

高通量技术在微生物培养中的应用进展及分子测序对比分析

刘莹¹, 韩猛², 王文磊³, 马成玉¹, 张沛^{4*} (1. 河南省粮油饲料产品质量监督检验中心, 河南郑州 450001; 2. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070; 3. 南京农业大学, 江苏南京 210095; 4. 洛阳师范学院生命科学学院, 河南洛阳 471934)

摘要 高通量技术是以微型生物反应器为操作平台, 实现对生物细胞的分离培养和分子测序。通过着重分析几种实用型高通量技术在微生物分离培养及分子测序中的应用进展, 发现微包埋技术在高通量试验中的研究及应用较为深入; 而对不同环境菌样的分离培养中, 海洋微生物方面的应用最为突出。另外, 通过对比高通量分子测序技术可以发现, Illumina 测序法的平均测序速度最快; 单分子测序法所得数据的精确度最高, 测序读长最长, 周期相对最短。最后, 对高通量技术在微生物学应用中的一些不足进行总结, 并提出假设性解决方法。

关键词 微生物; 高通量技术; 分离培养; 分子测序

中图分类号 Q93 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)15-0016-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.15.005



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Application Progress of High-throughput Technology in Microbial Culture and Comparative Analysis of Molecular Sequencing

LIU Ying¹, HAN Meng², WANG Wen-lei³ et al (1. Henan Center for Supervision & Inspection of Grain, Oil and Feed Product Quality, Zhengzhou, Henan 450001; 2. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 3. Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

Abstract High-throughput technology is based on microbioreactor to realize the separation, culture and molecular sequencing of biological cells. According to the analysis of the application of several practical high-throughput techniques in microbial isolation and culture, it was found that the micro encapsulation technology was deeply studied and applied in high-throughput experiments. The application of marine micro-organism is the most prominent in the isolation and culture of bacteria samples from different environments. In addition, by comparing the high-throughput molecular sequencing technique, we can find that the Illumina sequencing method has the fastest average sequencing speed, and the single molecule sequencing method has the highest accuracy, the longest reading length and the shortest cycle. Finally, we summarized the shortcomings of high-throughput technology in microbiology, and proposed hypothetical solutions.

Key words Microorganism; High-throughput technology; Isolation and culture; Molecular sequencing

高通量技术已经成为生命科学领域基础研究和临床中被广泛应用的试验技术之一^[1], 其在微生物方面的应用包括对菌株的分离培养和分子鉴定。该方法主要是区别于传统培养与鉴定方式, 运用高通量技术对不同环境下微生物进行宽领域、多类型、深层次、高效率的分离培养和分子测序, 有效地保证所分离微生物种类的多样性、生境的原位性和对生物信息测定的准确性。在分离培养方面, 高通量已成功实现单细胞分离培养、模拟微生物原有生境的微生物原位富集培养以及对空气中的微生物和一些环境耐受力弱或含量低的微生物的分离纯化培养等; 在分子测序方面, 基于单分子簇的边合成边测序技术(SBS)和特有可逆终止化学反应, 可实现对生物基因的快速测序^[2-3]。主要通过对高通量分离培养及测序技术研究进行综述, 以期对高通量技术在微生物学和遗传学的深入探究提供有益参考。

1 微生物高通量培养的分类

传统微生物培养技术是指以平板法实现对环境微生物分离和纯化培养。此方法不但对菌种的分离效率低, 而且对菌体生境改变较大, 更无法实现对拮抗性菌落和弱势菌体的单个分离纯化。高通量培养不仅解决了上述问题, 而且可对

微生物生境中毒害因子进行更为深入的探究^[4-6]。

在微生物学试验中, 目前常用的高通量培养种类可根据培养条件、培养环境以及培养方法, 被分为稀释培养法、微包埋培养法、原位富集培养法三大类, 其中原位富集法又可细分为扩散盒高通量培养法、空心纤维膜室培养法、聚氨酯泡沫培养法、基质膜法和分离芯片培养法等^[7]。

1.1 稀释培养法(多孔板培养法) 稀释培养法也称多孔板培养, 是采用非侵入的方式利用光学传感器实现对培养目标生长状况的监控, 而孔板中细胞所处位置将直接影响细胞的生长状态。常用的细胞培养板有 96 孔、48 孔、24 孔、12 孔和 6 孔等。其中应用最为广泛的是经 Connon 等^[8]和 Button 等^[9]改良后形成的 48 孔平板分离培养法, 此法通过对菌样进行极度稀释(痕量级), 再注入 48 孔平板中进行培养, 可分离培养出菌样中 14% 的菌体细胞, Rappé 等^[10]在稀释培养的基础上又结合荧光原位杂交技术(FISH), 现已实现对 0.01 μm³ 菌体进行分离培养。

现行的稀释培养仍存在着客观缺陷。首先, 由于多孔板中四角受环境影响最大, 常出现细胞散布不均匀而导致孔板培养位置的丧失。针对此问题的解决措施有: ①直接放弃对周边孔使用; ②在此类孔中加入培养基或 PBS 以保护中间孔免受影响。此外, 随着菌体样品的稀释, 一些微生物分泌的代谢产物也随之被稀释, 致使有着共生关系和群体效应关系的微生物间有益或有害作用均被减弱, 也会使微生物因缺少必要的异源代谢产物出现生长受抑或直接消亡。

1.2 微包埋培养法 微包埋培养是利用高分子材料形成半

基金项目 国家自然科学基金青年项目(31701121); 河南省科技公关项目(182102310667); 河南省高等学校重点科研项目计划(18A180022)。

作者简介 刘莹(1981—), 女, 河南安阳人, 工程师, 硕士, 从事微生物学以及粮油食品检验等研究。*通信作者, 讲师, 博士, 从事纳米生物材料、细胞免疫学及肠道微生物学等研究。

收稿日期 2019-09-13

渗透或密封的微胶囊,后应用于微生物包埋、固定化酶和药物传递等领域^[11]。在微包埋技术的应用发展中,Weaver等^[12]最先通过油水乳化法包埋培养微生物和动物细胞;Gift^[13]用凝胶微球来分离慢性生长的酵母;Benita^[11]则对微球包埋技术作了较详细的介绍;2000年Katsuragi等^[14]证明包埋的酵母细胞可依据自身荧光性加以分选。至此,微包埋技术被广泛应用于微生物发酵、固定化酶及药物肝毒性的试验研究当中,为微生物资源的开发和利用提供了新途径。

微包埋培养的前提是微球制备,从微球基材到制备方法,可根据自身菌体研究的需要进行选择。对微球选材有以

下几点要求:①基材对被培养生物无毒害;②微球稳定性高、机械性强;③微球透明度高,便于观察;④微球的容纳量较大(尺寸一般在20~90 μm);⑤微球对所培养微生物的代谢危害物的抵抗力强^[15]。常用制备微球的材料有海藻酸铵、卡拉胶、琼脂、结冷胶、聚乙烯醇等,若制备的微球稳定性不佳,则可使用壳聚糖作为复包埋的外围包覆材料^[16]。微囊制备常用方法有乳化法、挤出法、微流体法,其中乳化法包含膜乳化和油水搅拌乳化,挤出法包括高压静电法、共轴气流法、共轴液流法,微流体法包括聚合流法和混沌混合法^[17-18]。表1列出了3种不同材料与方法制备的微球性能对比。

表 1 不同材料与方法制备的微球性能

方法 Method	海藻酸钠 Sodium alginate				琼脂糖 Agarose				结冷胶 Gellan gum			
	均一性 Homogeneity	黏连性 Adhesion	透明性 Transpa- rency	稳定性 Stability	均一性 Homogeneity	黏连性 Adhesion	透明性 Transpa- rency	稳定性 Stability	均一性 Homogeneity	黏连性 Adhesion	透明性 Transpa- rency	稳定性 Stability
搅拌乳化法 Stirring emulsi- fication method	稍差, span = 2.2 ^a	存在黏连 ^b	透明	强	球径均一, span=0.76	无黏连	高	稳定	稍差,有变形, span = 2.6	存在黏连	高	稳定
两相共流法 Two phase coflow method	球径均一, r=60 μm	无黏连,但存在尾 ^c	透明	稳定	球径均一, r=55 μm	无黏连	透明	稳定	球径均一, r=60 μm	无黏连	极高	稳定
膜乳化法 Membrane emul- sification method	稍差, span = 1.5	无黏连	透明	稳定	球径均一, span=0.76	无黏连	高	强	球径均一, 有黏连 ^d	span=0.75	极高	稳定

注:a. span 值越小,球径越均一;b. 可用氯化钙溶液降低黏连性;c. 可用甘油和氯化钙混合共流降低黏连性;d. 黏连性与离子浓度有关

Note:a. The smaller the span value, the more uniform the ball diameter;b. The calcium chloride solution can be used to reduce the viscosity;c. The mixture of glycerin and calcium chloride can be used to reduce the viscosity;d. The viscosity is related to the ion concentration

首先,对选材进行对比可以发现,当选用海藻酸钠制备微球时,通过两相共流法制备的微球性能最佳;当选用琼脂糖制备微球时,搅拌乳化法和膜乳化法所制备的微球性能皆优于两相共流法;当选用结冷胶制备微球时,两相共流法所制备的微球性能最佳。然后,从制备方法进行分析,当选用搅拌法制备微球时,利用琼脂糖制备的微球性能良好;当选用两相共流法制备微球时,利用结冷胶所制备的微球性能最佳;当选用膜乳化法制备微球时,选用琼脂糖制备的微球性能最佳。由此可见,利用结冷胶所制备微球相比于其他2种材料,其均一性、透明度和机械稳定性更佳,而利用结冷胶为基材并通过两相共流法制备的微球质量最好。

微包埋培养相对于稀释法创造了微生物样品生存的外部环境,并且微球上所存在的孔隙允许微生物间的代谢产物或生物分子自由出入。微包埋法既实现了微生物的单包埋培养,又通过形成的开放体系实现了对共生类或群体类等一些较难培养菌种的培养。然而,由于该方法相对较新颖,基材选择以及制备技术上仍存在问题,导致其培养优势还未得到完全发挥。如所用琼脂糖作为微球材料,其机械强度低、透性差,并且需加热溶解才可完成包埋,这对于大多数微生物都存在热敏感问题^[19]。此外,微球包埋法的培养条件与真正的原生生态环境还有很多差异,均会影响对菌样分离与培养的效果^[20]。

1.3 原位富集培养法 原位富集培养是在保证生境的原位条件下借助新型培养技术进行微生物富集生长,再结合传统

方式以实现对微生物分离培养的方法,该法能有效保护微生物群落间的相互作用。原位富集培养主要包括扩散盒培养法、空心纤维膜室培养法、聚氨酯泡沫培养法、基质膜法等,在所有原位培养法中扩散盒高通量培养法、中空纤维膜室培养法以及分离芯片培养法的研究较为深入^[19]。

1.3.1 扩散盒高通量培养法。Kaerberlein等^[21]设计的扩散盒高通量培养装置,由一个两侧胶连有厚度为0.03 μm或0.1 μm滤膜的不锈钢圈构成。其中的滤膜可使培养装置中的化学成分高效通过,而微生物细胞则被限于其内,扩散盒借此可实现对菌样的无毒培养并能保证培养菌样间的生物信息传递。微生物的扩散盒高通量培养具备以下优点:①扩散盒自身对微生物细胞无毒害;②扩散盒不但能够为微生物的生长提供所需营养物质和信号分子等,还可清除有害代谢产物,有效维护菌落间微生物相互作用。Nichols等^[22]发现在某些环境中,对于一些弱势菌体经过扩散盒反复培养后还可使其扩增。但此培养方式尚存一些缺陷:扩散盒法操作复杂且分离效率低,对微生物的培养和分类不能同时进行。

1.3.2 中空纤维膜室培养法。Aoi等^[23]设计的中空纤维室膜原位培养装置是由中空纤维膜形成一个单元小室,提供培养所需生境,再将从环境中提取的微生物样品稀释于腔室之中。该法在保证菌样自然生境前提下,有效阻止各个小室内微生物的进出,但对不同菌落间的生物信息分子无任何阻碍作用。通过此法不但可分离培养出新的菌型,而且为不同菌类的抗逆性或菌落间的拮抗作用提供了新思路;然而,若

要进一步增加对菌样中菌种分离的准确性,还必须借助流式细胞仪。

1.3.3 分离芯片培养法。分离芯片是由聚甲醛材料制成的多孔平板,将平板浸泡于菌样液中(既可是稀释后的菌样液,也可是经过微球包埋的菌样液),待平板上的每个小孔室中分好菌体细胞后,覆膜形成密封小室进行菌体的原位培养^[24]。

2 高通量技术对不同环境微生物的应用举例

现有高通量分离培养技术为各类环境中微生物的研究提供了广泛的帮助,但为了更加准确且具体地展示不同环境下的微生物高通量培养,该研究从海洋、土壤以及空气 3 种生境入手进行归纳。

2.1 海洋微生物 在对海洋微生物的高通量分离培养中,稀释培养法、微包埋法、原位富集培养法都可适用于海洋微生物的培养,其中微包埋法的应用最为普遍^[7]。但对海洋微生物研究的方向不同,方法的选择也会有所差异。如可分离出新型菌株的方法有稀释培养法中的 48 孔平板分离法、微包埋法中的琼脂微球包埋法以及原位富集培养中的中空纤维膜室培养和分离芯片培养法等,而对弱势菌体的反复培养则多采用扩散盒高通量培养法。通过高通量分离培养技术对海洋微生物开展研究,意在加强对海洋生态环境的了解和保护,同时为解决水产水质问题提供更多有益途径。

2.2 土壤微生物 Yasumoto-hirose 等^[25]使用浸取琼脂培养基的聚氨酯泡沫培养法(PUF)来培养和分离石油降解菌、铁载体产生菌以及铁细菌等。Gavriush 等^[26]通过扩散盒培养原理实现了对土壤中放线菌的分离培养,进而广泛用于抗生素的研发。Ferrari 等^[27]将对扩散盒培养法进行改良后建立的基质膜法(substrate membrane)用于土壤菌的分离,进一步实现了对土壤菌的培养。此外,将土壤微生物制成浓缩菌样后也可用微包埋法进行分离和培养。高通量技术对土壤微生

物分离培养的应用意义在于可开展关于农业生产中共生菌型、固氮菌等有益菌种的研究,也可对生活中一些病原微生物的致病机理和预防举措进行探索以及开展一些新型抗生素类药物的研发等。

2.3 空气微生物 在对空气微生物的高通量分离中,Moon^[28]通过微流体装置完成了对空气中微生物与粉尘的高通量分离。可借助传统的平板培养法实现对不同菌株的培养。在现有的研究中,高通量技术用于海洋微生物的研究较为深入,已经实践成功的培养实例较多,但对于淡水微生物、土壤微生物、空气微生物、药用微生物以及嗜极环境微生物的高通量培养尚待深入。

3 高通量分子测序技术对比分析

若把 20 世纪 70 年代由 Frederick Sanger 发明的双脱氧链终止法核酸测序技术看作第一代分子测定技术,高通量分子测序技术则是在此基础上发展起来的第二代和第三代测序技术。其中,常用的二代测序技术有 Illumina sequencing、AB Solid system sequencing、Ion Torrent sequencing、Pyro sequencing 等,而第三代测序技术主要是 Pacific Bio 等,利用第二代或者第三代高通量测序技术可以更高效地完成生物分子测序^[29-33]。

对表 2 进行对比发现,第一代分子测序技术和第二代高通量测序技术测序速度快、测序读长长、测序通量大、准确度高。对第二代各类测序技术进行对比发现:Illumina 测序法的平均测序速度最快,该技术还可完成对多聚重复序列的测序;AB Solid system 测序法^[33]通过复测序方式,数据的精确度最高;而相对于前两代来说,第三代测序技术的精确度最高,测序读长最长,周期相对最短。另外,所有 3 代测序技术不但可实现对微生物基因序列的快速测定,还可直接对微生物转录出的 RNApool 序列进行测定,测序数据在短时间即可得到^[34]。

表 2 不同测序技术的基本参数
Table 2 Basic parameters of different sequencing technologies

测序类型 Sequencing type	测序速度 Sequencing speed	测序读长 Sequencing read length	测序周期 Sequencing cycle	准确度 Accuracy//%
Sanger sequencing	120~300 bp/h	400~900 bp	30~120 min	>99.00
Illumina Genome Anlyze sequencing	1.07 G/h	150 bp	1~10 d	≥98.50
AB Solid system sequencing	0.278 G/h	85~100 bp	7~14 d	≥99.94
Pyro sequencing	1 Mb/h	450~700 bp	1 d	>99.00
Ion Torrent sequencing	0.4 G/h	400 bp	2 h	≥98.00
Single-molecule real-time sequencing	0.1 Mb/h	5.5~8.5 kb	30~120 min	共识精度>99.99

4 展望

高通量培养技术的兴起为微生物学、遗传学、分子生物学及药物靶向作用的研究提供了更为宽广的应用平台。但目前现有的高通量培养技术尚存在完善之处,稀释培养对孔板的利用率不高;利用扩增盒法无法实现新菌型的培养;微球材料和制法的不足使应用受限。这些局限导致高通量分离培养技术在对淡水微生物、土壤微生物以及医用微生物的培养应用中存在很大欠缺。针对此类问题,提出一定的假设性解决方案:①对于现有高通量培养缺陷,可通过与传统

培养方式相结合或开发新方法来弥补;②对于淡水微生物的高通量培养,可依照海洋微生物的培养技术进行改进和运用,对于土壤及医用微生物的高通量培养则可依据菌样的大致种类进行针对性的分种类高通量培养。

高通量技术不仅成功应用于不同环境的微生物分离与扩增,以及大量形态学的试验研究,而且还作为新一代测序技术来发现基因组和转录组上所有可能的细微差异,即利用单碱基的精确度去更加深入地理解微生物世界,探寻微生物生存和演化过程中留下的痕迹^[35]。总之,通过高通量分离

培养技术,完成对不同环境下菌体的纯培养,再结合现有的生物分子测序技术,从微生物分类学到基因组学再深入到转录组学和宏基因组学等方面。微生物的整体研究将由浅及深,也将更为系统与全面,同时期待高通量技术在未来微生物学试验中发挥更大的作用。

参考文献

[1] 孙杨,聂简琪,白仲虎,等. 高通量培养技术在生物过程研发中的应用进展[J]. 生物产业技术,2015(1):24-31.

[2] QUAIL M A,KOZAREWA I,SMITH F,et al. A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system[J]. Nature methods,2008,5:1005-1010.

[3] 冀世奇. 海洋微生物高通量培养和分选技术的建立及应用[D]. 青岛:中国海洋大学,2011.

[4] RAPPE M S,GIOVANNONI S J. The uncultured microbial majority[J]. Annual review of microbiology,2003,57:369-394.

[5] BRUNS A,CYPIONKA H,OVERMANN J. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central baltic sea[J]. Applied and environmental microbiology,2002,68(8):3978-3987.

[6] AKSELBAND Y,CABRAL C,CASTOR T P,et al. Enrichment of slow-growing marine microorganisms from mixed cultures using gel microdrop (GMD)growth assay and fluorecence-activated cell sorting[J]. Journal of experimental marine biology and ecology,2006,329(2):196-205.

[7] 袁东芳,于乐军,刘晨光. 海洋微生物高通量培养方法和分选技术的研究进展[J]. 微生物学通报,2014,41(6):1180-1187.

[8] CONNOR S A,GIOVANNONI S J. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates[J]. Applied and environmental microbiology,2002,68(8):3878-3885.

[9] BUTTON D K,SCHUT F,QUANG P,et al. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture:Theory,procedures,and initial results[J]. Applied and environmental microbiology,1993,59(3):881-891.

[10] RAPPE M S,CONNOR S A,VERGIN K L,et al. Cultivation of the ubiquitous sar11 marine bacterioplankton clade[J]. Nature,2002,418(6898):630-633.

[11] BENITA S. Microencapsulation:Methods and industrial applications[M]. Boca Raton,FL,USA:Taylor and Francis,2005.

[12] WEAVER J C,WILLIAMS G B,KLIBANOV A,et al. Gel microdroplets: Rapid detection and enumeration of individual microorganisms by their metabolic activity[J]. Bio/Technology,1988,6(6):1084-1089.

[13] GIFT E A,PARK H J,PARADIS G A,et al. FACS-based isolation of slowly growing cells:Double encapsulation of yeast in gel microdrops[J]. Nature biotechnology,1996,14(7):884-887.

[14] KATSURAGI T,TANAKA S,NAGAIHIRO S,et al. Gel microdroplet technique leaving microorganisms alive for sorting by flow cytometry[J]. Journal of microbiological methods,2000,42(1):81-86.

[15] BHATIA S R,KHATTAK S F,ROBERTS S C. Polyelectrolytes for cell encapsulation[J]. Current opinion in colloid & interface science,2005,10(1):45-51.

[16] WEI W H,DONG X M,LIU C G. *In vitro* investigation of self-assembled nanoparticles based on hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for

controlled release doxorubicin:Effect of degree of substitution of deoxycholic acid[J]. Int J Mol Sci,2015,16(4):7195-7209.

[17] 凌海鹰. 微流控芯片中制备单分散性的海藻酸钙凝胶微球[J]. 大众科技,2006(8):42-43.

[18] CHOI C H,JUNG J H,RHEE Y W,et al. Generation of monodisperse alginate microbeads and *in situ* encapsulation of cell in microfluidic device[J]. Biomedical microdevices,2007,9(6):855-862.

[19] 张秀明. 海洋微生物高通量分离培养技术的建立及青岛近海微生物多样性研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.

[20] 张晓华. 海洋微生物学[M]. 青岛:中国海洋大学出版社,2007.

[21] KAEBERLEIN T,LEWIS K,EPSTEIN S S. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. Science,2002,296(5570):1127-1129.

[22] NICHOLS D,LEWIS K,ORJALA J,et al. Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow *in vitro*[J]. Applied and environmental microbiology,2008,74:4889-4897.

[23] AOI Y,KINOSHITA T,HATA T,et al. Hollow-fiber membrane chamber as a device for *in situ* environmental cultivation[J]. Applied and environmental microbiology,2009,75(11):3826-3833.

[24] NICHOLS D,CAHOON N,TRAKHTENBERG E M,et al. Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species[J]. Applied and environmental microbiology,2010,76(8):2445-2450.

[25] YASUMOTO-HIROSE M,NISHIJIMA M,NGIRCHECHOL M K,et al. Isolation of marine bacteria by *in situ* culture on media-supplemented polyurethane foam[J]. Marine biotechnology,2006,8(3):227-237.

[26] GAVRISH E,BOLLMANN A,EPSTEIN S,et al. A trap for *in situ* cultivation of filamentous actinobacteria[J]. Journal of microbiological methods,2008,72(3):257-262.

[27] FERRARI B C,BINNERUP S J,GILLINGS M. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria[J]. Applied and environmental microbiology,2005,71(12):8714-8720.

[28] MOON H S,NAM Y W,PARK J C,et al. Dielectrophoretic separation of airborne microbes and dust particles using a microfluidic channel for real-time bioaerosol monitoring[J]. Environmental science & technology,2009,43(15):5857-5863.

[29] SANGER F,NICKLEN S,COULSON A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors[J]. Proceedings of the national academy of sciences,1977,74(12):5463-5467.

[30] CLARKE J,WU H C,JAYASINGHE L,et al. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing[J]. Nature nanotechnology,2009,4(4):265-270.

[31] EID J,FEHR A,GRAY J,et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. Science,2009,323(5910):133-138.

[32] OZSOLAK F,PLATT A R,JONES D R,et al. Direct RNA sequencing[J]. Nature,2009,461(7265):814-818.

[33] MARDIS E R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics[J]. Trends in genetics,2008,24(3):133-141.

[34] QUAIL M A,KOZAREWA I,SMITH F,et al. A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system[J]. Nature methods,2008,5(12):1005-1010.

[35] 秦楠,栗东芳,杨瑞霞. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用[J]. 微生物学报,2011,51(4):445-457.

(上接第15页)

[25] NIU M,HOU G G,WAN L,et al. Effects of superfine grinding on the quality characteristics of whole-wheat flour and its raw noodle product[J]. Journal of cereal science,2014,60(2):382-388.

[26] GOMES M R A,CLARK R,LEDWARD D A. Effects of high pressure on amylases and starch in wheat and barley flours[J]. Food chemistry,1998,63(3):363-372.

[27] APICHTSRANGKON A,LEDWARD D A,BELL A E,et al. Physicochemical properties of high pressure treated wheat samples[J]. Food chemistry,1998,63(2):215-220.

[28] PRÉSTAMO G,LESMEIS M,OTERO L,et al. Soybean vegetable protein (tofu)preserved with high pressure[J]. Journal of agricultural and food chemistry,2000,48(7):2943-2947.

[29] WU W B,YANG P,MENG C Y,et al. An integrated model to simulate sown area changes for major crops at a global scale[J]. Science in China

series D:Earth sciences,2008,51(3):370-379.

[30] KATO T,KATAYAMA E,MATSUBARA S. Release of allergic proteins from rice grains induced by high hydrostatic pressure[J]. Food and food chemistry,2000,48(8):3124-3126.

[31] 徐洲,谭书明,张运芳,等. 超高压技术在低过敏大米中的应用[J]. 食品研究与开发,2008,29(9):157-159.

[32] ALAM M S,KAUR J,KHAIRA H,et al. Extrusion and extruded products: Changes in quality attributes as affected by extrusion process parameters: A review[J]. Critical reviews in food science and nutrition,2016,56(3):445-473.

[33] 魏益民,张明晶,王锋,等. 荞麦和玉米面条挤压生产工艺探讨[J]. 中国粮油学报,2004,19(6):39-42.

[34] 赵妍嫣,徐苗均,姜绍通,等. 小麦麸皮膳食纤维挤压加工工艺研究[J]. 包装与食品机械,2012,30(2):1-4,20.

[35] 刘志东,陈勇,曲映红,等. 挤压加工对南极磷虾粉营养成分的影响[J]. 海洋渔业,2016,38(3):311-319.