Q-1的主要原因。对比T1/T-1和B1/B-1, 虽然其末端发卡结构中碱基对数分别为7和6, 但T1/T-1中G/C含量低于B1/B-1的, 可能是这两个因素共同导致两者的最适扩增温度相同。对比B1/B-1和Q1/Q-1, 它们的发卡结构相似, 前者比后者少一对A/T, 但最适反应温度高一些, 可能是由于其G/C含量相对高造成的。另外, 实验中所测量的温度间隔梯度为5℃, 这可能会带来实验误差。在最适扩增温度下, 链末端更易形成发卡结构, 且该发卡结构足够稳定, 有利于扩增反应的进行; 当反应温度过低时, 双链DNA末端不易打开, 发卡结构不易形成; 当反应温度过高时, 末端的发卡结构容易被打开, 不能稳定存在, 使DNA聚合酶不易结合, 因此, 反应温度过高或过低都会影响其扩增效率。单链DNA的碱基组成决定其自身的最适扩增温度, 我们可以根据一些发卡结构及重复序列扩增特性的相关研究找到更容易扩增的DNA序列进行实际应用。

图3及图5中的扩增结果均显示有产物生成, 且产物长度不等, 这是由该技术的扩增机理所决定的, 该扩增过程的核心就是3'-末端发卡结构的反复生成以引导DNA链的不断延伸扩增, 发卡结构形成的次数不同, 其扩增产物的长度就会不同; 这与PCR技术产物的长度一定有很大的区别, 而类似于另外几种核酸恒温扩增技术, 如滚环扩增技术(RCA)和环介导等温扩增技术(LAMP), 这两种扩增技术的产物长度大小不等, 在电泳图中也呈现为弥散形条带, 一般也需要经过后续的酶切反应来验证扩增产物^[19-20]; 但与以上几种扩增技术相比, 本文所开发扩增技术具有不需要设计引物的优势。当反应体系内单链DNA浓度为100nmol/L时, 聚合酶浓度相对较低, 不能够使所有DNA都扩增生成大分子片段, 而生成大小不等的产物, 在电泳图中呈现弥散形条带; 当单链DNA浓度降低时, 聚合酶浓度相对升高, 能够催化更多DNA链的延伸扩增, 其扩增产物大小一般为10kb以上; 当单链DNA浓度再降低时, 聚合酶浓度则相对过量, 但单链DNA的含量有限, 产物量也很少, 在电泳图中则不易观察到。为提高检测效率, 将扩增反应时间定为2h, 当反应体系内单链DNA的浓度低于0.1nmol/L时, 电泳图几乎检测不到产物的生成, 可以将该值定为该方法的检测限。这并不说明体系内单链DNA浓度低时扩增反应没有发生, 而是由于电泳染色方法检测灵敏度有限而成。当延长扩增反应时间至8~12h, 其检测限可提高至1pmol/L, 如果采用更为灵敏的检测技术, 相信可以大大提高该检测方法的灵敏度。后续的酶切结果显示扩增产物能够被特定的两种内切酶所酶切, 进一步证明了检测结果的准确性。理论上两种酶切产物的大小应该相同, 而图4中显示酶切产物在电泳图中的位置不同, 这可能是由于酶切产物有的具有平末端, 有的具有粘性末端, 且粘性末端的碱基数不相同等因素影响了其在凝胶中的迁移速率。

将三对单链DNA掺入白酒中密封贮存1周后再进行扩增及酶切检测, 检测结果和未处理时的检测结果

基本一致,说明单链DNA分子能够在白酒中稳定存在,这也为其未来实际的应用提供了一定的理论依据。

4 结论

本研究建立了一种新的无引物核酸扩增方法,并将该方法初步应用于液态食品的真伪鉴别和溯源。通过三对单链DNA的初步实验,结果显示三对单链DNA均能够在一定的温度下延伸扩增,扩增能力及最适扩增温度各不相同,其最适扩增温度为70~75℃,且扩增产物能够被特异性酶切。相比于可见/红外光谱等检测技术以及传统的PCR检测技术,该方法具有实验设备仪器简单,操作简便易行,无需引物设计、温度控制等繁琐步骤等优势。以实际样品白酒进行前处理后,实验结果显示白酒对该单链DNA分子的影响不大,扩增及酶切反应不受贮存过程的影响,也初步验证了该“内标物”检测方法在未来实际应用的可能性。

参考文献

- [1] Minton J E, Slater J H. Method of marking a liquid:U.S, 5,643,728[P]. 1997-7-1.
- [2] 杨德吉,姚大伟,郑新,等.一种利用核酸检测技术鉴别白酒真伪的方法:中国,101665825A[P]. 2010-03-10.
- [3] Sheu J J, Chen L L, Chen E, *et al.* Method of marking solid or liquid substances with nucleic acid for anti-counterfeiting and authentication:U.S Patent 7115301 B2[P]. 2006-10-03.
- [4] Gaudreau M, Ibrahim F. Compositions for marking objects with DNA and methods for marking and linking an object to its owner:U.S,8163328 B2[P]. 2012-04-24.
- [5] Takahama S. Identifier and nucleic acid amplification method of verification using the same:U.S,8,101,346 B2[P]. 2012-01-24.
- [6] Mercolino T J, Hill C. Product authentication:U.S,8220716 B2[P]. 2012-07-17.
- [7] Rasmussen R S, Morrissey M T. Application of DNA-Based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2009, 8(2):118-154.
- [8] Pereira F, Carneiro J, Amorim A. Identification of species with DNA-based technology[J]. *Recent patents on DNA & gene sequences*, 2008, 2(3):187-200.
- [9] Ogata N, Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the archaeon *Thermococcus litoralis*:influences of temperature and ionic strength[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(20):4652-4656.
- [10] Ogata N, Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* [J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(20):4657-4661.
- [11] 王阳,贾蕾敏,董平,等.三核苷酸双链重复序列扩展合成特性及其机理[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2013, 40(4):345-355.
- [12] Ogata N, Miura T. Elongation of tandem repetitive DNA by the DNA polymerase of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* at a hairpin-coil transitional state: a model of amplification of a primordial simple DNA sequence[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(45):13993-14001.
- [13] Ogata N, Morino H. Elongation of repetitive DNA by DNA polymerase from a hyperthermophilic bacterium *Thermus thermophilus*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(20):3999-4004.
- [14] Ogata N. Elongation of palindromic repetitive DNA by DNA polymerase from hyperthermophilic archaea: A mechanism of DNA elongation and diversification[J]. *Biochemistry*, 2007, 89(5):702-712.
- [15] Liang X G, Jensen K, Frank-Kamenetskii M D. Very efficient template/primer-independent DNA synthesis by thermophilic DNA polymerase in the presence of a thermophilic restriction endonuclease[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(42):13459-13466.
- [16] Liang X G, Kato T, Asanuma H. Unexpected efficient ab initio DNA synthesis at low temperature by using thermophilic DNA polymerase[J]. *Nucleic Acids Symposium Series. Oxford University Press*, 2007, 51(1):351-352.
- [17] Liang X G, Kato T, Asanuma H. Mechanism of DNA elongation during de novo DNA synthesis[J]. *Nucleic Acids Symposium Series Oxford University Press*, 2008, 52(1):411-412.
- [18] Kato T, Liang X G, Asanuma H. Model of elongation of short DNA sequence by thermophilic DNA polymerase under isothermal conditions[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(40):7846-7853.
- [19] 李岩,李珊珊,张玉祥.一种高效扩增小片段DNA方法的建立[J]. *首都医科大学学报*, 2011, 32(1):121-124.
- [20] 吴阳升,罗淑萍.一种新的高效快速核酸恒温扩增方法——LAMP法[J]. *生物技术*, 2004, 14(4):76-78.
- [6] 邱竣,周绍龙.细菌纤维素的研究和应用新进展[J]. *中国美容医学*, 2011, 20(5):870-871.
- [7] 陈则华,李理.利用大豆黄浆水的发酵研究[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(3):42-46.
- [8] 李燕,宋俊梅,曲静然.豆制品废水的处理及综合利用[J]. *食品工业科技*, 2002, 23(7):70-72.
- [9] 施庆珊,冯静,冯劲,等.产细菌纤维素Axy-I菌株的鉴定及产物分析[J]. *生物技术*, 2010, 20(4):55-58.
- [10] 包怡红,梁雪,李锐达,等.产胞外多糖酵母菌株的筛选鉴定及发酵多糖[J]. *微生物学报*, 2010(2):278-283.
- [11] 钱锋,张晓非,郝艳茹.双缩脲法快速测定蛋白质含量[J]. *数理医药学杂志*, 2007(20):406-407.
- [12] 崔思颖.产细菌纤维素深层发酵菌种选育及工艺优化[D].广州市:华南理工大学,2010.
- [13] 关晓辉,尹宗杰,鲁敏,等.细菌纤维素发酵条件的优化及结构分析[J]. *中国酿造*, 2010(10):69-70.
- [14] 黄丹,王清路,王云飞.木醋杆菌QAX993发酵生产细菌纤维素条件的探讨[J]. *中国发酵*, 2008(12):36-37.
- [15] 赵克勤,谭平,刘国平.利用大豆生产细菌纤维素的研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(8):3409-3411.
- [16] 汤卫华,李飞,贾原媛,等.细菌纤维素高产菌株的诱变选育和发酵条件研究[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(9):1016-1019.
- [17] 沈金朋,罗庆平,段晓惠,等.利用酒糟浸出液制备细菌纤维素[J]. *食品科学*, 2010(3):203-205.

(上接第166页)