

深度测序技术检测益生菌产品菌株组成及16S rDNA序列

杨捷琳¹, 袁辰刚¹, 窦同海², 丁小磊², 潘良文¹

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135; 2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

摘要: 目的: 探查益生菌制品的标签标示与产品中实际检测到的菌株比较及不同产品中菌株的异同性。方法: 以市场上购买的进口、出口酸乳制品作为研究对象, 设计可区别24种产品的样品标签序列(Barcode), 通过PCR及Illumina平台深度测序分析, 获得了酸乳制品中所含益生菌种类及序列等详细信息, 根据Barcode序列信息对其中所含的24个混合样本进行区分, 然后利用16S RDP的16S数据库, 对测序的Reads进行比对。结果: 24种产品中标签标示与样品中实际检测到的菌株完全一致的仅有两种, 在24种酸乳制品中, 以嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌/德式乳杆菌为主要发酵菌株, 双歧杆菌作为添加的益生菌基本在所有样品中存在, 但含量较低, 另一方面, 不同产品中同一菌株的16S rDNA序列相似度较高, 仅有两种菌株的1~2个碱基存在差异。结论: 深度测序是一种可快速有效对食品中微生物群体精确筛查的技术, 能够精确深入了解食品中微生物群落。使用溶方法检测目前市场上的酸乳制品, 可发现使用的发酵菌种多来自商业化购买的菌剂, 同质化程度较高, 而作为后添加的双歧杆菌由于其生长条件的苛刻, 实际活菌数量较低。

关键词: 乳酸菌; 酸乳制品; 16S rDNA; 深度测序

Application of Next-Generation Sequencing (NGS) Technology in Analysis of Bacterial Species Composition and 16S rDNA Sequencing of Commercial Yoghurt Products

YANG Jie-lin¹, YUAN Chen-gang¹, DOU Tong-hai², DING Xiao-lei², PAN Liang-wen¹

(1. Shanghai Entry and Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China;

2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: In recent years, an increasing number of applications of probiotic dairy products have been reported to maintain the intestinal flora balance, treat chronic and acute diarrhea and enhance the immune system. Nevertheless, many probiotic products from the market are often not accurately labeled for the bacterial composition. Therefore, it is necessary to know the bacterial composition of probiotic products for better judgment of their quality. For this purpose, we investigated the accuracy and feasibility of 16S rDNA sequencing using Illumina next-generation sequencing (NGS) platform for bacterial identification of the bacterial species composition in probiotic foods, especially in 24 probiotic products from 19 manufacturers. Data showed that some probiotic products contained unadvertised lactobacilli and bifidobacteria, whereas others were not the same as labeled. In summary, 16S rDNA sequencing by Illumina NGS platform is a rapid method for profiling the microbial community in foods and clinical studies.

Key words: lactic acid bacterial; yoghurt; 16S rDNA; next-generation sequencing

中图分类号: Q939.99

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)20-0241-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201320051

乳酸菌是一群形态、代谢性能和生理学特性不完全相同的革兰氏阳性菌, 能发酵碳水化合物产生乳酸, 绝大多数是厌氧或兼性厌氧菌。目前, 在自然界中已发现的乳酸菌在细菌分类学上划分为23个属, 常用于微生物生态制剂的菌种有双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)、乳酸球菌(*Streptococcus lactis*)、肠球菌

(*Enterococcus*)、链球菌(*Peptostreptococcus*)、明串珠菌(*Leuconostoc*)、片球菌(*Pediococcus damnosus*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)等。乳酸菌作为益生菌菌株, 广泛用于食品、医药及饲料等许多行业^[1]。

益生菌产品是根据微生态学原理制成, 含有大量有益菌的活菌制剂, 或是含有它们的代谢产物或(和)添加

收稿日期: 2012-11-19

作者简介: 杨捷琳(1978—), 女, 高级工程师, 博士研究生, 研究方向为食品检验。E-mail: yangjl@shciq.gov.cn

有益的生长促进因子,具有维持动、植物体和人类及其内、外环境的微生态平衡(或调整其微生态失调),提高健康水平和保护环境的功能。益生菌菌种(株)是维系益生菌制品生命力的关键因素,是益生菌制品品质控制中最重要的指标^[2-3]。

益生菌产品应在标签中标示所用菌种的属名、种名和菌号等,然而,目前市场上销售的乳酸菌制品,在标签标示上问题较多,有的产品仅在标签中列明菌种名称,缺乏一些具体的菌种(株)信息,有的产品标签标示信息与产品实际内容物不完全相符,有的产品所标示的菌种名称是厂家自行命名的,与卫生部公布的可用于保健食品的益生菌菌种名单甚至国际标准数据库的菌种信息都无法对应,更谈不上溯源。

相比于传统的乳酸菌分类鉴定方法,包括形态特征、生理生化反应及血清学反应等^[4],基因水平的研究技术已成为研究的热点^[5]。人们建立了一系列的以DNA标记为基础的微生物鉴定和检测技术,例如AFLP技术^[6]、RAPD技术^[7]。根据菌株之间的遗传距离所产生的DNA指纹的差异来直接反映检测微生物菌株的DNA多态性来对其鉴定和分型^[8-9]。这些技术的最大优势就是可以避免各种复杂的微生物生长条件,在细菌数量足够时,可以不经培养就直接用于鉴定和检测。多数研究表明DNA标记分型技术具有从种属到菌株各种水平的鉴别能力^[4,6]。为乳酸菌的快速分子鉴定和分型提供了借鉴。

高通量测序技术改变了微生物分子生态学的研究方法,可利用16S rDNA的不同可变区测序对一些复合样本或未知样本如人的肠道、口腔、皮肤进行菌群生态分析,获得各种微生物的种类和频率分布信息^[10-12]。Solexa技术最早由剑桥大学的科学家创立,利用专利核心技术“DNA簇”和“可逆性末端终止”,达成自动化样本制备及基因组数百万个碱基大规模平行测序^[13]。其特点在于不需要进行DNA模板扩增或仅需低循环数的扩增,具有高准确性、高通量、高灵敏度等突出优势。相比于Roche 454而言,Solexa测序成本较低,早先的Solexa技术存在读长短的缺点,但随着Illumina公司的技术升级,最新的读长可达双端每侧200bp左右。

本研究以市场上购买的不同品牌、不同规格的进出口酸乳制品作为研究对象,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)及深度测序分析,获得酸乳制品中所含益生菌种类及序列等详细信息,以期了解乳酸菌制品中微生物种类组成、益生菌制品标签标示与产品中实际检测到的菌株相符程度以及不同产品中菌株的异同性等各项数据。同时进一步探索Genome Analyzer II x用于经济高效鉴别检测乳酸菌的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

益生菌 市购。

DP302细菌DNA提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司;Nextera DNA Sample Prep试剂盒 美国Illumina公司;HF401凝胶回收试剂盒 北京原平皓生物技术有限公司;Taq DNA聚合酶 宝生物工程(大连)有限公司;限制性内切酶 美国NEB公司。

PTC200梯度基因扩增仪、Tanon 2500凝胶成像分析系统、PTC-225 Peltier热循环仪 美国MJ-Research公司;Genome Analyzer II x高通量测序仪 美国Illumina公司;CFX-96荧光定量PCR仪 美国Bio-Rad公司;HimacCF 16RX冷冻高速离心机 日本日立公司;key Wrice-DTM C3i multi-function高速离心机 美国Thermo公司。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌全基因组的提取

从市场购买进出口益生菌产品样本24个,均为食健字批号,其中进口产品11种,国产或合资品牌13种,涵盖不同厂家约14个,采用细菌DNA提取试剂盒分别提取24种酸奶产品的全基因组DNA。提取方法步骤如下:取不同样本酸奶液1mL,10000r/min离心1min,弃上清液。向菌体沉淀中加入200μL缓冲液GA,振荡至菌体彻底悬浮。向管中加入20μL蛋白酶K溶液和溶菌酶(终质量浓度20mg/mL),振荡混匀,37℃放置1h,70℃放置10min,溶液变清后按照试剂盒步骤操作提取DNA。最后向吸附膜中间部位加入100μL洗脱液进行DNA洗脱。取少量洗脱液稀释后测定OD值,计算OD_{260nm}/OD_{280nm}比值以检验DNA质量。

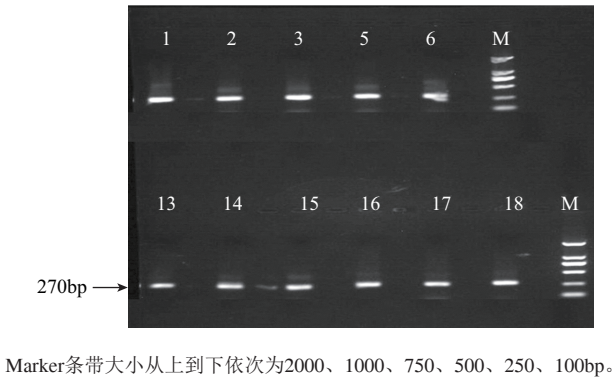
1.2.2 乳酸菌16S rRNA基因的扩增

从NCBI下载乳酸菌16S rRNA基因序列(M58823、CP002341、EF990662、HQ259744、HQ259742、EU694138、HQ293025、CR954253、CP000412、AB200872、CP000033、EF533992、CP001084、AB008207、CP000517、EF536361、CP002222),针对16S rRNA V6和V7区域设计兼并引物,兼并引物末端带Barcode,进行PCR扩增。

引物由上海英骏生物科技有限公司合成。采用凝胶回收试剂盒进行割胶回收,将回收好的各样本对应16S序列均匀混合,采用Illumina DNA片段建库试剂盒建库,利用Solexa第2代分析系统Illumina Genome Analyzer的100bp paired-end模式进行高通量测序。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA基因的扩增检测



Marker条带大小从上到下依次为2000、1000、750、500、250、100bp。

图1 16S rDNA基因的扩增检测
Fig.1 Amplification of 16S rDNA genes

所有PCR产物经质量分数为2%的琼脂糖凝胶电泳检测。由图1可见,市场购买的乳酸菌样品1~3、5、6、13~18中16S rDNA基因经扩增检测,在约270bp处出现荧光条带,且条带清晰、唯一,说明PCR产物为阳性结果。每种产品采用的不同引物组合见表1。

编号	品种	生产日期	标示菌株	引物
1	原味发酵乳	2011-04-27	乳酸菌(嗜酸乳杆菌)	A3, S2
2	低脂原味发酵乳	2011-05-01	双歧杆菌	A3, S3
3	低脂发酵乳	2011-05-02	活性乳酸菌, 双歧杆菌, 嗜热链球菌	A3, S4
4	无糖发酵乳	2011-05-04	嗜酸乳杆菌	A3, S5
5	发酵乳	2011-02-28	嗜热链球菌, 保加利亚乳杆菌, 嗜酸乳杆菌	A3, S6
6	原味酸奶(脱脂)	2011-04-08	双歧杆菌, 干酪乳杆菌, 活性乳酸菌, 嗜酸乳杆菌	A3, S7
7	脱脂酸奶	2011-04-27	活性乳酸菌(嗜酸乳杆菌, 双歧杆菌, 干酪乳杆菌)	A4, S2
8	乳酸菌饮料	2011-05-16	干酪乳杆菌	A4, S3
9	酸奶	2011-04-15	活性乳酸菌(嗜酸乳杆菌, 双歧杆菌, 干酪乳杆菌)	A4, S4
10	发酵乳	2011-02-18	嗜热链球菌, 保加利亚乳杆菌, 嗜酸乳杆菌	A4, S5
11	低脂发酵乳	2011-05-03	活性乳酸菌: 嗜热链球菌, 嗜酸乳杆菌, 双歧杆菌	A4, S6
12	酸奶	2011-04-27	活性乳酸菌(嗜酸乳杆菌, 双歧杆菌, 干酪乳杆菌)	A4, S7
13	发酵乳	2011-06-03	乳双歧杆菌, 保加利亚乳杆菌, 嗜热链球菌	A2, S2
14	乳酸菌饮料	2011-05-30	干酪乳杆菌干酪亚种(Lc01-活力C菌)	A2, S3
15	优酪乳	2011-05-23	保加利亚乳杆菌, 嗜热链球菌, 嗜酸乳杆菌, 双歧杆菌	A2, S4
16	酸牛奶	2011-06-04	嗜热链球菌, 乳双歧杆菌BB-12, 保加利亚乳杆菌, 嗜酸乳杆菌	A2, S5
17	发酵乳	2011-06-08	嗜热链球菌, 保加利亚乳杆菌, 乳双歧杆菌, 长双歧杆菌, 嗜酸乳杆菌	A2, S6
18	酸奶	2011-06-13	干酪乳杆菌, 两歧双歧杆菌, 保加利亚乳杆菌, 嗜热链球菌, 嗜酸乳杆菌	A2, S7
19	发酵乳	2011-06-09	保加利亚乳杆菌, 嗜热链球菌, 乳双歧杆菌BB-12, 嗜酸乳杆菌	A5, S2
20	发酵乳	2011-6-03	保加利亚乳杆菌, 嗜热链球菌, 嗜酸乳杆菌	A5, S3
21	酸牛奶(原味)	2011-6-10	保加利亚乳杆菌, 嗜热链球菌	A5, S4
22	老酸奶	2011-06-05	保加利亚乳杆菌, 嗜热链球菌	A5, S5
23	酸牛奶	2011-05-27	嗜热链球菌, 保加利亚乳杆菌, 嗜酸乳杆菌, 乳双歧杆菌	A5, S6
24	酸奶	2011-05-24	嗜热链球菌, 保加利亚乳杆菌	A5, S7

注: 引物序列另行发表, 仅以编号代替。

2.2 基因序列分析

测序得到的原始数据(表2)先经过质量控制环节去除低质量的Reads得到有效Reads, 然后根据引物上条码序列信息对有效Reads中的混合样本进行区分, 然后利用核

糖体数据库项目(ribosomal database project, RDP)的16S数据库, 对测序的Reads利用序列拼接工具Bowtie进行定位标识, 只有当双末端Reads完全匹配数据库中的序列时该Reads才被保留。对于这些结果进行初步的统计, 24个样本中每个样本中测序得到的Reads总数, 每个样本中比对上RDP数据库的reads称为标识Reads, 每个样本中没有比对上RDP数据库的reads称为未标识Reads。

产品编号	总Reads数	RDP数据库匹配Reads数	RDP数据库未匹配Reads数
1	395248	158621	236627
2	252493	108407	144086
3	205927	89191	116736
4	403536	163826	239710
5	253850	114885	138965
6	150647	56188	94459
7	81007	32074	48933
8	48420	20245	28175
9	45001	18926	26075
10	89652	35776	53876
11	47973	21196	26777
12	29384	10761	18623
13	279405	108735	170670
14	176837	72180	104657
15	125512	47511	78001
16	258309	99074	159235
17	166270	71153	95117
18	105165	37361	67804
19	60881	27014	33867
20	30532	13557	16975
21	34061	13920	20141
22	74950	31808	43142
23	29737	14060	15677
24	20171	8429	11742

注: 第1列为酸乳制品名称; 第2列为经QC检验及Barcode分类的Reads; 第3列为RDP数据库中Reads比对结果。

2.2.1 同一种产品标示菌株信息和实际测序信息比对

根据比对上的细菌种类进行分类统计, 比对上同一种细菌的Reads被归并为一类并统计数量, 分析时, 同种菌(或同亚种菌)不同菌株合并分析获得每一个品牌中的细菌数量情况见表3。

2.2.2 同一菌株在不同产品中所获得的序列信息比对

根据Reads的核苷酸序列进行统计, 如果核苷酸序列完全相同, Reads被归为一类, 称为唯一Reads(unique reads), 同时应注意排除Reads核酸序列输出时的正反向问题, 最后根据Bowtie比对的结果统计每一个单一Reads比对上的细菌情况并统计数量。其中, 本实验组根据Solexa技术中可能出现的错误率确定了一个序列筛选的界限值为小于1%, 即计算该产品的Reads总数乘以1%的值(trimmed reads), 同时计算产品中同一Reads序列出现的数量(unique reads), 如果后者小于前者, 则该序列可能是由

表 3 24种益生菌产品中16S rDNA分析
Table 3 16S rDNA analysis of 24 probiotic products

产品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Streptococcus thermophilus</i>	46475	26986	11023	29234	30195	17197	12174	6144	3663	10154	6994	4078
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	28216	11075	11193	68159	11428	13588	4236	1602	1721	11900	1542	2171
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	24230	3997	5280	6846	8417	3397	4438	806	1342	1638	1502	654
<i>Lactobacillus casei</i>	6876	16501	1149	1926	1421	1025	1334	2966	263	430	298	199
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	4903	372	299	570	325	217	907	84	67	110	62	28
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	443	180	1151	473	175	151	123	37	217	96	41	30
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	330	642	161	946	169	107	77	103	47	218	48	22
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	84	136	72	76	54	186	25	36		23	12	33
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	29	156	4	7	35	32		7			2	
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	1											
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>		2						2	3			
产品编号	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>Streptococcus thermophilus</i>	45386	25001	12380	30798	29185	16240	15596	7085	5909	14329	7701	4627
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	15249	5829	5488	37941	5845	7933	4261	1583	2386	11581	1595	1944
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	16159	2492	2996	3726	5090	1965	2479	292	537	617	680	303
<i>Lactobacillus casei</i>	9360	16666	2754	4922	2726	1882	803	1648	211	323	169	114
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2812	204	156	279	189	108	389	21	35	51	27	16
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	324	122	718	307	132	73	379	146	435	465	142	94
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	758	877	483		429	241	44	86	32	158	15	14
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	203	176	138	193	106	180	23	25	16	21	5	30
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	12	34	1	3	15	17	2	1	5			1
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>												
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	3	18	1	1	11	6		1			1	

于方法本身引入的小量错误数据，应予以舍弃。

按照产品标示的菌株情况对获得的Reads及其分类结果重新分析。如果这些唯一Reads序列中含有需要的细菌名称则保留并且统计数量情况，得到每个产品中标示细菌对应的种类以及数量。对于剩下的那些没有比对上的唯一Reads则对于每一个唯一Reads比对上的细菌种类按照属进行统计，并选取数量最高的来代表这一个唯一Reads的可能比对菌株。

最后将比对上标示菌株的唯一Reads并且按照不同样本进行分类簇分析，结果发现同一个细菌在不同样本中的唯一Reads存在完全相同或者仅仅一两个bp的移位并非错配差异，经手工修正后，仅德式乳杆菌保加利亚亚种和德式乳杆菌德式亚种在1个位点上存在差异。

3 讨论

动态的、完整的描绘益生菌产品中微生物的组成和丰度对于正确评价益生菌制剂的质量具有重要意义。分子生物学方法的应用能够根据益生菌基因序列的特异性进行群间、属间、种间、亚种间、乃至菌株之间的鉴定。分子生物学技术的应用，为益生菌的研究提供了有力的技术手段，不需要进行繁杂的微生物培养，简单快速。在菌株的鉴定和鉴别中，多采用16S rRNA基因^[13-14]，因其序列大小适中，约1.5kb左右，序列高度保守，既能体现不同菌属之间的同源性和差异^[13]，又能利用测序技术快速得到核酸序列，

是理想的基因鉴定靶序列^[14-15]。而2代测序技术的出现，为研究复杂的微生物群体提供了更为精准有效的工具。

国外已对市售乳酸菌产品进行了各项研究，包括所含菌株和标识菌株一致性，产品中菌株的种类、数量等，采用的技术包括分子生物学技术^[16-19]，蛋白质组技术^[20]等，存在的主要问题包括标示菌株与产品内含菌株数量或种类差异较大，活菌数量较少等^[20-21]。而在技术上多采用RAPD或RFLP技术，这些方法也存在重现性较差、难以得到更多的序列精细信息等问题^[22]。

在本研究所选取的24种产品中，除产品20和23外，在标示和实际测序获得的菌株对比中均存在差异，主要表现在标示菌株少于实际添加菌株，如产品2仅标示双歧杆菌，产品4仅标示嗜酸乳杆菌，多数产品标示菌株少于实际添加菌株；标示菌株名称过于笼统，仅到种属，不到株，如产品1标示为乳酸菌，产品15中仅标示双歧杆菌；所有的24种产品中，所有产品的菌株均含有嗜热链球菌、德式乳杆菌保加利亚亚种或德式亚种、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、动物双歧杆菌(除产品16不含有动物双歧杆菌)。同时，由于目前大多数益生菌产品的生产，多购买采用丹尼斯克、汉森等国外公司的商品化发酵菌种，也导致了产品中菌株的组成相似度较高。

在测序获得的序列信息中，嗜热链球菌、德式乳杆菌保加利亚亚种或德式亚种、嗜酸乳杆菌基本在每种产品中都排在菌种数量的前3位，而除在16号产品中标示的动物双歧杆菌缺失、1号产品中含有未标示的长双歧杆

菌以外,在其他产品中均测得双歧杆菌序列,但数量远低于其他菌种的含量,最高数量仅为946个Reads,最低Reads数为14。推测可能原因有两个,一是由于本实验所使用的DNA提取试剂盒对革兰氏阴性菌的细菌裂解和DNA提取得率更高,而对双歧杆菌属革兰氏阳性菌DNA得率较低,二是因为双歧杆菌属严格厌氧菌,生长保存条件较为苛刻,在产品中数量已经较少。

本研究针对同一菌种在不同产品中的序列差异进行了分析,结果表明,不同产品中同一菌株的序列基本一致,仅有德式乳杆菌保加利亚亚种和德式乳杆菌德式亚种在1个位点上存在差异,而两种菌在亲缘关系上距离较近,它们的16S保守区同源性也较高,因此存在的碱基差异可能是同一细菌菌株的多态性,也可能是不同产品中使用了不同菌株的结果,具体原因需要进一步的实验验证。

本研究利用Solexa二代测序技术对市售的酸乳制品中所含的乳酸菌进行了菌株含量和种类的分析,避免了乳酸菌难以培养以及培养中带来的误差等问题,表明了深度测序是一种可快速有效对食品中微生物群体精确筛查的技术,是一种能够精确深入的了解食品中微生物群落的方法^[23]。对于已知或未知的微生物群体的筛查研究是一种极为有效的工具。研究中也发现,Reads与数据库中的比对也存在1个Reads比对上多个细菌种类的情况,并且这些情况下无法利用这些单一Reads(unique reads)来区分这些同时比对上的细菌种类,这有赖于数据库中信息量的扩大丰富以及将16S以外的其他序列信息纳入到实验的比较研究范围中,这一点也是Solexa测序应用中的一个局限之处。

参考文献:

- [1] 杜鹏,霍贵成. 国内外益生菌制品发展现状[J]. 食品科学, 2004, 25(5): 194-198.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 卫法监发(2001)84号附件益生菌类保健食品评审规定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [3] ISHIBASHI N, YAMAZAKI S. Probiotics and safety[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 73(Suppl 2): 465-470.
- [4] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 73-88.
- [5] 袁铁铮,姚斌. 分子水平上益生菌研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(10): 27-33.
- [6] 李海星,曹郁生,付琳琳,等. AFLP技术对发酵酸面团中乳酸菌多态性的研究[J]. 微生物杂志, 2005, 25(5): 50-53.
- [7] 么山山,袁佩娜. 应用RAPD技术鉴别微生态菌种[J]. 中国微生态学杂志, 2002, 14(6): 315-317.
- [8] 杭晓敏,范小兵,张和春,等. DNA指纹图谱在乳酸菌分类鉴定中的应用[J]. 中国微生态学杂志, 2005, 17(5): 327-328.
- [9] 都立辉,刘芳. 16S rRNA基因在细菌菌种鉴定中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2006(5): 207-209.
- [10] ALEGRIA A, SZCZESNY P, MAYO B, et al. Biodiversity in Oscypek, a traditional polish cheese, determined by culture-dependent and -independent approaches[J]. Applied Environmental Microbiology, 2012, 78(6): 1890-1898.
- [11] WANG Tingting, CAI Guoxiang, QIU Yunping, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers[J]. The ISME Journal, 2012, 6(2): 320-329.
- [12] MATSUKI T, WATANABE K, TANAKA R, et al. Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers[J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 167(2): 113-121.
- [13] CLOONAN N, FORREST A R, KOLLE G, et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing[J]. Nature Methods, 2008, 5(7): 613-619.
- [14] 高娃,于洁,乌兰,等. 蒙古国传统发酵乳中部分乳杆菌16S rRNA-RFLP的分类[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(1): 4-7.
- [15] LAZZI C, BOVE C G, SQARBI E, et al. Application of AFLP fingerprint analysis for studying the biodiversity of *Streptococcus thermophilus*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 79(1): 48-54.
- [16] COEURET V, GUEGUEN M, VERNOUX J P. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 97(2): 147-156.
- [17] SCHILLINGER U, YOUSIF N M, SESAR L, et al. Use of group-specific and RAPD-PCR analyses for rapid differentiation of *Lactobacillus* strains from probiotic yogurts[J]. Current Microbiology, 2003, 47(6): 453-456.
- [18] PEREA V M, HERMANS K, VERHOEVEN T L, et al. Identification and characterization of starter lactic acid bacteria and probiotics from Colombian dairy products[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(3): 666-674.
- [19] LIN W H, HWANG C F, CHEN L W, et al. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products[J]. Food Microbiology, 2006, 23(1): 74-81.
- [20] HOLZAPFEL W H, HABERER P, GEISEN R, et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 73(Suppl 2): 365-373.
- [21] HUYS G, van CANNEYT M, D'HAENE K, et al. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use[J]. Research in Microbiology, 2006, 157(9): 803-810.
- [22] MARCOBAL A, UNDERWOOD M A, MILLS D A. Rapid determination of the bacterial composition of commercial probiotic products by terminal restriction fragment length polymorphism analysis[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2008, 46(6): 608-611.
- [23] LEGENDRE M, AUDIC S, POIROT O, et al. mRNA deep sequencing reveals 75 new genes and a complex transcriptional landscape in mimivirus[J]. Genome Research, 2010, 20(5): 664-674.