

PCR-DGGE 指纹技术与分离技术结合筛选藏灵菇奶 发酵过程的优势菌

周剑忠, 董明盛, 江汉湖

(南京农业大学食品科技学院, 南京 210095)

摘要: 【目的】获得藏灵菇发酵奶发酵过程的优势菌, 并开发出纯培养发酵剂替代藏灵菇进行这类新型发酵奶的工业化生产。【方法】将 PCR-DGGE 指纹技术和传统培养方法结合, 对藏灵菇发酵奶中微生物种群结构进行研究。【结果】DGGE 指纹图谱显示混合菌群中细菌有 4 条条带无对应的纯菌株, 而纯菌株中有 2 株在混合菌群的图谱上没有相应的条带。通过对 150 株分离菌的 PCR-DGGE 指纹图谱分析, 获得了 8 组乳酸菌和 5 组酵母菌, 进一步的序列分析和相似性比较, 确立了藏灵菇发酵奶中的优势菌为肠膜明串珠菌、乳酸乳球菌、开菲尔乳杆菌、干酪乳杆菌和克鲁维酵母, 单孢酵母、啤酒酵母、假丝酵母发酵后期成为优势菌。【结论】本研究建立了一种基于分子生态的微生物高效筛选技术, 为藏灵菇纯培养发酵剂的开发提供了理论依据及丰富的菌种资源。

关键词: 藏灵菇; PCR-DGGE; 微生物多样性; 优势菌; 筛选

Screen of Dominating Microbial Species Isolated From Tibetan Kefir Using an Integrated Approach of PCR-DGGE and Culture-Dependent Methods

ZHOU Jian-zhong, DONG Ming-sheng, JIANG Han-hu

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: 【Objective】To screen dominating microbial species isolated from Tibetan Kefir and develop pure-culture starter. 【Method】PCR-DGGE and traditional culture-depending methods were combined to examine the microbial community of Tibetan kefir. 【Result】Four bands in the DGGE profiles of total bacterial DNA of Tibetan kefir were not recovered by cultivation. Conversely, two bacterial species did not exhibit bands in DGGE fingerprints of total bacterial DNA of Tibetan kefir. 150 strains isolated were screened and grouped by PCR-DGGE, eight lactic acid bacteria and five yeasts were obtained. Comparison of 16S rDNA (bacteria) and 26S rDNA (yeast) partial sequence similarity revealed that the dominating microbial species of Tibetan kefir were *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus casei* and *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida humilis* were dominating during last fermentation. 【Conclusion】An effective microbial screening technology based on molecular microbiology was established in this study, providing theoretical basis and rich microbial resources for the development of Tibetan Kefir pure-culture starter.

Key words: Tibetan kefir; PCR-DGGE; Microbial diversity; Dominating microbial species; Screen

0 引言

【本研究的重要意义】目前民间流行用藏灵菇泡牛奶, 待牛奶酸化后饮用, 据说长期饮用能增强人体

免疫力, 补充维生素, 延缓衰老, 消除疲劳, 特别适合胃病、肾病、肝胆病患者。藏灵菇不是菇类(大型真菌), 它是一种乳白色、胶质状的块状物(由微生物产生的胞外多糖与乳蛋白聚合而成), 外形酷似米

收稿日期: 2005-09-28; 接受日期: 2006-06-13

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2002AA248041)

作者简介: 周剑忠(1965), 男, 江苏宜兴人, 博士研究生, 研究方向为微生物及生物技术。Tel: 025-84396989; E-mail: zjzhou2005@yahoo.com.cn。
通讯作者江汉湖(1937-), 男, 福建长汀人, 教授, 研究方向为微生物及生物技术。Tel: 025-84396989; E-mail: hanhujiang2008@yahoo.com.cn

粒,上面栖息着多种微生物,经过长期在牛奶中培养,个体会增大很多,形状如盛开的雪莲(图 1),所以有人称之为西藏雪莲。藏灵菇是一种天然的乳品发酵剂,有良好的发酵特性,用它制作的酸奶与传统的酸奶或用其它纯种乳酸菌发酵剂制成的产品有很大的不同,最显著的特征是除乳酸发酵外,还伴有轻微的由酵母菌引起的酒精发酵,是一种集酸味、醇味于一体的新型发酵乳制品,将其作为乳品家族的一个新品加以开发,具有很好的市场前景。目前这种产品都是以藏灵菇为发酵剂进行制作,由于藏灵菇上微生物的组成比较复杂,用发酵剂传代的方法进行扩大生产,极易发生菌相失衡,使发酵乳的风味和品质发生变化,失去原有的优良特征,限制了它的工业化生产。如何运用现代先进的生物技术,研究开发既能保持传统风味,又能简化工艺和稳定生产的纯培养发酵剂,是一个急需解决的问题。【前人研究进展】目前,对藏灵菇的研究刚刚起步,相关的报道还很少,2003年,肖琳琳等从藏灵菇中分离到一株有效降胆固醇的菌株^[1]。2004年,刘变芳等对藏灵菇进行了切片观察,微生物分离及初步鉴定,从中分离出3株酵母菌和4株乳酸菌^[2]。

【本研究切入点】目前对传统发酵食品中微生物的研究,还是应用分离、纯化、鉴定的方法,需要进行一系列繁杂的形态特征和生理生化试验,这种方法最大的缺点是,即使使用最复杂的试验组合也不能对分离物进行精确鉴定,不能反映分离物间的系统发育关系,不能获得微生物多样性的真正概貌^[3,4]。近年来,基于16S rDNA的分子生物学技术促进了微生态研究的发展,特别是被称为DNA指纹技术的变性梯度凝胶电泳法(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)能有效分析复杂微生物群落及其多样性且无需培养微生物,而越来越受到重视。DGGE基本原理是长度相同而碱基组成不同的DNA序列在不同变性条件(如尿素浓度)下变性,在变性梯度凝胶上特定位置形成泳带。该技术既可以用于传统发酵产品中微生物的种群结构分析,也可以用来对分离出的纯菌株进行分组和筛选,减少分子或生化鉴定的数量,具有快速可靠的特点。如Fasoli等用标准的益生菌菌株进行16S rDNA的V2-V3区扩增, DGGE电泳,建立了一个分子Marker,用于酸奶及益生菌制剂中益生菌的分析^[5]。Ampe等对南美洲传统的发酵酸淀粉中微生物群落用PCR-DGGE指纹技术进行了研究,使用了多种乳酸菌的标准菌株,在DGGE指纹图谱上建立了由各

种标准菌株条带组成的泳道(相当于分子Marker),将其它样品DGGE指纹图谱中各种微生物条带与它相对照,对样品中各种乳酸菌所对应的条带进行初步鉴定^[6]。【拟解决的关键问题】本研究采用PCR-DGGE指纹技术与传统的培养技术相结合的方法,对藏灵菇奶发酵过程中优势菌进行筛选,以期对藏灵菇奶纯培养发酵剂的开发奠定基础。



图1 藏灵菇粒

Fig. 1 Tibetan kefir grains

1 材料与amp;方法

1.1 藏灵菇的来源及培养

笔者于2004年在南京农业大学食品微生物实验室将从西藏牧民家采集来的藏灵菇放在10%(w/v)的无菌脱脂牛奶中,置于18℃环境,每隔2d更换1次牛奶。

1.2 样品准备

将藏灵菇滤出,按5%的量加入无菌脱脂奶中,置20℃培养箱,培养20h,期间每隔4h抽样进行乳酸菌和酵母菌的分离,发酵结束时取的样品还需进行细菌和酵母菌总DNA抽提。

1.3 藏灵菇发酵奶中乳酸菌的分离

将样品用无菌生理盐水作适当稀释后,各取100μl分别涂布在Lee固体培养基^[7]、MRS固体培养基和HP固体培养基^[8]上,MRS平板放在厌氧罐中, Lee和HP平板直接放在普通生化培养箱中,30℃培养72h,观察并记录菌落特征,并挑取不同形态单个菌落,再分别划线接种于MRS、Lee和HP固体培养基上,30℃培养48h,重复5次纯化乳酸菌,得到乳酸菌纯菌株,然后进行革兰氏染色和过氧化氢试验,对具有

革兰氏染色阳性和过氧化氢试验阴性的菌株接种到 MRS 液体培养基中, 30℃ 培养 24 h, 进行 DNA 抽提。

1.4 藏灵菇发酵奶中酵母菌的分离

将样品用无菌生理盐水作适当稀释后, 取 100 μl 涂布在 YGC (葡萄糖 20 g, 酵母膏 5 g, 氯霉素 0.1 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 L, pH 6.6) 固体培养基上, 28℃ 培养 48 h, 挑选不同形态的单个菌落在 YGC 固体培养基上划线, 28℃ 培养 48 h, 重复纯化得到酵母菌的纯菌株。然后接种到 YPD 液体培养基(酵母粉 10 g, 胰蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 L, pH 6.6) 中, 28℃, 180 r/min 振荡培养 24 h, 进行 DNA 抽提。

1.5 DNA 提取

样品中细菌总 DNA 的提取参考文献[9]的方法。样品中酵母总 DNA 的提取参照文献[10]的方法。

1.6 PCR-DGGE 分析

1.6.1 PCR 扩增 细菌 PCR 扩增对象为细菌 16S rDNA 的 V3 可变区^[11]: 上游引物为 338fGC(5'>CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG<3'), 下游引物为 518R(5'> ATT ACC GCG GCT GCT GG <3')。

酵母 PCR 扩增对象为酵母 26S rDNA 的 D1 区^[10]:

上游引物为 NL1GC (5'> GCG GGC CGC GCG ACC GCC GGG ACG CGC GAG CCG GCG GCG GGC CAT ATC AAT AAG CGG AGG AAA AG <3'), 下游引物为 LS2 (5'> ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC <3')。

上述引物均由上海生工合成提供。

PCR 扩增在梯度 PCR 仪(Mycycler Bid-rad, USA) 上进行。PCR 反应体系 (50 μl): 模板 DNA 2 μl , 1 \times PCR 缓冲液, 0.2 mmol·L⁻¹ dNTP, 引物 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Taq DNA 聚合酶 1.25U, 补充 ddH₂O 至终体积 50 μl 。PCR 试剂盒购自 Takala 公司。

总 DNA 扩增采用降落 PCR, 反应程序为 94℃ 预变性 4 min, 先 20 个循环 (94℃ 变性 30 s, 退火温度从 65℃ 到 55℃, 每个循环降低 0.5℃, 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s), 再于恒定退火温度下进行 10 个循环 (94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s), 最终 72℃ 延伸 10 min。

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, -20℃ 冰箱保存备用。

1.6.2 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) PCR 产物的 DGGE 分析在 Bio-Rad Dcode System (美国) 上进行,

聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8% (丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 37.5:1)。变性梯度从 30% 到 50% (100% 变性剂含有 7 mol·L⁻¹ 尿素和 40% 甲酰胺), 在 1 \times TAE 缓冲液中, 先 200V 预电泳 5~10 min, 然后在 85V 的固定电压下电泳 12~14 h。银染后用凝胶成像系统进行照相。图像分析用 Quantity one (Bio-rad) 分析软件进行分析。

1.6.3 DNA 的回收测序 切下 DGGE 胶上不同位置的条带, 分别放入 1.5 ml EP 管中, 用 DNA 回收试剂盒进行 DNA 回收, 纯化。以回收 DNA 及纯菌株 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 细菌引物为 338f (5'> ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG <3'), 518r (5'> ATT ACC GCG GCT GCT GG <3'); 酵母引物为 NL1 (5'>GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G <3')、LS2 (5'> ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC <3'), 扩增程序: 94 预变性 4 min, 30 个循环 (94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s), 最终 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检验后, 送上海生工公司测序。登陆 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), 将所得序列与数据库中已知序列进行比较。用 Clustal X 和 DNASTar 进行相似性分析。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌和酵母菌的分离及细胞形态观察

从不同发酵时间, 不同稀释度的 MRS、Lee 和 HP 培养平板上共挑选了 120 个菌落, 经革兰氏染色鉴定为阳性, 过氧化氢反应为阴性, 初步鉴定为乳酸菌。用显微镜 (Nikon ECLIPSE 80i, 日本) 观察细胞形态, 其中 65 个是杆菌, 55 个是球菌; 从 YGC 培养平板上挑选 30 个菌落, 并用显微镜观察细胞形态 (图略); 从 Lee 培养基上挑取大的乳白色菌落, 用显微镜观察发现酵母细胞吸附球菌的现象 (图 2)。

2.2 藏灵菇发酵奶中混合菌群和分离的纯菌株的 PCR-DGGE 指纹图谱分析

这些乳酸菌和酵母菌的单菌落经进一步纯化后, 用 PCR-DGGE 指纹图谱进行筛选, 通过比较图谱上条带的迁移距离, 将具有相同迁移的归为一组, 乳酸菌共获得 8 组, 酵母菌共获得 5 组。每组选一株菌与藏灵菇发酵奶中混合菌群进行 PCR-DGGE (图 3)。可以看出, 乳酸菌纯菌株中有 4 个泳道的条带与细菌群落结构中优势菌相对应, 它们分别是 A-H5、B-L3、C-M7、D-M2; 酵母菌中也有 4 个泳道的条带与酵母群落结构中的条带相对应。

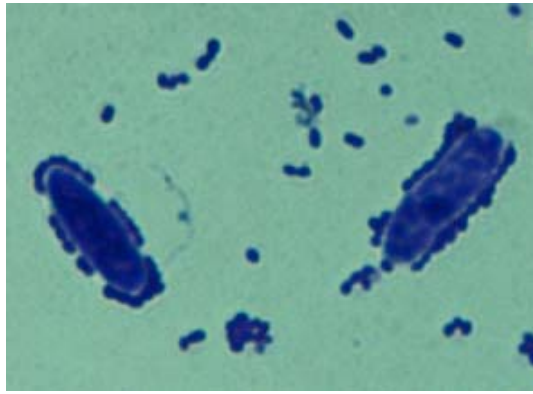


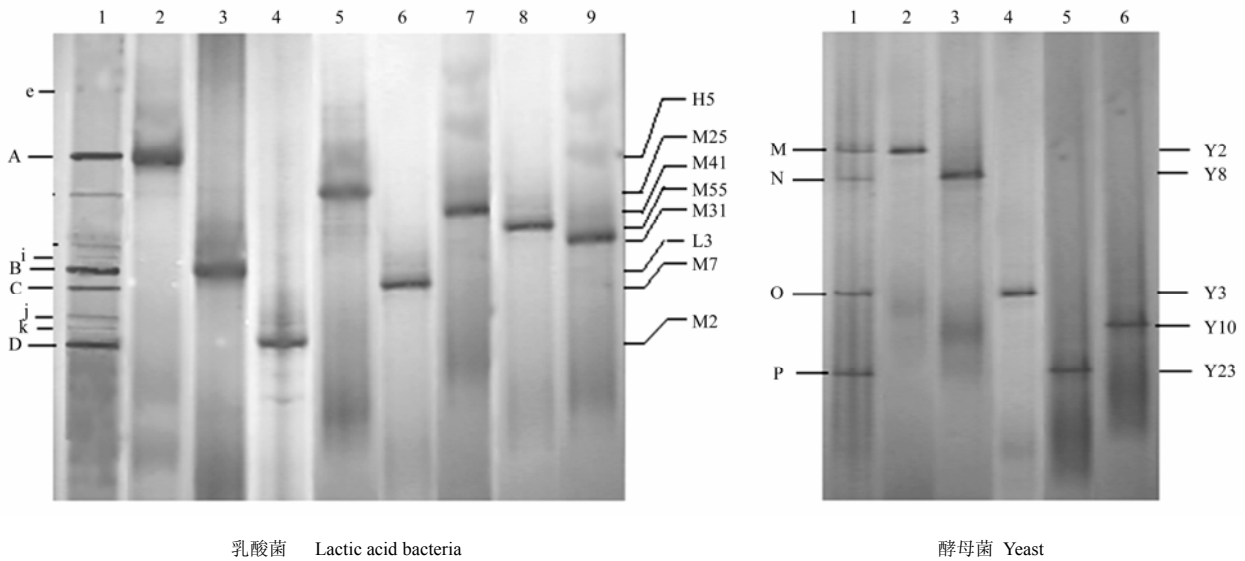
图 2 啤酒酵母+乳酸乳球菌

Fig. 2 *Saccharomyces cerevisiae* + *Lactococcus lactis*

2.3 细菌 16S rDNA 和酵母 26S rDNA 部分序列测序及序列分析

对细菌群落结构中亮度较强的条带的 DNA 以及分离的乳酸菌的 16S rDNA V3 可变区, 酵母群落结构中条带的 DNA 及分离的酵母菌的 26S rDNA 的 D1 区测序, 然后用软件 Clustal X 和 DNASTar 将这些序

列与 GenBank 数据库中的参考序列进行相似性分析 (图 4)。图 4-A 的分析结果表明, 分离的 8 个纯菌株分别是肠膜明串珠菌 (H5)、乳酸乳球菌 (L3)、开菲尔乳杆菌 (M7)、干酪乳杆菌 (M2)、保加利亚乳杆菌 (M15)、嗜酸乳杆菌 (M25)、发酵乳杆菌 (M41)、开菲尔囊乳杆菌 (M31)。图 4-B 的分析结果表明, 分离出的 5 组酵母分别为单孢酵母 (Y2)、啤酒酵母 (Y3)、假丝酵母 (Y10)、克鲁维酵母 (Y8)、毕赤氏酵母 (Y23)。表中归纳了藏灵菇发酵奶中混合菌群和从中分离的乳酸菌、酵母菌的相似性分析结果。表的左半部分为藏灵菇混合菌群中 DGGE 图谱中较强条带所对应菌的种属及相似性, 右半部分是分离的纯菌种所对应的菌的种属及相似性。分离的 8 组乳酸菌中有 4 组菌的鉴定结果与混合菌群中优势菌相对应, 5 组酵母菌中有 4 组与混合菌群中的各种酵母相对应。从测序的 24 个纯菌株的结果看, 共获得 8 种乳酸菌、5 种酵母菌。处于同一组的菌株有相同的序列。例如 L3、L18、L42 经序列比对及相似性分析, 结果都是乳酸乳球菌。



A、B、C、D 及 e、i、j、k 分别为藏灵菇奶中细菌菌群对应的条带, 其中 A、B、C、D 是优势菌; M、N、O、P 分别为藏灵菇奶中酵母菌群对应的条带。H5、M25、M41、M55、M31、L3、M7 和 M2 分别为从藏灵菇中分离的乳酸菌纯菌株对应的条带; Y2、Y8、Y3、Y10 和 Y23 分别为从藏灵菇中分离的酵母菌纯菌株对应的条带。
A, B, C, D and e, i, j, k indicate the corresponding band of bacterial community in Tibetan Kefir, respectively; M, N, O, P indicate the corresponding band of yeast community in Tibetan Kefir, respectively; H5, M25, M41, M55, M31, L3, M7 and M2 indicate the corresponding band of pure LAB isolated from Tibetan Kefir, respectively; Y2, Y8, Y3, Y10, Y23 indicate the corresponding band of pure yeast isolated from Tibetan Kefir, respectively

图 3 藏灵菇发酵奶中微生物群落 (1) 及从中分离的纯菌株 (2~9) PCR-DGGE 指纹图谱

Fig. 3 DGGE analysis of PCR-amplified 16Sr DNA Fragments microbial communities (1) and pure culture isolated (2-9) from Tibetan kefir

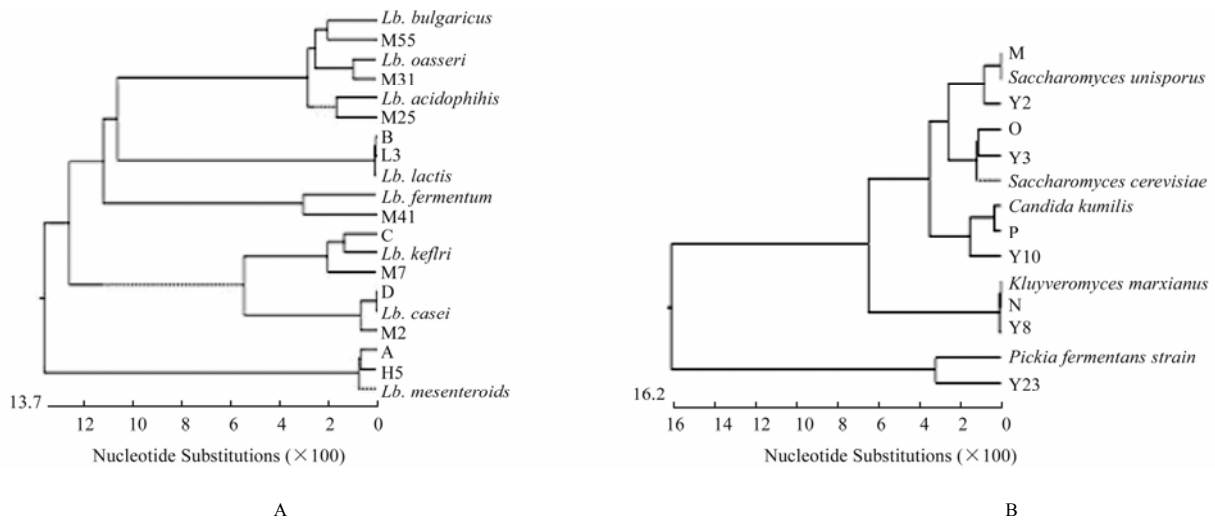


图 4 藏灵菇发酵奶中优势微生物的 DGGE 条带及从中分离的细菌的 16S rDNA V3 区序列 (A) 和酵母的 26S rDNA D1 区序列 (B) 与 GenBank 数据库中相关序列的相似性分析

Fig. 4 Relationships of partial 16S rDNA (26S rDNA) sequences derived DGGE bands and pure culture isolated from Tibetan kefir to those of reference organisms obtained from GenBank

表 藏灵菇发酵奶中优势微生物的 DGGE 条带与从中分离纯菌株的 16S rDNA, 26S rDNA 部分序列相似性的比较

Table Comparison of partial 16S rDNA or 26S rDNA sequences similarity by sequencing of DGGE bands of dominating microbe and pure culture isolated from Tibetan kefir

细菌及酵母菌优势菌 DNA 的 DGGE 条带 DGGE bands of dominating microbe			分离的纯菌株 Pure culture isolates		
条带编号 Band No.	亲缘关系最近的菌株 Closest relatives	相似性 ID (%)	菌株代号 Isolate No	亲缘关系最近的菌株 Closest relatives	相似性 ID (%)
乳酸菌 Lactic acid bacteria					
A	肠膜明串珠菌 <i>Leu. mesenteroides</i>	100	H5, H44	肠膜明串珠菌 <i>Leu. mesenteroides</i>	98.7
B	乳酸乳球菌 <i>Lc. Lactis</i>	100	L3, L18, L42	乳酸乳球菌 <i>Lc. lactis</i>	100
C	开菲尔乳杆菌 <i>Lb. kefir</i>	94.1	M7, M32	开菲尔乳杆菌 <i>Lb. kefir</i>	96.8
D	干酪乳杆菌 <i>Lb. casei</i>	99.4	M2, M13, M18	干酪乳杆菌 <i>Lb. casei</i>	98.1
			M25, M38	嗜酸乳杆菌 <i>Lb. acidophilus</i>	92.9
			M41	发酵乳杆菌 <i>Lb. fermentum</i>	94.2
			M55	保加利亚乳杆菌 <i>Lb. bulgaricus</i>	96.1
			M31	格氏乳杆菌 <i>Lb. gasseri</i>	98.1
酵母菌 Yeast					
M	单孢酵母 <i>S. unisporus</i>	100	Y2, Y17	单孢酵母 <i>S. unisporus</i>	98.5
N	克鲁维酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	100	Y8, Y21, Y32	克鲁维酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	100
O	啤酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	100	Y3, Y29	啤酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	97.9
P	假丝酵母 <i>Candida humilis</i>	99.5	Y10	假丝酵母 <i>Candida humilis</i>	96.4
			Y23	毕赤氏酵母 <i>Pichia fermentans</i>	94

3 讨论

3.1 常规的分离与非培养(PCR-DGGE)技术在研究传统发酵食品微生物群落结构中的差异

本研究将 PCR-DGGE 指纹图谱技术与常规的分离技术相结合应用于传统发酵食品中优势菌的筛选,图 3 的结果显示,用非培养的方法(PCR-DGGE)直接从藏灵菇发酵奶获得的微生物群落结构与用培养技术获得的有一定的差异,条带 e、i、j、k 在分离菌的条带中没有出现,条带 M41、M55 在细菌群落 DGGE 指纹图谱上没有显示,这可能是由于 DNA 抽提或 PCR 扩增所致,在 DNA 抽提过程中,群落中含量很少的一些菌株,用常规的 DNA 提取方法可能提不到或提到微量的 DNA,这会影响其 PCR 扩增,Heuer 等报道了在 PCR 过程中群落结构中相对丰富的菌株由于竞争作用会影响某些菌株的扩增^[12],这些菌株可通过选用不同培养基富集培养得到,例如醋酸菌,由于其在藏灵菇中的含量低,在 DGGE 指纹图谱中没有出现醋酸菌条带,因此本研究没有对其进行研究。

3.2 PCR-DGGE 指纹图谱技术可用于分离菌株的筛选和鉴定

自从 Ampe 于 1999 年首次将 PCR-DGGE 指纹图谱技术应用于食品微生物的研究以来,在国外该技术已广泛用于传统发酵食品中微生物种群结构和种群动力学^[13,14]研究;食品中分离菌株的筛选、分组及鉴定^[15];对发酵食品品质的评估及产品的质量控制^[16]。本研究用 PCR-DGGE 指纹图谱技术对分离到的 120 个乳酸菌菌株、30 个酵母菌菌株进行筛选和分组,获得了 8 种乳酸菌,5 种酵母菌。与传统的分离技术相比,具有快速,全面的特点。

3.3 乳酸菌和酵母菌的共生

在对分离到的菌株进行细胞形态观察时,首次发现酵母菌的细胞周围整齐排列着乳酸球菌的现象,经 5 次划线分离,始终存在这种现象。经查阅大量的文献,未见类似的报道。国外在对这类由乳酸菌和酵母菌共同参与发酵的发酵剂的研究中,普遍认为,乳酸菌和酵母菌之间存在共生关系,但相关的研究很少,这种菌相间的互动、共生关系的机理至今还是一个迷。

3.4 本研究的意义

由于藏灵菇中微生物的组成比较复杂,在自然发酵状态下,用藏灵菇制作的发酵奶会随季节和周围环境的变化,在风味和质地方面会发生一定的变化。另

外,在制作过程中需要进行藏灵菇的回收,清洗等处理,操作比较麻烦。不同地区,不同来源的藏灵菇制作的酸奶存在一定差异,很难依靠藏灵菇原粒来进行这种发酵奶的规模化生产,只有开发出纯培养发酵剂才能进行稳定的工业化生产。因此,本研究利用现代生物技术,从藏灵菇发酵奶中筛选出优势菌株,为纯培养发酵剂的开发提供了丰富的菌种资源,而且具有自主知识产权。

4 结论

首次应用 PCR-DGGE 指纹图谱技术与传统分离技术相结合,应用于藏灵菇发酵奶中优势菌株的筛选,为将这种产品进行产业化奠定基础。在试验中共得到 13 株菌,其中 8 株乳酸菌、5 株酵母菌。结合藏灵菇发酵奶发酵过程的种群动力学分析(另文发表),确定了细菌菌群方面的优势菌为肠膜明串珠菌、乳酸乳球菌、开菲尔乳杆菌、干酪乳杆菌。酵母菌方面,在整个发酵过程中,克鲁维酵母一直是优势菌,单孢酵母、啤酒酵母、假丝酵母在发酵后期成为优势菌。

本研究运用现代生物技术建立了一种基于分子生态学的微生物高效筛选技术,为传统自然发酵食品纯培养发酵剂的研究提供了一种快速、有效的手段。

References

- [1] 肖琳琳,董明盛.干酪乳杆菌 KM-16 的筛选及其降胆固醇活性研究.中国乳品工业,2003,31(6):7-10.
Xiao L L, Dong M S. Screening and cholesterol-degrading activity of *Lactobacillus casei* KM-16. *China Dairy Industry*, 2003: 31(6): 7-10. (in Chinese)
- [2] 刘变芳,樊明涛,金丹.“西藏雪莲”中乳酸菌的分离鉴定及发酵性能研究.西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(增):83-86.
Liu B F, Fan M T, Jin D. Isolation of lactic acid bacteria from *Saussurea involucreta* and study of its fermentation performance. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Nat. Sci. Ed.)*, 2004, 32(Suppl.): 83-86. (in Chinese)
- [3] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59: 143-169.
- [4] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180: 4765-4774.
- [5] Fasoli S, Marzotto M, Rizzotti L, Rossi F, Dellaglio F, Torriani S.

- Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 82: 59-70.
- [6] Ampe F, Sirvent A, Zakhia N. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 65: 45-54.
- [7] Garrote G L, Abraham A G, De Antoni G L. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 2001, 68: 639-652.
- [8] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京:中国轻工业出版社, 1999: 85-102.
- Ling D W, Dong X Z. *Identification and Characterization and Experiment Method of Lactic Acid Bacteria*. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 85-102. (in Chinese)
- [9] Cocolin L, Innocente N, Biasutti M, Comi G. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 90: 83-91.
- [10] Cocolin L, Aggio D, Manzano M, Cantoni C, Comi G. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal*, 2002, 12: 407-411.
- [11] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695-700.
- [12] Heuer H K, Hartung K, Wielang G, Kramer I, Smalla K. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 1045-1049.
- [13] Ampe F, Ben Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot J P. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 5464-5473.
- [14] Ben Omar N, Ampe F. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 3664-3673.
- [15] Ercolini D, Hill P J, Dodd C E R. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 3540-3548.
- [16] Fasoli S, Marzotto M, Rizzotti L, Rossi F, Dellaglio F, Torriani S. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 82: 59-70.

(责任编辑 曲来娥)