

新疆哈密地区原驼乳中乳酸菌多样性分析

张苗苗, 倪永清* (石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000)

摘要 [目的]对新疆哈密地区原驼乳中乳酸菌的多样性进行分析。[方法]采用菌落培养及 Rep-PCR 指纹图谱、16S rRNA 基因测序和系统发育关系相结合的方法研究原驼乳内乳酸菌的菌群分布。[结果]从 9 份原驼乳中分离出 65 株乳酸菌, 分别归属于 *Lactococcus*、*Streptococcus*、*Enterococcus*、*Lactobacillus* 和 *Leuconostoc* 5 个属, 其中 *Leuconostoc* 所占比例最大, 达到 26%。[结论]新疆哈密地区原驼乳中蕴含丰富的乳酸菌菌种资源, 为开发新疆地区益生乳酸菌提供了依据。

关键词 原驼乳; 乳酸菌; 16S rRNA 基因测序

中图分类号 TS207.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)15-0163-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.15.046



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Biodiversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Camel Milk of Hami Area in Xinjiang

ZHANG Miao-miao, NI Yong-qing (College of Food, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract [Objective] To analyze the diversity of lactic acid bacteria in raw camel milk in Hami area of Xinjiang. [Method] The diversity of lactic acid bacteria was analyzed by using pure culture, repetitive genomic fingerprinting (Rep-PCR) analysis patterns and 16S rRNA gene sequence and phylogenetic relationship in the raw camel milk. [Result] A total of 65 strains of lactic acid bacteria were obtained from nine raw camel milk samples. The results showed that the isolated lactic acid bacteria mainly comprised five genera: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, and *Leuconostoc*. The dominant genus was *Leuconostoc*, which is up to 26%. [Conclusion] The abundant diversity of lactic acid bacteria in the raw camel milk of Hami area in Xinjiang provided rich resources for exploiting probiotic lactic acid bacteria products.

Key words Raw camel milk; Lactic acid bacteria; 16S rRNA gene sequence

随着经济水平的不断提高,人们更加关注健康问题。乳制品不再仅限于牛乳,营养丰富的羊乳和骆驼乳等也渐渐进入人们的视野^[1]。骆驼,早在几千年以前就被驯化,作为一种交通工具,它为物品的运输和文化的传播做出了不可磨灭的贡献^[2]。当前我国有 25 万峰的骆驼存栏数,新疆作为一个畜牧大区,骆驼存栏数就达到了 16 万峰,居全国之首^[3]。

骆驼奶有“沙漠软白金”和“长寿奶”的美誉^[4],其味道微甜,而且与人奶中的营养成分很接近,比牛奶的营养价值还高^[5]。骆驼乳中的乳蛋白、乳脂肪、乳糖、干物质含量比牛乳略高,与牛乳相比含有丰富的矿物质元素,钙、磷、钾的含量更高,镁的含量相对较低^[1]。据现代药理研究表明,驼乳具有抗氧化、保肝、消炎、抗菌的作用^[6],常喝驼乳可以滋养美容,增强抵抗力^[7],也可用于治疗糖尿病、结核病和女性疾病,防止儿童佝偻病等^[8]。驼奶作为新疆的主要特色乳,其研究和利用价值极其重要。目前,随着我国骆驼数量的逐渐下降,国家出台了一系列鼓励和支持特种乳发展的产业政策,新疆具有得天独厚的自然环境以及丰富的饲草资源^[9],一些少数民族自古就有饲养骆驼的传统,饮用驼乳及加工驼乳制品也有非常悠久的历史。在长期的自然演变中^[10],对人类有益的微生物群落传统发酵乳制品中被大量保留下来,特别是乳酸菌^[11]。这些乳酸菌资源是探索未知有益乳酸菌的绝佳宝库^[12]。新疆原奶资源丰富,采用古老、传统的方法,将发酵性能好、生命力强、传代好、具有地方特色的乳酸菌菌株从当地牧民生产的发酵奶制品中分离出来具有重要意义。这为今后研发和加工驼乳积累了经验^[13]。目前,

国内外对于驼奶的研究主要集中于成分、微生态、医药价值等方面^[14],在我国有关驼奶和酸驼奶的报道极少^[15]。为此,笔者对新疆哈密地区原骆驼奶乳酸菌进行初步分离、鉴定和遗传多样性分析,以促进原料骆驼奶和酸骆驼奶的开发和研究并筛选出具有良好发酵性能的菌株,旨在为生产乳酸菌发酵剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器。用于 PCR 扩增的全套试剂及扩增引物购自 TaKaRa 公司;PCR 仪为德国 Biometra 公司 Tprofessional;电泳仪为美国 BioRad 公司 PowerPac Universal;凝胶成像系统为法国 Vilber 多功能成像系统;生物显微镜为徕卡 DM3000;高速冷冻离心机为 Fresco21 型(德国 Thermo 公司)。

1.1.2 样品和培养基。该研究 9 份原驼奶于 2017 年 9 月采自哈密地区(HMT)各草原牧民家里。无菌收集约 40 mL 样品于 50 mL 无菌离心管中,置于 4 °C 的车载冰箱,24 h 内运回实验室,在无菌操作台上立即处理。实验人员在无菌条件下收集样品,后由实验人员立即将装有 25 mL 奶样的无菌离心管放置在 4 °C 的车载冰箱内,24 h 内运回实验室,-20 °C 保存,并尽快进行乳酸菌的分离。

MRS 培养基:蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 10.0 g,酵母提取物 5.0 g, K₂HPO₄ 2.0 g,柠檬酸二铵 2.0 g,乙酸钠 5.0 g,葡萄糖 20.0 g,吐温-80 1 mL, MgSO₄·7H₂O 0.58 g, MnSO₄·4H₂O 0.25 g,琼脂 15.0 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 6.2~6.4。

M17 培养基和乳酸杆菌选择性培养基:青岛高科园海博生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离纯化。参考 Lee 等^[16]的方法,在无菌条件下吸 1 mL 样品于 9 mL 的无菌生理盐水中,振荡混匀,采用

作者简介 张苗苗(1988—),女,新疆石河子人,硕士研究生,研究方向:食品生物技术。*通信作者,博士,教授,从事食品微生物、生物技术研究。

收稿日期 2019-03-22;修回日期 2019-05-07

梯度稀释液涂板法在 MRS 固体培养基、乳杆菌选择培养基、M17 琼脂培养基上 37 °C 倒置培养 48 h。从 3 种选择性培养基中挑取菌落颜色、大小、形态等不同的单菌落,接种于 MRS 琼脂培养基上,连续转接培养 3 次后,观察记录菌落形态并进行接触酶试验。挑取过氧化氢酶试验为阴性菌落接种于 MRS 肉汤培养基中,经 24 h 培养后进行革兰氏染色,在显微镜下观察记录细胞形态及排列方式,最终将革兰氏染色阳性、过氧化氢酶试验阴性的菌株确定为疑似乳酸菌,在新鲜培养基中补充 25% 的甘油重悬菌体置于-80 °C 保藏。

1.2.2 乳酸菌 Rep-PCR 指纹图谱分析。参考 Justé 等^[17]的方法提取菌株 DNA,选用 (GTG)5(5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTGGT-3')对疑似乳酸菌菌株进行 Rep-PCR 的扩增。将 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行检测,在 1×TAE Buffer 中 100 V 电泳 1.5 h。用凝胶成像系统观察并进行拍照分析^[18]。以 (GTG)5(5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTGGT-3')为引物,以筛选出乳酸菌的 DNA 为模板,进行 Rep-PCR 的扩增。将 PCR 的扩增产物在 1.5% (W/V) 的琼脂糖凝胶上上样,电泳液为 1×TBE Buffer,电压 100 V,电泳 30~60 min,待样品移至 3/4 位置时

停止电泳。在紫外凝胶成像仪中观察电泳结果并进行拍照,用软件 Gel Compar II 对 DNA 图谱进行聚类分析,电泳后条带完全一致的菌株通常被认为是属于同一个属或者同一物种,因此可将分离筛选到的菌株对照指纹图谱归为若干组种系型,然后从每组中选取至少 1~2 株代表菌株进行测序分析。

1.2.3 16S rRNA 基因的系统进化。选取 1~2 株指纹图谱带型相同菌株作为代表,采用通用引物 27F/1492r 进行 16S rRNA 扩增^[19]。扩增产物送至上海生物工程(上海)股份有限公司测序,将测序得到的 16S rRNA 序列与 GEN-BANK 数据库中的标准菌株进行 BLAST 同源性比对分析。从数据库获得相关属、种的 16S rRNA 基因序列,运用 MEGA 5.0 软件构建系统发育进化树^[20]。

2 结果与分析

2.1 菌株分离纯化 依据菌落特征、细胞形态特征从 9 份样品中初步分离纯化得到 176 株纯培养物,经革兰氏染色、过氧化氢酶试验得到 69 株疑似乳酸菌(表 1)。其中大部分菌株菌落颜色为白色、灰白色,边缘整齐的圆形凸起,表面较湿润,易挑起,直径大部分在 0.5~1.0 mm。

表 1 新疆哈密地区原驼奶样品中乳酸菌分布

Table 1 The distribution of lactic acid bacteria in raw camel milk samples of Hami area in Xinjiang

菌株鉴定结果 Identification result	样品编号 Sample No.									总计 Total	相似性 Similarity//%
	HMT8	HMT10	HMT16	HMT17	HMT18	HMT37	HMT38	HMT39	HMT62		
<i>Lactococcus garvieae</i>	4	1	3	2	2	—	—	—	—	12	99
<i>Lactococcus lactis</i>	—	—	—	1	—	—	3	—	—	4	99
<i>Streptococcus orisani</i>	—	—	—	2	1	—	—	—	2	5	99
<i>Streptococcus sp</i>	1	—	1	—	—	3	—	—	—	5	99
<i>Enterococcus faecium</i>	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2	99
<i>Lactobacillus kefir</i>	—	—	—	—	—	1	—	—	2	3	99
<i>Lactobacillus helveticus</i>	2	—	1	1	1	—	2	2	2	11	99
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	—	—	—	—	—	—	2	—	—	2	99
<i>Leuconostoc garlicum</i>	1	3	—	—	—	—	—	—	—	4	100
<i>Leuconostoc lactis</i>	4	1	—	3	4	1	—	—	4	17	99
总计 Total	12	5	5	9	8	5	7	4	10	65	

注:—代表样品中未分离到。

Note:—;indicates no strain in sample

2.2 菌株 Rep-PCR 指纹图谱 根据指纹图谱条带大小和数量差异,从 69 株疑似乳酸菌中挑出 21 株代表菌株,指纹图谱如图 1。

2.3 16S rRNA 测序结果 将提取出来的 DNA 以 27F 和 1492R 为引物经过 PCR 扩增,产物可通过电泳检测是否有 DNA,扩增产物的电泳结果如图 2 所示。

由图 2 可以清楚看到,在 1 500 bp 处有一条明亮的条带,说明挑选出的菌株 16S rRNA 基因扩增的产物可以满足送去测序的基本要求。笔者将出现弥漫现象和不满足测序的菌株剔除,最终将 21 株满足测序要求的菌株低温保存运往上海生工生物工程技术有限公司进行测序分析。

2.4 系统发育树的构建和乳酸菌的鉴定结果 将测序结果通过 BLAST 在线分析,与 NCBI 数据库中的已知序列进行对比,选取同源性大于 98% 的序列建立系统发育树(图 3)。

由图 3 可以看出,21 株代表菌株分别被归属于 *Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Streptococcus* 和 *Enterococcus* 5 个

属,*Lactococcus garvieae* (2 株)、*Leuconostoc lactis* (9 株)、*Lactobacillus helveticus* (1 株)、*Lactococcus lactis* (2 株)、*Streptococcus orisani* (1 株)、*Streptococcus sp* (2 株)、*Enterococcus faecium* (1 株)、*Lactobacillus kefir* (1 株)、*Leuconostoc mesenteroides* (1 株)、*Leuconostoc garlicum* (1 株) 10 个种。

2.5 原驼乳中乳酸菌优势菌种的分析 将从新疆哈密地区采集回来的 9 份驼奶样品,通过生理生化鉴定以及 Rep-PCR 指纹图谱分析并结合 16S rRNA 基因序列鉴定分析,确定的乳酸菌有 65 株。

由表 1 可知,哈密地区原驼乳中乳酸菌隶属于 5 个属,分别为 *Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Streptococcus* 和 *Enterococcus*。*Leuconostoc lactis* 在 6 份样品中都有出现,共分离得到 17 株(26%),为哈密地区原驼乳中的优势乳酸菌。*Lactococcus garvieae* 在 5 份样品中出现,共分离得到 12 株(18%),仅次于 *Leuconostoc lactis*。而 *Lactobacillus helveticus* 占总菌数的 17%,其余菌株 *Lactococcus lactis* (4 株)、*Strepto-*

coccus orisasini(5 株)、*Streptococcus sp*(5 株)、*Enterococcus faecium*(2 株)、*Lactobacillus kefir*(3 株)、*Leuconostoc mesenteroides*(2 株)、*Leuconostoc garlicum*(4 株)数量都比较少。由此可以

看出,新疆哈密地区原驼乳中乳酸菌菌种资源丰富,而且种类繁多。

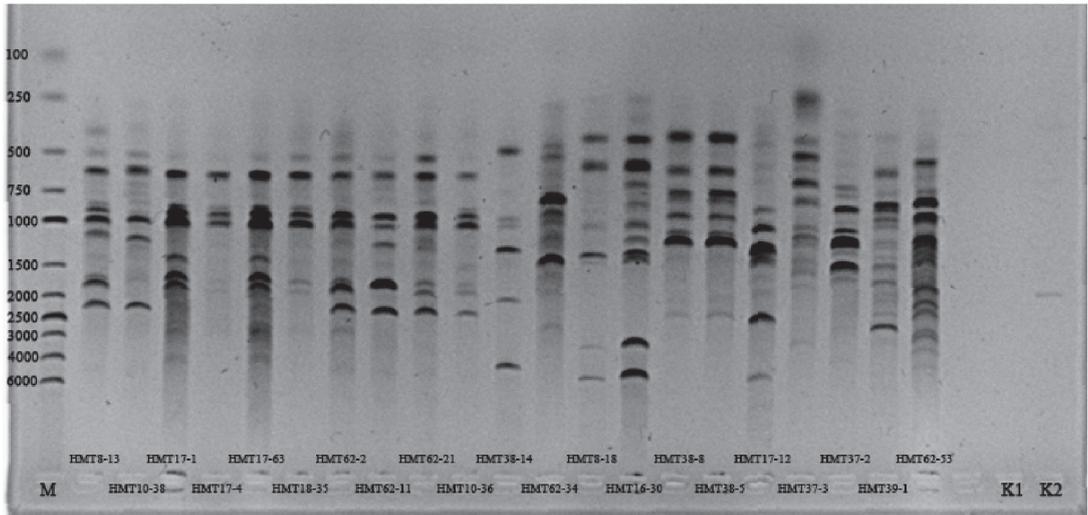


图 1 部分菌株 (GTG)5-PCR 指纹图谱

Fig.1 (GTG)5-PCR fingerprint patterns of partial lactic acid bacteria

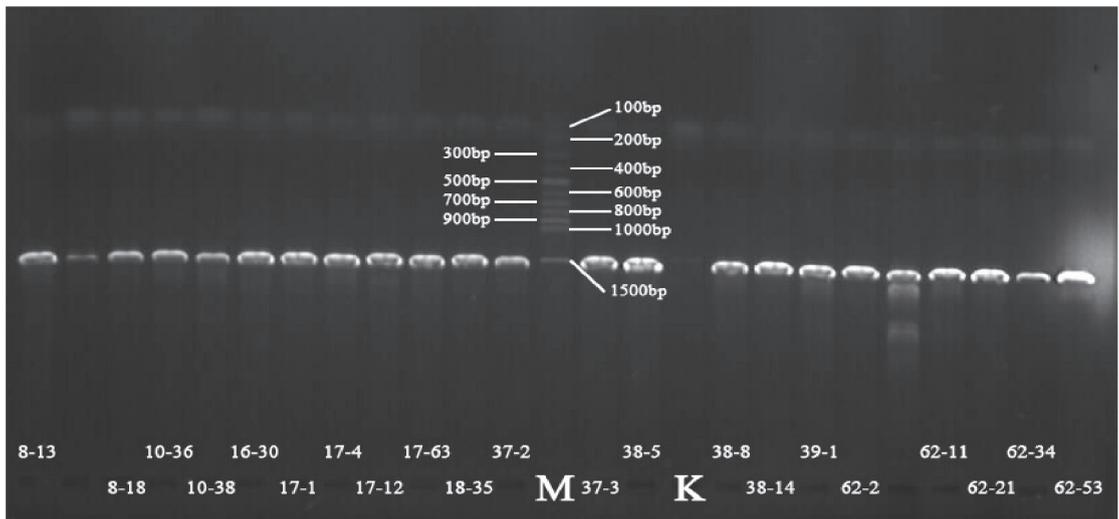


图 2 挑选出菌株 16S rRNA PCR 扩增产物的琼脂糖电泳结果

Fig.2 Agarose electrophoresis results of selected 16s rRNA PCR amplification products

3 结论与讨论

该研究通过对传统微生物的分离、培养并结合 16S rRNA 基因序列分析,从新疆哈密地区 9 份原驼乳中筛选出了 65 株乳酸菌,归属于 *Lactococcus*、*Streptococcus*、*Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc* 5 个属 10 个种。其中 *Leuconostoc* 属占 35%,是原驼乳样品中的优势属,*Leuconostoc lactis* (26%)是优势菌种。而对于从不同原驼乳样品中分离得到的菌株进行分析后发现,不同样品中的优势菌存在着一定差异性,而且 65 株菌分布于不同的 5 个属,10 个菌种里包含了不同数量的样品,结果表明新疆原驼乳中乳酸菌呈多样性且存在着丰富的乳酸菌种群。目前关于原乳和发酵乳中乳酸菌的研究报道越来越多,李伟程等^[21]利用高通量测序技术对新疆地区传统发酵酸牛奶、酸马奶和酸驼奶样品中微生物

的群落多样性进行了分析,研究发现:酸牛奶样品中的细菌属以 *Lactococcus*(乳球菌属)为主;酸马奶样品中的细菌属以 *Lactobacillus*(乳杆菌属)为主;酸驼奶样品的优势细菌属以 *Lactobacillus*(乳杆菌属)为主。李远等^[22]分别从新疆玛纳斯、乌兰巴依、南山、水西沟采集的 4 份酸驼乳中,分离得到乳酸菌 22 株,并采用传统形态学、生理生化特性方法对乳酸菌进行鉴定,结果表明优势乳酸杆菌为 *Lactobacillus helveticus*(18.18%),优势乳球菌为 *Lactococcus lacti subsp. lactis*(13.63%)。这与研究结果存在一些不同,分析原因可能是采样时区域分布不够广泛,所处的地理环境和饲养环境不同造成。Ercolini 等^[23]在研究意大利坎帕尼亚地区原牛乳中细菌多样性时发现 *Pseudomonas spp.* 为优势菌种,而 Tamura 等^[24]从丹麦原牛乳中检测出 *Streptococcus thermophi-*

lus 和 *Lactococcus lactis* 为优势菌株,分别是 43.7%和 19.0%,与该试验结果存在差异,与上述研究相比,新疆哈密地区原驼乳中乳酸菌的组成和比例具有明显的地域特点和奶源特

性,而且不同国家的原乳中营养物质的不同致使乳酸菌的组成和比例有很大差异。这有可能与不同的奶源和当地的气候、环境、所处的地理位置等因素有关。

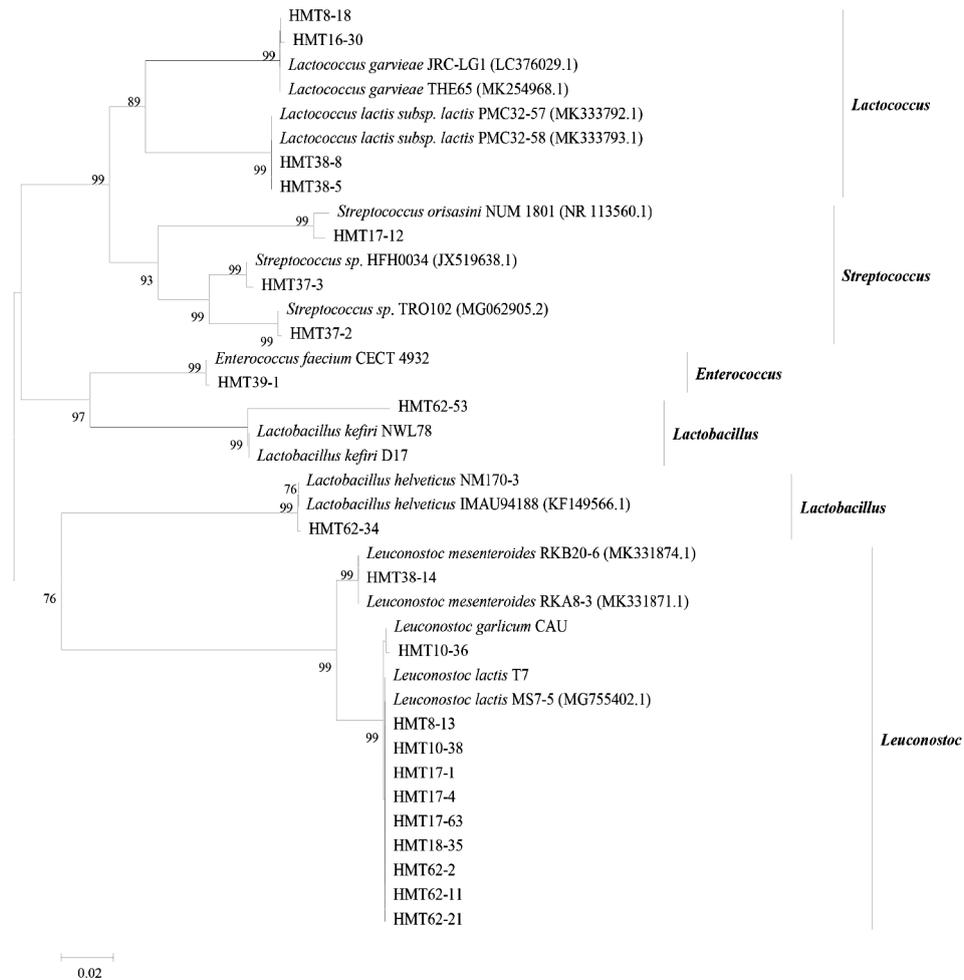


图3 新疆哈密地区原驼奶中代表菌株的 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of 16S r RNA gene sequence of representative strains of raw camel milk of Hami area in Xinjiang

本研究采用传统培养与基因测序相结合的方法对新疆哈密地区原驼乳中乳酸菌进行了筛选和分离,并进一步分析了其多样性,与免培养的高通量测序方法相比,不但可以提高菌株鉴定的准确率,还能筛选出所需菌种,这为今后开发新疆特色乳和发酵乳制品提供了丰富的乳酸菌菌种,也为后期对优良乳酸菌菌种的挑选和应用研究奠定了基础。

参考文献

[1] 李晶,阿扎提·祖力皮卡尔,张伟,等. 骆驼乳的营养价值及发展现状[J]. 当代畜牧,2017(36):50-51.
 [2] 帕尼亚·达开. 关注驼奶的利用[J]. 中国畜禽种业,2010(11):51.
 [3] 哈尔阿力·沙布尔,阿扎提·祖力皮卡尔,加孜拉·我克那义,等. 骆驼乳制品及其产业化研究[J]. 中国动物保健,2011(8):62-66.
 [4] 符玉涓,茹仙古丽,兰玲. 新疆双峰驼奶的营养及新疆双峰驼养殖技术[J]. 山东畜牧兽医,2013,34(7):63.
 [5] 艾毅斯, BATSUKH T, TSENO-AYUSH C, 等. 驼乳辅助治疗糖尿病的研究进展及应用前景[C]//中国畜牧业协会,昌吉州人民政府. 第四届(2015)中国骆驼大会论文汇编. 北京:中国畜牧业协会,2015:10.
 [6] 王俊勋,孙新华,齐新林,等. 新疆驼奶产业现状和发展趋势[J]. 中国奶牛,2013(4):13-16.
 [7] 努尔古丽,热万·克孜尔. 骆驼奶的功效[J]. 中国畜牧兽医文摘,2013,29(2):204.
 [8] AL-HAJ O A, AL-KANHAL H A. Compositional, technological and nutri-

tional aspects of dromedary camel milk[J]. International dairy journal, 2010,20(12):811-821.
 [9] 新疆维吾尔自治区统计局. 新疆统计年鉴·2012[M]. 北京:中国统计出版社,2012:321.
 [10] 尉琳,张家超,孙志宏,等. 藏北地区传统发酵乳中乳杆菌的多样性分析[J]. 微生物学报,2009,49(11):1540-1547.
 [11] 崔琴. 甘南牧区发酵牦牛酸乳中优良乳酸菌的筛选及发酵性能的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2010.
 [12] 王一迪. 新疆伊犁地区原牛乳中乳酸菌的分离鉴定与系统发育研究[D]. 石河子:石河子大学,2017.
 [13] 徐敏,陆东林,罗晓红,等. 新疆双峰驼乳成分及特性分析[J]. 中国奶牛,2014(15):49-52.
 [14] 孙天松,王俊国,张列兵,等. 中国新疆地区酸马奶中乳酸菌生物多样性研究[J]. 微生物学通报,2007,34(3):451-454.
 [15] 马兆瑞,秦立虎. 现代乳制品加工技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2010.
 [16] LEE S, LEE J, JIN Y I, et al. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017,79:518-524.
 [17] JUSTÉ A, THOMMA B P H J, LIEVENS B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes[J]. Food microbiology, 2008,25(6):745-761.
 [18] GEVERS D, HUYS G, SWINGS J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001,205(1):31-36.

结果表明,随着何首乌蒸晒次数的增加,其外观性状及多成分指标均产生较大影响,其中性状表现为表面及断面颜色逐渐加深,质地也变得坚硬;浸出物、二苯乙烯苷含量呈明显的下降趋势,其中九蒸九晒后二苯乙烯苷含量与生品相较,下降达 58.5%,可能因为二苯乙烯苷具有热不稳定性,随炮制时间的延长和温度的升高而降低。游离蒽醌的含量则随着蒸晒次数的增加而持续上升,较生品升高达 307.9%,文献也表明,九蒸九晒过程中大黄素和大黄素甲醚含量的增加可能与结合蒽醌的水解有关^[11]。相反,结合蒽醌的含量持续下降,九蒸九晒时含量达到最低,总蒽醌含量总体缓慢上升,八蒸八晒后达最大值。多成分含量测定中,何首乌黑豆汁蒸制法中随着蒸制时间的延长,没食子酸含量先上升后下降,六蒸六晒时达到最高值,总体含量上升;5-羟甲基糠醛含量较低,变化不明显;儿茶素则是持续下降;二苯乙烯苷含量减少,在一次蒸晒时达到最高点后持续下降,总体规律与药典法测得结果相近;大黄素、大黄素甲醚随着蒸晒次数的增加含量基本呈缓慢上升趋势。

3 讨论与结论

生品何首乌有一定副作用,使用不当可对人体造成损害,经过炮制的何首乌降低或消除了对人体的副作用,并能增强滋补功能,而近年来何首乌导致不良反应问题时有发生^[12-13],其毒性物质基础尚不明确,对何首乌肝毒性成分的报道多以蒽醌类、芪类及鞣质类成分为主,其中以结合蒽醌在肝毒性作用中占主导地位^[14-15]。何首乌作为典型的生熟异治中药,临床功效安全发挥很大程度上取决于炮制工艺的规范性与可靠性,经九蒸九晒后其外形、功效、成分均发生了极其复杂的变化,既有已知成分量的变化,同时存在内在成分质的改变,炮制监测过程中发现,何首乌除游离蒽醌含量增加以外,二苯乙烯苷及结合蒽醌类成分含量均呈下降趋势,该过程物质成分的变化与其减毒机制、临床药效发挥是

否相关联,是何首乌质量安全性评控的难点和重点问题。同时,古法炮制中的九蒸九晒是否仅代表炮制时间长短,而非确切的蒸晒次数,仍有待考证。

饮片质量是中药炮制过程及整个产业链的核心,炮制规范是保证中药有效性、安全性的基础,对于经临床应用具有一定疗效的传统炮制工艺,为避免失传,应当基于现代多学科知识、技术手段,从化学成分、药理作用、毒副作用及临床药效等方面进行深入研究后,批判性继承发扬。而传统炮制工艺九蒸九晒与现代炮制工艺因加工设备、技术参数不同而产生新的化学成分及其与功效改变的关系,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 175-177.
- [2] 梅雪, 余刘勤, 陈小云, 等. 何首乌化学成分和药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 122-131.
- [3] 龚彦胜, 张亚因, 黄伟, 等. 与功效、毒性相关的何首乌化学成分研究进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(8): 472-475.
- [4] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典(现代部分)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1966: 88.
- [5] 王怀隐. 太平圣惠方[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1958: 662, 2046.
- [6] 唐慎微. 证类本草[M]. 北京: 华夏出版社, 1993: 304.
- [7] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 1288.
- [8] 李卫先, 张琦, 王国仁, 等. 高压蒸制不同时间的何首乌质量标准探讨[J]. 中国医药指南, 2012, 10(9): 396-397.
- [9] 史玉霞, 周洪雷, 王真, 等. 何首乌提取液益生菌发酵前后化学成分变化研究[J]. 山东中医药大学学报, 2014(2): 161-163.
- [10] 石聪, 张兰春, 赵荣华, 等. 发酵何首乌的化学成分研究与鉴定[J]. 昆明医学院学报, 2011(10): 45-47.
- [11] 廖传荣. 何首乌炮制工艺研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016: 19.
- [12] 王亭, 龚千锋. 何首乌炮制后化学成分及药理作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 220-226.
- [13] 国家食品药品监督管理局药品评价中心. 英国 MHRA 警告何首乌的肝损害不良反应[J]. 中国药物警戒, 2006, 3(5): 313-314.
- [14] 崔鹤蓉, 柏兆方, 宋海波, 等. 从古今炮制方法演变探讨何首乌毒性的潜在影响因素[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 333-339.
- [15] 全云云, 周忆梦, 刘美辰, 等. 斑马鱼模型评价何首乌中 18 种成分的肝脏毒性[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 744-752.
- [16] 倪亚雯, 兰国伟, 杨尚娇, 等. 新疆不同地域发酵乳品中 *Lactobacillus* 多样性的研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(6): 104-109.
- [17] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular biology and evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [18] 李伟程, 侯强川, 于洁, 等. 传统发酵乳制品中微生物多样性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(1): 131-136.
- [19] 李远, 巴吐尔, 张小燕, 等. 新疆哈萨克族传统发酵驼乳中乳酸菌的分离鉴定[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(1): 54-58.
- [20] ERCOLINI D, RUSSO F, FERROCINO I, et al. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk[J]. Food microbiology, 2009, 26(2): 228-231.
- [21] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular biology & evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.

(上接第 166 页)