

宏基因组学及其在大曲酒微生物研究中的应用

黄祖新

(福建师范大学生命科学学院,福建 福州 350108)

摘要: 利用宏基因组学技术可以直接从基因水平上研究大曲酒生产微生物群落,研究发酵过程中微生物群落的消长及变化,特别是对大曲酒微生物群落的功能菌及多酶体系的认识,全面了解大曲酒微生物群落的代谢机理和形成大曲酒与众不同的香味组分的构成和风味特征。

关键词: 微生物; 宏基因组学; 大曲酒; 发酵

中图分类号:Q78;Q93-3;TS261.1

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2009)10-0017-05

The Application of Metagenomics in the Research on Microbial Community in Daqu Liquor Production

HUANG Zu-xin

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: Metagenomics is introduced to directly elucidate the genomes of the environmental microbial community in Daqu liquor production. The metagenomic techniques could be used for the research on the growth, the decline and the change of microbial community during Daqu fermentation process and especially for the exploration of the functional bacteria and the multi-enzyme system in microbial community. Besides, the application of metagenomic techniques is helpful for comprehensive understanding of the metabolism mechanism of microbial community in Daqu and for revealing the extraordinary flavoring compositions and flavoring characteristics of Daqu liquor production.

Key words: microbes; metagenomics; Daqu liquor; fermentation

Handelsman 等^[1]于 1998 年首次提出宏基因组学概念,宏基因组学认为生命研究对象应是生物环境中全部微生物的基因组,是指特定环境下所有生物遗传物质的总和。进而提出针对特定环境样品中细菌和真菌基因组总和进行研究的狭义宏基因组学的概念。也就是说宏基因组学是一种不依赖于人工分离培养的微生物基因组技术,是从特定环境中直接分离所有微生物(全部细菌和真菌基因组)的 DNA,选择合适的载体用于克隆 DNA 片段,将 DNA 片段克隆到宿主细胞中进行表达,根据某些生物活性功能或基因序列筛选有价值的克隆和功能分析。

中国大曲酒是世界上香味组分最丰富的蒸馏酒。独特的发酵工艺和大曲酒微生物的多样性造就了中国大曲酒的多种香型以及繁杂的香味组物质,也造就了大曲酒有许多目前未被认识的奥秘。宏基因组学是一个开拓大曲酒微生物研究领域的新方法。利用宏基因组学技术研究大曲酒微生物,无需单一分离培养某一类微生物,直接在基因水平上研究发掘大曲酒酿造微生物(包括

纯培养和未培养微生物)资源。宏基因组学应用于大曲酒生产微生物的研究,主要包括两方面:一方面是进行大曲酒微生物及其基因和酶资源的研究与发掘,从中筛选得到影响大曲酒发酵的功能酶和功能菌;另一方面是进行微生物生态学研究,从整体微生物群落水平来研究大曲酒微生物,揭示不同大曲酒的微生物群落多样性及其变化。通过这两方面的研究,较全面了解大曲酒微生物群落的代谢机理和形成大曲酒与众不同的香味组分的构成和风味特征。

1 宏基因组文库的构建与筛选

1.1 环境微生物 DNA 的提取

常用环境微生物 DNA 提取的方法有:①采用直接裂解法,如 SDS 高盐法、变性剂加 SDS 高盐法、SDS-酚氯仿抽提法;②采用细胞分离提取法,如冻融溶菌酶 SDS 裂解法和提取 DNA 试剂盒法。直接裂解法提取得到的微生物 DNA 能代表样品微生物的多样性,但所提取的 DNA 片段为 1~50 kb。细胞分离提取法提取可以获得大片段 DNA,长度为 20~500 kb,并且纯度高,但易于丢失

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项资金资助,公益性行业(农业)科研专项项目(项目编号 nyhyzx07-019)、“948”项目(项目编号 2006-G37)。

收稿日期:2009-07-13

作者简介:黄祖新(1956-),男,福建连江人,副教授,从事食品发酵与酿造技术方面的研究。

微生物物种信息。为了提高提取环境微生物 DNA 的质量,可以采用多种富集方式,还可以采用含聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的缓冲液预洗,添加 CaCl_2 和 BSA,可以去除腐殖酸等措施。环境微生物 DNA 提取过程宏基因组文库的构建与筛选流程见图 1。

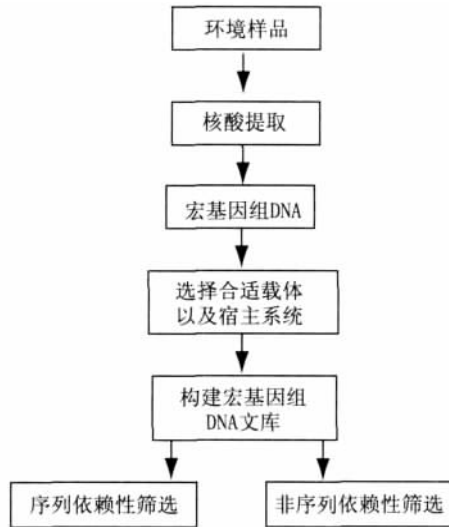


图 1 宏基因组文库的构建与筛选

1.2 选择载体

常用载体有细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 和柯斯质粒 (Cosmid)。细菌人工染色体用来克隆 150 kb 左右大小的 DNA 片段,最多可保存 300 kb 个碱基对。转化效率高,而且以环状结构存在于细菌体内,易于分辨和分离纯化。柯斯质粒用于克隆大片的 DNA 分子,克隆外源 DNA 片段的极限值高达 45 kb,远远超过质粒载体及 λ 噬菌体载体的克隆能力。载体系统的选择取决于目的基因的扩增和表达,提高和调控外源基因的拷贝数和表达量。此外,噬菌体和病毒也可以作为构建宏基因组文库的载体。

1.3 宿主细胞的表达

目前,常用宿主的选择是大肠杆菌、链霉菌或假单胞菌属。一些缺陷型突变体也可以作为宿主进行宏基因组文库的功能筛选。宿主的选择主要考虑到宏基因的表达、重组载体在宿主细胞中的稳定性、转化的效率和目标性状的筛选等。如穿梭载体或 BAC 载体多采用大肠杆菌;有时也应用链霉菌或假单胞菌。原核基因的表达一般应用于大肠杆菌作为宿主,宏基因组 DNA 也含有真核基因,以真核生物如酵母菌 (*Saccharomyces sp.*)、曲霉 (*Aspergillus sp.*) 作为宿主。根据不同微生物产生活性物质的差异和研究目标的不同,选择不同的宿主。随着技术的成熟和新宿主的选择,提高基因筛选的效率和功能基因检测率,进而提高宏基因组文库的目标基因的表达。

1.4 宏基因组 DNA 文库

宏基因组文库的构建是从环境样品中得到大量的基因组 DNA 片段,然后将这些 DNA 片段与载体连接,再转化到宿主中去,让宿主菌长成克隆。一个克隆内的每个细胞的载体上都包含有特定的基因组 DNA 片段,整个克隆群体就包含宏基因组的全部基因片段总和。宏基因组文库既包含了可培养的、又包含了未能培养的微生物基因,避开了微生物的分离培养问题,极大地扩展了微生物资源的利用空间。

1.5 宏基因组文库的筛选

宏基因组文库的筛选技术根据是否依赖已知序列信息分为序列依赖性筛选和非序列依赖性筛选。

序列依赖性筛选是依赖于目的基因的保守 DNA 序列,以序列相似性为基础,执行某类功能的酶可能具有相识的基因序列。根据已有的序列信息设计引物,进行 PCR 扩增或杂交筛选阳性克隆子。序列依赖性筛选一般只能获得结构基因的片段,而不能获得完整的功能基因。但是,可以将扩增产物进行标记,作为探针筛选宏基因组文库,以获得完整的功能基因。继而对其基因异源表达,得到生物活性的产物。

非序列依赖性筛选又称功能驱动筛选,其常用方法是根据重组克隆产生一些酶蛋白功能活性,采用各种检测手段,如选择性平板的阳性克隆周围出现透明圈或酶降解产物显现颜色效应,进行挑选活性克隆子,得到完整的功能基因和带有目的基因的基因簇,发现全新的基因或活性物质。功能驱动筛选首先要求功能基因或带有目的基因的基因簇在宿主中能够表达,并受到检测手段的限制,往往是在数千个,甚至数百万个重组克隆子中才能检测到有用的活性克隆。

还可以采用底物诱导基因表达检出法即 SIGEX 法,利用各种底物诱导的分解代谢型基因的检出,通过绿色荧光蛋白表达载体将宏基因组 DNA 克隆无启动子的 *gfp* 基因上游,外加目标底物影响 *gfp* 基因表达,并结合荧光激活细胞定位技术,从宏基因组文库中分离出代谢产物的诱导基因^[2]。

2 宏基因组学技术应用发掘大曲酒微生物资源

2.1 宏基因组技术克隆分离功能基因

从环境中提取高质量 DNA,构建宏基因组文库,从中筛选到功能基因或基因簇,展示宏基因组技术从环境中克隆任何生物体的基因的可能性。通过构建宏基因组文库,从中鉴定出的大多数基因都是新的基因^[3]。即使是对一个相对较小的宏基因组文库进行筛选,所获得的序列与已公布的数据库中的序列的相似性也很低。宏基因组技术可以应用于微生物基因资源的“生物探矿”。

利用宏基因组文库,已发现的新基因主要有:生物催化剂基因、抗生素抗性基因以及编码转运蛋白基因等。如广西大学的许跃强(2006年)等^[4]构建了造纸厂废水纸浆沉淀物的宏基因组文库,从中筛选到多个表达内/外切葡聚糖酶活性和 β -葡萄糖苷酶活性克隆子,并鉴定出3个新的纤维素酶基因。Ranjan等^[5]为寻找分解脂肪的基因,2005年构建了池塘水的宏基因组文库,通过筛选分离得到11个有分解三丁酸甘油酯能力的克隆子,对其分解脂肪的功能基因进行鉴定,其DNA中G+C组成范围为57%~75%。要获得稀有微生物的基因信息,就需要构建足够大的文库。如Henne等^[6]筛选286000个克隆,只得到4个带有脂肪酶基因的克隆子。Yun等^[7]选用pUC19为克隆载体构建大肠杆菌基因组文库,利用活性筛选方法,从30000个重组子中筛选出一个含有淀粉酶基因(*amyM*)的克隆子。

甲烷菌与己酸菌共栖大曲酒窖泥中,甲烷发酵与己酸发酵耦联,甲烷发酵消耗由己酸发酵产生的 H_2 ,消除氢的产物抑制,反应向有利于生成己酸的方向进行。窖内的甲烷过多,存在着甲烷氧化细菌,依赖于甲烷生长,不仅在酒窖微生物种群间相互关系上有特殊生态意义,还有保持酒窖发酵中气压平衡的特殊作用^[8]。该菌的关键酶系甲烷单加氧酶是一个含双核铁的多组分氧化酶,常温、常压下能够催化甲烷转化为甲醇。Dumont等^[9]研究甲烷单加氧酶功能基因,从 $^{13}CH_4$ 标记的森林土壤样品中提取纯化 ^{13}C -DNA,构建宏基因组文库,通过与甲烷单加氧酶基因(*pMMO*)杂交对文库进行筛选,对其中一个阳性克隆进行测序,得到15.2 kb的甲烷单加氧酶目标基因,该基因包含一个微粒型甲烷单加氧酶基因(*pM-MO*)操纵子和几个侧翼基因。

2.2 宏基因组技术筛选有价值的功能酶

近年来,宏基因组学技术对生物催化剂——新酶的筛选发现层出不穷。与大曲酒生产有关的酶类如淀粉酶、蛋白酶、氧化还原酶、脂肪酶、酯酶等新功能酶,并可能获得新酶的特征信息。特别是对于未培养微生物产生的酶类,通过宏基因组技术从环境中筛选分离得出,加以研究应用。德国哥廷根大学的Danie IR实验室从土壤样品直接提取微生物DNA,由表达载体pSK-转化到大肠杆菌中成功构建了宏基因组文库,通过筛选获得乙醇氧化还原酶^[10];Gup ta等^[11]以pUC18从一个较小的土壤宏基因组文库中筛选碱性蛋白酶,在脱脂牛奶平板上分析其宏基因组DNA的插入,筛选到一个EDTA敏感的、30 kD、275个氨基酸和pI为8.89的金属蛋白酶;Yun等^[12]选用pUC19为克隆载体构建大肠杆菌宏基因组文库,对其表达出的酶蛋白进行特征分析,发现该酶具有独特的转糖

基作用,同时还具有 α -淀粉酶、葡聚糖转移酶和新普鲁兰酶的共同特征。Knietzsch等^[13]根据所有已知脱水酶基因的保守序列设计了一对PCR引物对宏基因组DNA扩增。扩增产物制作探针与宏基因组文库进行杂交,筛选到2个高脱水酶活性和1,3-丙二醇脱水酶活性的克隆子,有望开发应用于工业生产。

大曲酒的固态发酵酒醅中含有多种微生物产生的多酶体系,一方面将原料中蛋白质、糖类、脂肪等大分子物质逐渐分解,供自身代谢作用;另一方面为乙醇和香味组分提供前提物质,或参与重要香味组分物质的形成。但是,目前对大曲酒发酵的功能酶和酶系的深入研究还是太少。因此,借助宏基因组技术分离纯化大曲酒微生物分泌的功能酶,发现大曲酒生产用微生物的新的功能酶类,以利用这些酶类在大曲酒酿造过程发挥应有的作用。

2.3 宏基因组技术选育微生物功能菌

生丝微菌是一类以甲醇作为唯一碳源和能源的,通过出芽过程繁殖的柄细菌。该菌的生理特性使其难分离培养。吴衍庸等^[9]从酒窖环境中分离出生丝微菌(*Hyphomicrobium*)的一株纯培养菌株,由于该菌具有生长消耗甲醇的生理特征,在老窖中的发现和分离,有可能对老窖发酵生产出的大曲酒所含的甲醇进行有效的调控。

宏基因组技术不必经过纯培养的分离方法,也可以寻找甲醇生物降解的功能菌。Radajewski等^[14]利用 ^{13}C 标记甲醇投加到橡树林的土壤,富集一段时间,提取土壤总DNA,建立宏基因组文库,筛选出 ^{13}C 标记的DNA,经16S rRNA扩增后,鉴定出一些微生物是可以利用甲醇做为碳源的微生物种群。

从大曲微生物、窖泥微生物以及生产现场环境微生物构成糟醅酿造微生物区系,通过发酵产品体现窖池主要功能菌的存在状态。通过分离宏基因组文库的基因,根据该基因寻找相应的微生物功能菌,可以达到认识功能菌效用和发挥其作用的目的。宏基因组学技术根据编码基因寻找新微生物的培养条件,为微生物纯培养技术提供可供选择的培养基资源。如用4-羟基丁酸作唯一的碳源和能源筛选到了5个能够稳定利用4-羟基丁酸的克隆子。经分析,这些克隆子具有4-羟基丁酸脱氢酶活性,据此可以利用该基因编码的活性物质4-羟基丁酸作唯一的碳源,开展实验室纯培养^[15]。该方法主要是基于活性筛选技术的特殊条件——选择性培养基,可以打破宏基因组技术对微生物功能菌的“可知不可求”的局面,它为实验室培养编码新基因的微生物提供了一条新途径。所以,大曲酒的未培养微生物功能菌的获得,可以借助根据宏基因组文库提供的线索,通过新的培养方法,获得具有重要生态功能的新的功能菌或未培养微生物的功能菌。

3 宏基因组学技术应用于微生物多样性研究

中国的大曲酒的发酵生产与一定地理环境条件有关,大曲的微生物种群、窖池发酵的微生态息息相关。研究学者利用基础微生物学方法对大曲酒的大曲制作和发酵过程、生产现场、窖泥的微生物种群和数量及其变化规律进行研究,如茅台集团与中国科学院微生物研究所合作,对茅台大曲和茅台酒醅中的微生物体系这一酿造茅台酒的独特资源进行研究,共分离鉴定出79种微生物,茅台酒厂保藏329种微生物,已经初步建立传统大曲酒微生物菌种资源库。但是,基础微生物学方法对于绝大部分未培养微生物的研究却被遗漏。所以,要揭示中国大曲酒生产微生物种群和数量及其变化规律,单靠基础微生物学方法是远远不够的。

随着宏基因组学的发展,人们可以避开传统的培养方法,通过DNA水平研究来探讨微生物群落结构及其与环境微生物的关系。微生物多样性在基因水平上主要表现为基因组大小和基因数目的多样性,遗传物质化学组成的多样性和某些特异性序列的变异。宏基因组学为研究环境微生物复杂群落和多样性提供了重要技术手段,通过快速可靠的获得环境样品中各种微生物的菌落指纹和特征性核苷酸序列,以系统分析大曲酒微生物的多样性及其分类地位,发掘丰富的大曲酒微生物资源。

Courtois等^[16]采用大肠杆菌-浅青紫链霉菌(*Escherichia coli*-*Streptomyces lividans*)穿梭质粒载体将从土壤中分离的微生物DNA片段构建成eDNA文库,包括5000个克隆子,结果表明,eDNA文库中微生物系统发育变化多样,其中大部分微生物尚未被报道过。Voget等^[17]从构建的宏基因组文库中,利用DNA序列分析法鉴定出2个纤维素酶基因*gnuB*和*uvs080*、1个选择性酰胺酶基因*am ia*、1个 α -酰胺酶基因*am yA*、2个果胶裂解酶基因*pelA*和*uvs119*、1个1,4- α -葡聚糖分枝酶基因*am Yb*。筛选结果说明,土壤中蕴藏的微生物基因多样性和功能多样性超过人们过去的认知,微生物基因多样性揭示了在基因水平上体现出土壤微生物的多样性。

宏基因组文库和16S rRNA基因序列的系统发育分析的结合,可以弄清生态环境中微生物区系的构成和衍变规律。对宏基因组文库中16S rRNA基因序列的系统研究,使环境微生物的多样性更接近于客观分析。向文良等^[18]提取浓香型大曲酒的酒醅中菌体DNA,通过PCR扩增,测定窖池中原核微生物的16S rRNA基因序列,进行16S rRNA系统发育分析,入窖发酵60d的窖池中心位置酒醅分布的放线菌群、乳酸细菌群、梭状杆菌群和紫细菌群的主要4个分支的原核微生物,比较客观反映窖池原核微生物的真实分布。Rondon等^[19]利用可插入大片

段DNA的BAC载体,构建土壤宏基因文库,对文库16S rDNA基因序列进行系统发育学分析,文库中DNA来源于不同系统分类单位下的许多微生物,包括G+C含量低的微生物、革兰氏阳性嗜酸菌、单细胞微生物和原核微生物,结果揭示了土壤微生物具有广泛的多样性。

4 宏基因组技术破解大曲酒香味组份物质的奥秘

中国传统大曲酒是世界上香味成分最为丰富的蒸馏酒。包括乙醇、高级醇、有机酸、酯、内酯、羰基化合物、芳香化合物、含氮化合物、含硫化合物等。据研究^[20],茅台酒有936个色谱峰,浓香型酒有674个色谱峰,清香型酒有486个色谱峰。这些复杂的香味物质来自大曲酒的原料、特殊的酿造工艺、众多微生物的发酵代谢产生的。

宏基因组学为揭示大曲酒的酒香奥秘开辟出新天地。通过宏基因组筛选可以得到微生物代谢合成的有价值的化合物。新的化合物的筛选在一定条件下,先测定不同结构的物质在色谱中呈现不同的峰值,与宏基因组的基因片段转入和未转入外源基因的宿主细胞或发酵液抽提物的色谱图参照,来筛选产生新的化合物克隆子。如Courtois等人^[21]构建了土壤穿梭粘粒载体文库,筛选出5000个克隆,从中发现了11个新的聚酮合酶I(PKS I)的基因,采用HPLC技术发现了脂肪二烯醇中2种互为同分异构体的新化合物。Wang等^[22]在筛选以链霉菌为宿主构建的宏基因组文库中,从1020个克隆子中发现2个产生新结构化合物的克隆子,进一步纯化分析获得了A-E 5种新的小分子抗菌化合物。因此,运用宏基因组学构建大曲酒微生物的宏基因文库,通过特定筛选方法发现新的化合物来揭示大曲酒的香味物质的未知组份。

崔利等人^[23]对酱香型大曲酒含有众多的香味物质吡嗪化合物提出一个推断:在高温制曲、高温堆积环节、高温发酵过程所产生的吡嗪化合物,除了酶和非酶参与的褐变反应外,应该说有相当部分是微生物代谢产物,因为这3个阶段中都有能够产生吡嗪化合物的大量枯草杆菌。对此推断,可以通过宏基因组学技术通过试验加以验证。在高温制曲、高温堆积环节、高温发酵3阶段,宏基因组学提取环境微生物DNA,构建宏基因组文库,通过测定吡嗪化合物的色谱峰,参照宏基因组的基因片段转入和未转入外源基因的宿主细胞或发酵液抽提物的色谱图,来筛选能够产生吡嗪化合物的克隆子,通过基因测序分析和16S rRNA扩增鉴定,有可能找出产生吡嗪化合物的那一种微生物。

5 结束语

自然界能够分离培养的微生物只是1%,绝大部分微生物是不可培养或未培养的微生物。现阶段所开展的

以基础微生物研究方法对大曲酒微生物进行分离培养的微生物区系研究, 对大曲酒微生物群落的认识主要基于实验室纯培养的单一微生物物种, 对微生物群落作为整体的性能认识是不足或片面的。特别是大曲酒微生物的功能微生物菌群及多酶体系的认识缺乏, 必然影响到对大曲酒微生物群落的代谢机理的全面了解。利用分子生物学的方法从大曲、堆积发酵酒醅、发酵窖泥中提取微生物宏基因组, 构建宏基因组文库, 进行基因序列克隆或功能分析, 有可能从较完整的微生物群落水平上对大曲酒生产微生物(包括纯培养和未培养微生物)进行分析研究, 系统地剖析微生物群落的多样性和动态变化, 较全面了解大曲酒生产微生物群落的代谢机理。

参考文献:

- [1] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. *Chemistry Biology*, 1998, 5(10):245-249.
- [2] Yun J, Ryu S. Screening for novel enzymes from metagenome and SIGEX as a way to improve it[J]. *Microbial Cell Factories*, 2005, (4):1-5.
- [3] Hong K S, Lim H K, Chung E J, et al. Selection and characterization of forest soil metagenome genes encoding lipolytic enzymes [J]. *Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(10): 1655-1660.
- [4] 许跃强, 段承杰, 周权能, 等. 造纸废水纸浆沉淀中未培养微生物纤维素酶基因的克隆和鉴定[J]. *微生物学报*, 2006, 46(5): 783-788.
- [5] Ranjan R, Grover A, Kapardar R K, et al. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335 (1) :57- 65.
- [6] Henne A, Daniel R, Schmitz RA, et al. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (9): 3901-3907.
- [7] Yun J, Kang S, Park S, et al. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 7229-7235.
- [8] 吴衍庸. 白酒工业微生物资源的发掘与应用[J]. *酿酒科技*, 2006, (11): 111-112.
- [9] Dumont M G, Radajewski S M, Miguez C B, et al. Identification of a complete methane monooxygenase operon from soil by combining stable isotope probing and metagenomic analysis [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8 (7): 1240-1250.
- [10] Knietzsch A, Waschowitz T, Bowien S, et al. Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: Generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 1408-1416.
- [11] Gupta R, Beg Q K, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59 (1): 15-32.
- [12] Yun J, Kang S, Park S, et al. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 7229-7235.
- [13] Knietzsch A, Bowien S, Whited G, et al. Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69: 3048-3060.
- [14] Radajewski S, Ineson P, Parekh N R, et al. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology [J]. *Nature*, 2000, 403 (6770): 646-649.
- [15] Gabor EM, de Vries EJ, Janssen DB. Construction, characterization, and use small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, (6): 948-958.
- [16] Courtois S, Cappellano CM, Ball M, et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 49-55.
- [17] Voget S, Leggewie C, Uesbeck A, et al. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 6235-6242.
- [18] 向文良, 张文学, 胡承, 等. 中国浓香型白酒窖池中原核微生物的特性及系统发育分析[J]. *四川大学学报*, 2005, 37(1): 39-42.
- [19] Rondon MR, August PR, Bettermann AD, et al. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 2541-2547.
- [20] 庄名扬. 中国白酒香味物质形成机理及酿酒工艺的调控[J]. *四川食品与发酵*, 2007, (2): 1-6.
- [21] Courtois S, Cappellano CM, Ball M, et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 49-55.
- [22] Wang GYS, Graziani E, Waters B, et al. Nove natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host[J]. *Organic Letters*, 2000, 2: 2401-2404.
- [23] 崔利. 酱香型白酒中吡嗪类化合物的生成途径及环节[J]. *酿酒*, 2007, 34(5): 39-40.