

高通量测序技术对杀菌型益生菌含乳饮料菌群结构分析

俞 漪*, 庄孝飞

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘 要: **目的** 分析杀菌型益生菌含乳饮料中菌群组成结构, 并探究宣称添加益生菌的真实性和合规性。**方法** 本研究以高通量测序技术为基础, 从市售 11 批次杀菌型益生菌含乳饮料中全基因组提取, 进行 V3/V4 变异区序列的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增后, 整理及统计样品测序序列数目, 操作分类单元(operational taxonomic unit, OUT)归类, 生成稀释曲线、Alpha 多样性、聚类、丰度分布曲线与分析菌群结构和菌种标示合规性。**结果** 共得到 39231 条优质序列, 分布在 210~518 bp 范围内; 共注解到 16 个门、37 个纲、71 个目、129 个科、265 个属; 从门分类水平主要为厚壁菌门(Firmicutes 91.66%), 从纲的分类水平主要为芽孢杆菌纲(Bacill 90.43%), 从目的分类水平主要为乳杆菌目(Lactobacillales 82.74%); 优势菌种为德氏乳杆菌保加利亚亚种、嗜热链球菌; 同时产品有检出携带致病性非益生菌菌群。11 种产品标签标示与实际检测到菌株完全一致的仅有 1 批次。**结论** 本研究建立的高通量测序技术能准确、快速地探究杀菌型益生菌含乳饮料中微生物菌群多样性和潜在的致病性, 市售产品益生菌种类丰富, 但同质化程度较高, 产品间菌群分布均匀度差异大。

关键词: 益生菌; 杀菌型; 高通量测序技术; 菌群结构

Structural analysis of sterilization type probiotic milk containing beverage bacteria by high-throughput sequencing technology

YU Yi*, ZHUANG Xiao-Fei

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the composition and structure of microbial communities in sterilization type probiotic milk containing beverages, and explore the authenticity and compliance of the claimed addition of probiotics. **Methods** Based on high-throughput sequencing technology, this study extracted the whole genome from 11 batches of sterilization type probiotic milk containing beverages on the market. After the polymerase chain reaction (PCR) amplification of the V3/V4 variant region sequence, it sorted out and counted the number of sample sequencing sequences, operational taxonomic unit (OUT) was classified, generates dilution curves, Alpha diversity, clustering, abundance distribution curves was generated and flora structure was analyzed, and bacterial marking compliance was analyzed. **Results** A total of 39231 high-quality sequences were obtained, distributed in the range of 210~518 bp; a total of 16 gates, 37 classes, 71 orders, 129 families, and 265 genera were annotated; the classification level of Firmicutes (91.66%), the classification level of the class was mainly Bacillus (90.43%), and the

*通信作者: 俞漪, 高级工程师, 主要研究方向为微生物和 PCR 技术在食品检测中的应用。E-mail: yuyi@sqi.org.cn

*Corresponding author: YU Yi, Senior Engineer, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, No.381, Cangwu Road, Shanghai 200233, China. E-mail: yuyi@sqi.org.cn

classification level from the classification level was mainly Lactobacillales (82.74%); the dominant bacteria were the Bulgarian subspecies of *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus*; at the same time, the product had been detected to carry pathogenic non-probiotic flora. There was only one batch of 11 kinds of product labels that were completely consistent with the actual detected strains. **Conclusion** The high-throughput sequencing technology established in this study can accurately and quickly explore the diversity and potential pathogenicity of microbial flora in sterilization type probiotic milk containing beverages. There are rich types of probiotics in commercially available products, but the degree of homogenization is high, and the distribution uniformity of flora between products is large.

KEY WORDS: probiotics; sterilization type; high-throughput sequencing technology; microbial community structure

0 引言

益生菌含乳饮料是指在以乳或乳制品为原料的基础上,添加其他成分,可分为杀菌(非活菌)型和未杀菌(活菌)型^[1]。活性益生菌具有抗氧化、降血脂、调节肠胃等益生功能^[2-3];同时也探索到某些被热活的益生菌可改善高脂代谢异常^[4]。卫计委也发布了相关的法规“(卫法监发[2001]84号)可利用益生菌代谢物^[5]”。杀菌产品保质期长,可远程运输,可深入小城镇销售,打破了地域限制。益生菌产品应当按照《预包装食品标签通则》的要求标注其菌种名称,杀菌型益生菌含乳饮料是近几年涌现出一种新型益生菌产品,在标签标示上问题较多,有的产品标签信息与实际添加菌种不相符,有的产品无标签标示,有的产品标示信息是厂家自行命名与卫健委发布《可用于食品的菌种名单》^[6]的无法对应。面临标准相对滞后、检验方法缺乏等各种问题。而当今基因水平的研究技术已成为热点^[7],利用基于特异益生菌菌种的 16S rRNA^[8]、16S~23S rRNA 基因分型^[9]、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)^[10]、脉冲场凝胶电泳分型(pulse-field gel electrophoresis, FGE)^[11]、基因组 SNP-INDEL 菌株鉴定技术^[12]、动物双歧杆菌乳双歧亚种菌株水平高分辨率溶解曲线(high-resolution melting curve, HRM)鉴定等技术^[13]对菌种进行鉴定分析,但以上各种方法是在基于培养法基础上实现,而对于杀菌型产品无法实现有效分离单个菌株。为适应快速加强该类产品监管需求,需进一步研究非培养的菌种检测技术。高通量测序技术的研发给微生物学研究带来了巨大的变革,边合成边测序的新一代测序技术代表了一种更为简单快速的微生物群落检测方法,检测量在同一时间可以达到成千上万的核苷酸分析量^[14],这种方法具有高灵敏度、高准确性和高效率等特点,大大提高了微生物检测的准确性^[15]。广泛的应用在微生物菌群分析、发酵食品、食源性病原体等^[16-18]。

本研究以市场上购买的不同品牌、不同规格的杀菌型益生菌含乳饮料作为研究对象,通过对产品中总细菌 DNA 提取,进行测序,分析产品中微生物群落结构,并对

产品中真实菌群验证与标示、法规合规性进行分析,以期为消费者在选购杀菌型益生菌含乳饮料提供依据,并且为政府和行业提供技术支撑和监管建议。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品信息和标准菌株

从超市、网络等购买的杀菌型益生菌含乳饮料共 11 批次,编号:Y2~Y12,涵盖不同厂家约 10 个。德氏乳杆菌保加利亚亚种(ATCC BAA-365)(阳性对照)、白色念珠菌(ATCC 10231)(阴性对照)(中国工业微生物菌种保藏管理中心),购买后均由上海市质量监督检验技术研究院保存。

1.1.2 试剂

Tris 饱和酚、溶菌酶、裂解液、5×TAE 电泳缓冲液[TAE 电泳缓冲液由三羟甲基氨基甲烷(Tris base)、乙酸(acetic acid)和乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)组成的缓冲液,生工生物工程(上海)股份有限公司];蛋白酶 K(酶活>30 U/mg,美国 Promega 公司);三氨基甲烷、三氯甲烷、无水乙醇、十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);Premix Ex Taq Mix、DL 2000 DNA Marker[宝日生物工程(大连)有限公司];琼脂糖[天根生化科技(北京)有限公司];溴化乙锭(纯度 99%,上海麦克林生化科技股份有限公司);Vazyme VAHTS DNA Clean Beads(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒(美国 Axygen 生物有限公司)。

1.1.3 仪器

SI Vortex Genie2 漩涡振荡器(美国 Scientific Industries 公司);ABI VERITI 梯度 PCR 仪(美国 ABI 公司);NanoDrop2000 微量紫外分光光度计、TOLEDO MS6001S 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);5430R 振荡水浴槽(德国艾本德有限公司);DYY-6C 电泳仪(北京六一仪器公司);Geldoc XR+成像及软件分析系统(美国伯乐公司);Illumina Miseq PE300 平台(美国 Illumina 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 核酸提取

取一定量含乳饮料加入无菌水稀释(体积比为 1:10), 反复加热和离心彻底去除产品中蛋白质后, 用 CTAB 法进行全基因组核酸提取纯化^[19], 加入适量的裂解液溶解 DNA, 放置于-20℃备用。采用微量紫外分光光度计进行测定, 确定产品的基因组 DNA 浓度及纯度。

1.2.2 聚合酶链式反应产物扩增及电泳分析

利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量, 用 338F (5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGAC TACHVGGGTWTCTAAT-3')引物对 V3/V4 变异区序列进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增, 反应体系、反应参数、电泳检测参数参照文献[20]。

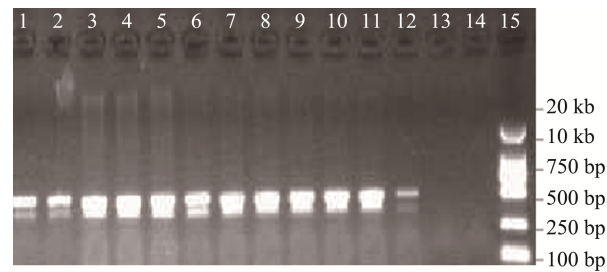
1.3 数据处理

将上述 PCR 产物送去上海昂朴生物科技有限公司进行测序; 为了使信息分析结果的准确性满足要求, 原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控, 对所得原始数据做了拼接和过滤处理, 使用 FLASH 软件进行拼接, 将其中的嵌合体序列去掉^[21]。采用 UPARSE 软件对其余的有效数据进行多个操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类处理, 选择的相似性水平为 97%, 并在聚类的过程中去除单序列和嵌合体。然后利用相应的 Greengene 数据库注释物种^[22]; 对所得结果进行丰度、多样性等方面的分析处理, 以此来确定出微生物群落结构特征信息^[23]。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测结果分析

所有产品 PCR 产物扩增结果如图 1 所示, 产物片段为 480 bp, 目标条带清晰、唯一, 结合 DNA 的浓度和纯度, 产品中 PCR 产物能满足后续高通量测序要求。



注: 1: Y2; 2: Y3; 3: Y4; 4: Y5; 5: Y6; 6: Y7; 7: Y8; 8: Y9; 9: Y10; 10: Y11; 11: Y12; 12: 阳性对照; 13: 阴性对照; 14: ddH₂O; 15: DL2000 Marker。

图 1 产品基因组 DNA 凝胶成像结果(16S rRNA V3/V4)
Fig.1 Gel imaging results of product genomic DNA (16S rRNA V3/V4)

2.2 测序序列分析结果

所有产品总共得到 718846 条有效序列, 经过筛选后得到 39231 条优质序列; 对所有产品的优质序列长度进行统计, 结果表明序列长度分布在 210~518 bp 范围内, 将所得 OUT 分类到门、纲、目、科、属及种的数量进行统计。

2.3 样品的稀释曲线

稀释曲线可以直观地反映样品的测序深度情况, 当稀释曲线随着测序序列的增加而升高, 表明继续测序还可能产生较多新的 OUT, 当曲线趋于平坦时再增加测序深度对发现新的 OTU 的可能性很小, 此时说明测试数据量合理, 能满足测序质量要求。由图 2 可知多数样本在序列数 5000~10000 时, 观察到的 OTU 数目已经接近饱和; 现有测序量已经可以真实地反映出产品中微生物群落丰度信息。

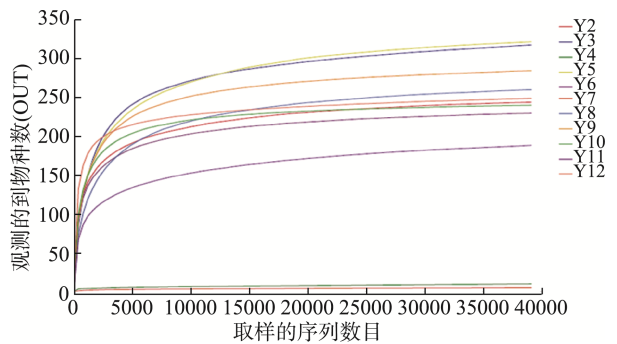


图 2 样品的稀释曲线
Fig.2 Dilution curves of samples

2.4 Alpha 多样性分析结果

可通过多项指数来评价样品中微生物分布的 Alpha 多样性, 丰富度指数(Chao1)用来估计群落中的 OUT 数目; 衡量群落多样性常用香浓指数(Shannon)和辛普森指数(Simpson)表示^[24]; 测序覆盖指数(Coverage)用于表征每个样品文库的覆盖率, 反映测序深度是否能覆盖整个微生物群落, 是否能代表样本中所有微生物的真实情况。如表 1

表 1 Alpha 多样性指数统计
Table 1 Alpha diversity index statistics

样品编号	指标			
	Shannon	Simpson	Chao1	Coverage
Y2	3.969133	0.052514	253.909091	0.999592
Y3	3.073402	0.232002	351.200000	0.999159
Y4	0.771866	0.554997	14.000000	0.999898
Y5	4.739204	0.038078	331.040000	0.999388
Y6	3.901658	0.056102	238.545455	0.999618
Y7	0.022942	0.994149	7.000000	0.999949
Y8	3.081034	0.190507	273.000000	0.999465
Y9	3.877223	0.054328	302.000000	0.999516
Y10	4.037529	0.044368	245.000000	0.999771
Y11	3.451452	0.067330	205.769231	0.999439
Y12	4.071939	0.047170	255.583333	0.999643

所示, 所分析的产品 Chao1 数在 7~352 之间, 说明产品之间总体数量差别较大; 结合 Shannon 和 Simpson 指数, Y5 的菌群组成结构多样性最高; Coverage 指数都大于 0.999, 说明实验所测 11 批产品结果能基本反映样品的真实情况。

2.5 物种分布结果

热图色块代表一个样品的一个属的丰度, 纵向是样品的属水平群落组成, 横向是通过颜色梯度反映样品间在

分类水平上群落组成的相似性和差异性。如图 3 所示, 乳杆菌属和链球菌属为该类产品的主要优势菌, 产品之间菌群类别相似度较高且相对分布比例差异较大。

2.6 样品的丰度分布曲线

丰度分布曲线的形状反映物种组成的均匀程度, 越平坦代表物种均匀程度越高; 曲线在横轴上的长度反映物种的丰富程度, 长度越长代表物种组成丰富, 从图 4 可以看出 Y5 中菌群种类最丰富且相对均匀程度高。



图 3 11 种含乳饮料样品物种分布图
Fig.3 Species distribution map of 11 kinds of milk beverage samples

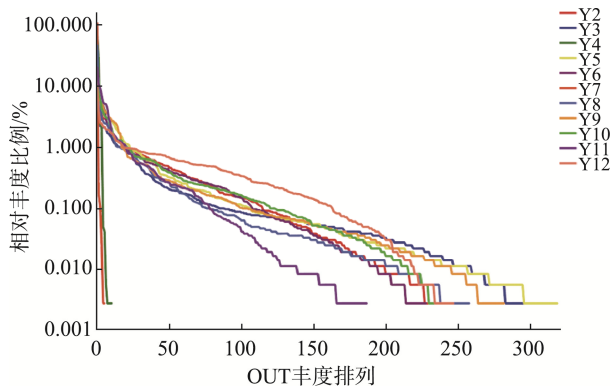


图 4 样品的丰富度分布曲线
Fig.4 Rank-abundance curve of sample

2.7 菌群结构分析结果

采用 RDP 和 BLAST 同源性序列比对聚类相结合的方法^[25], 所测序列通过物种注解共分为 16 个门、37 个纲、71 个目、129 个科、265 个属; 从门的分类水平来看主要为厚壁菌门(Firmicutes 91.66%)、放线菌门(Actinobacteria 8.24%); 从纲的分类水平来看主要为芽孢杆菌纲(Bacilli 90.43%)、放线菌纲(Actinomycetes 9.47%); 从目的分类水平来看主要为乳杆菌目(Lactobacillales 82.74%)、棒状杆菌目(Corynebacteriales 11.07%)、双歧杆菌目(Bifidobacteriales 5.94%), 从属的分类水平来看主要包括乳杆菌属(54.3%)、链球菌属(18.4%)、乳球菌属(9.0%)和双歧杆菌属(9.0%)(表

2); 乳杆菌属在 11 种产品的微生物群体中占有绝对优势地位; 而链球菌属除了 Y4、Y7 和 Y11 中未检出, 在其余样品中也为优势菌群。这是由于两种菌是乳制品中应用最广泛的微生物, 并且混合使用存在协同共生作用^[26]; 乳球菌属在乳制品的生产中也发挥了重要作用, 其中乳酸乳球菌及其亚种最初基本用于发酵干酪及其制品中^[27], 但随着食品工业的大力发展其功能被不断的开发, 在其他乳制品中也得到广泛应用^[28]; 从检测结果来看双歧杆菌在大部分产品中占比较低, 是由于双歧杆菌生长所需条件苛刻, 在多菌共存产品中的竞争下生长较为困难^[29], 所以双歧杆菌更多地用于单菌的益生菌产品中, 如奶粉。

将测序得到的物种丰度信息回归至数据库的分类学系统关系树中, 检测到多种非益生菌菌群, 从亲缘性大致分为两大支, 见图 5, 第一大支为寡养单胞菌属、罗尔斯通菌属、肠杆菌属、克罗诺杆菌属、假单胞菌属、不动杆菌属, 亲缘性为 93%; 第二大支为固氮螺菌属和甲基杆菌属, 亲缘性为 85%; 所分析的 11 种产品中基本都有携带多种非益生菌菌群, 并且色柱越宽代表此菌种在

产品中丰度越高, 其中丰度最高的是 Y3 和 Y8 产品中的寡养单胞菌属, 此菌多分布于自然界中, 呈现生境多样化, 在一定的条件下对人体或动物具有致病性^[30]; 其次是克罗诺杆菌属, 隶属于肠杆菌科的一个新属, 与肠杆菌属亲缘达到了 99%, 是一种重要的食源性条件致病菌。假单胞菌属以低丰度几乎存在于每个实验产品中, 是最多样化和普遍存在的细菌属之一, 广泛分布于土壤、水和空气中。

2.8 标示合规性分析结果

11 批次产品的标示菌主要为保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、乳酸乳球菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌和乳双歧杆菌; 从标识来看, 各产品中含菌丰富, 并且部分产品含菌多元化。测序所得的益生菌符合卫计委发布的《可用于食品的菌种名单》^[6]; 产品标签标示与实际检测到菌株完全一致的仅有 1 批次, 符合率只有 9.1%。有 4 批次未检出标示菌种, 如 Y3 产品在标示中嗜酸乳杆菌含量仅次于副干酪乳杆菌, 而检测结果在菌群占比为 0%; 有 9 批次检出未标示菌种, 如 Y7 产品唯一标示菌种是干酪乳杆菌, 结果为瑞士乳杆菌。具体见表 3。

表 2 优势益生菌属水平上含菌百分比(%)
Table 2 Percentage of bacteria at the level of advantageous probiotic genera (%)

菌株名称	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11	Y12
双歧杆菌属	5.46	31.87	0.00	1.77	0.00	0.00	34.13	0.36	7.39	10.06	8.30
乳杆菌属	45.87	44.64	72.91	40.70	49.05	99.63	24.60	79.11	46.13	56.45	37.87
乳球菌属	15.33	4.82	0.00	20.80	17.12	0.00	17.94	1.40	7.29	13.66	0.43
链球菌属	19.02	16.79	0.00	22.57	32.34	0.00	12.22	12.10	34.71	0.00	53.04

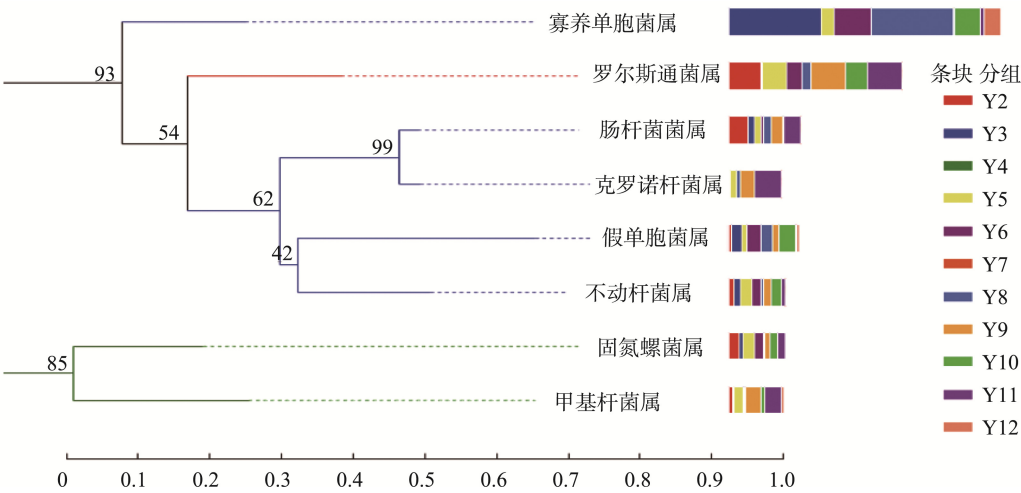


图 5 各样品物种分类学系统构成树
Fig.5 Taxonomic system composition tree of each sample

表 3 标示菌种与检测结果比较
Table 3 Comparison of labeled strains and test results

编号	标签明示菌株	检出菌种及其所占比例/%	未检出标示菌种	检出未标示菌种及其所占比例/%
Y2	嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌、两歧双歧杆菌、嗜酸乳杆菌	嗜热链球菌 19.02、保加利亚乳杆菌 10.56 两歧双歧杆菌 0.38、嗜酸乳杆菌 35.31	/	动物双歧杆菌 5.08、乳酸乳球菌 15.33
Y3	副干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌、乳双歧杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种、嗜热链球菌	副干酪乳杆菌 30.12、嗜酸乳杆菌 0、乳双歧杆菌 26.51、德氏乳杆菌保加利亚亚种 14.52、嗜热链球菌 16.79	嗜酸乳杆菌	婴儿双歧杆菌 0.60、长双歧杆菌 4.76、乳球菌 4.82
Y4	副干酪乳杆菌	副干酪乳杆菌 72.91	/	/
Y5	嗜热链球菌、保加利乳杆菌、嗜酸乳杆菌、乳酸乳球菌(乳酸亚种、乳脂亚种、双乙酰亚种)	嗜热链球菌 22.57、保加利乳杆菌 2.43、嗜酸乳杆菌 38.27、乳酸乳球菌 20.80	/	动物双歧杆菌 1.77
Y6	嗜热链球菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种、干酪乳杆菌、乳酸乳球菌(乳酸亚种、乳脂亚种、双乙酰亚种)、嗜酸乳杆菌	嗜热链球菌 32.34、德氏乳杆菌保加利亚亚种 0.95、干酪乳杆菌 48.10、乳酸乳球菌 17.12、嗜酸乳杆菌 0	嗜酸乳杆菌	/
Y7	干酪乳杆菌	干酪乳杆菌 0	干酪乳杆菌	瑞士乳杆菌 99.93
Y8	保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、副干酪乳杆菌	保加利亚乳杆菌 22.22、嗜热链球菌 12.22、副干酪乳杆菌 2.38	/	动物双歧杆菌 23.02、婴儿双歧杆菌 11.11、乳酸乳球菌 17.94
Y9	德氏乳杆菌保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌	德氏乳杆菌保加利亚乳杆菌 43.16、嗜热链球菌 12.46、嗜酸乳杆菌 35.95	/	动物双歧杆菌 0.18、婴儿双歧杆菌 0.18、乳酸乳球菌 1.40
Y10	嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌、副干酪乳杆菌、乳酸乳球菌(乳酸亚种、乳脂亚种、双乙酰亚种)	嗜热链球菌 35.01、保加利亚乳杆菌 8.71、副干酪乳杆菌 37.42、乳酸乳球菌 7.29	/	双歧双歧杆菌 7.39
Y11	嗜热链球菌、副干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌、乳双歧杆菌、德式乳杆菌保加利亚亚种	嗜热链球菌 0、副干酪乳杆菌 28.61、嗜酸乳杆菌 0、乳双歧杆菌 6.19、德式乳杆菌保加利亚亚种 27.84	嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌	婴儿双歧杆菌 3.87、乳酸乳球菌 13.66
Y12	嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌	嗜热链球菌 53.34、保加利亚乳杆菌 27.23、干酪乳杆菌 10.64	/	双歧双歧杆菌 8.30、乳酸乳球菌 0.43

注: /表示无。

3 讨论与结论

利用培养技术获得自然界的微生物微乎其微^[31]。培养法的核心是活菌检测,该方法直观易行,是活菌检测的“金标准”,但全面了解产品中微生物的种类及作用几乎不可能;当今高通量测序技术在食品安全领域得到了广泛的应用^[32]。如 DIGAMBAR 等^[33]对传统发酵食品细菌多样性研究; DONG 等^[34]采集湖北周边省份的固态传统发酵食品-腐乳,发现属水平优势类群为假单胞菌属、乳球菌属、不动杆菌属;甘永琦等^[35]基于高通量测序技术实现复杂样品中多个物种的同时检测。

本研究建立高通量测序技术首次针对杀菌型益生菌含乳饮料中益生菌菌群分布分析,直观全面地阐述益生菌产品中菌群的种类和丰富程度,避免了杀菌产品无法培养菌种带来的问题。实验产品益生菌种类丰富,但同质化程

度较高,产品间菌群分布均匀度差异大;优势益生菌主要为厚壁菌门芽孢杆菌纲乳杆菌目的德氏乳杆菌保加利亚亚种、嗜热链球菌;测序获得的益生菌都属于符合法规允许添加的菌种,但与产品的标签明示值对比差异较大;主要表现在标示菌少于实际检测到的菌种,实际检出菌多于未标示菌种;前者可能生产厂家标签上未明确标出,但是生产厂家为保证产品的安全性和消费者的知情权和自由选择权,应该在标签上明确标出;目前市场上大多数益生菌产品的使用同一家发酵菌株公司的产品,也是导致不同产品中有携带了相同的丰度极低的益生菌;或在前一批菌剂生产或分装后生产线上未处理干净,对其他产品影响导致交叉污染。同时也检测到产品中携带多种非益生菌菌群,都为条件致病菌;本研究的益生菌乳饮料多含有蛋白质、维生素等营养物质,是污染食源性致病菌的高风险产品;假单胞菌属是常见的食物腐败菌,广泛存在于自然界中,可

使乳制品、鱼、肉等变质并产生硫化氢,而引起食品中毒。克罗诺杆菌属特别是阪崎肠杆菌,是人和动物肠道内寄生菌,在营养丰富特别是婴幼儿食品中,即使有极微量的污染在储藏期也可能大量的繁殖,中毒病例在全球范围多有报道。企业在大力开发益生菌产品时应同时做好产品质量安全风险监控。

高通量测序技术具有灵敏度高、测序通量大、准确性高的优势,是一种不依赖微生物培养的细菌多样性分析技术,可直接通过食品中微生物 DNA 获得丰富的微生物菌群信息^[36],检测到丰度低至万分之一的痕量菌;本研究首次直观地展示杀菌型益生菌产品益生菌群,同时能深度挖掘到产品中的潜在风险。当今国内杀菌型益生菌产品呈现出横向发展的趋势,本研究为新型产品的微生物多样性分析提供了方向。

参考文献

- [1] 王丽丽. 乳酸菌的分离及酸奶的发酵[J]. 食品安全导刊, 2016, (33): 135.
WANG LL. Isolation of lactobacillus and fermentation of yoghurt [J]. China Food Saf Magaz, 2016, (33): 135.
- [2] 陈莹, 江剑平. 益生菌在保健食品中的应用研究进展[J]. 保健医学研究与实践, 2020, 17(6): 89-92.
CHEN Y, JIANG JP. Progress in applied research of probiotics in health-care food [J]. Health Med Res Pract, 2020, 17(6): 89-92.
- [3] AL-EMRAN H, FERDOUSE JM, LITON MM, et al. Genomic analysis and *in vivo* efficacy of *Pediococcus acidilactici* as a potential probiotic to prevent hyperglycemia, hypercholesterolemia and gastrointestinal infections [J]. Sci Report, 2022. DOI: 10.1038/S41598-022-24791-5
- [4] 葛林, 张瑜杰, 蒲芳芳. 高脂饮食对大鼠免疫功能影响及热灭活益生菌改善作用的初探[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(2): 4-8.
GE L, ZHANG YJ, PU FF. Preliminary studies on effect of high-fat diet on Rat immunity and possible improvement by heat inactivated probiotics [J]. China Dairy Ind, 2020, 48(2): 4-8
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 关于印发真菌类和益生菌类保健食品评审规定的通知[Z].
The People's Republic of China National Health and Family Planning Commission. Announcement on printing and distributing the regulations on the evaluation of fungus and probiotic health food [Z].
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 可用于食品的菌种名单[Z].
The People's Republic of China National Health and Family Planning Commission. List of strains that can be used in food [Z].
- [7] GE L, ZHANG YJ, PU FF. Effect of high-fat diet on immune function of rats and improvement of heat-inactivated probiotics [J]. China Dairy Ind, 2020, 48(2): 4-8.
- [8] 段文锋, 刘洋, 陈雯雯. 婴幼儿配方乳粉中双歧杆菌的分子鉴定及标签相符性研究[J]. 中国乳品工业, 2015, 43(5): 16-20.
DUAN WF, LIU Y, CHEN WW. Study on molecular identification and labeling of *Bifidobacterium* in infant formula milk powder [J]. China Dairy Ind, 2015, 43(5): 16-20.
- [9] 于超, 郭海勇, 魏嘉良. 16S-23S rRNA 基因序列在细菌鉴定中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(2): 57-60.
YU C, GU HY, WEI JL. Application of 16S-23S rRNA gene sequence in bacterial identification [J]. China Anim Husb Vet Med, 2012, 39(2): 57-60.
- [10] SARA ME, MOURAD B, IDRIS M, et al. Genetic diversity and population structure of *Leishmania infantum* in Morocco as revealed by multilocus sequence typing (MLST) approach [J]. Pathogens, 2023. DOI: 10.3390/PATHOGENS12060785
- [11] ZAKARIA Z, HASSAN L, SHARIF Z. Analysis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates from chickens and chicken meat products in Malaysia using PFGE, and MLST [J]. BMC Vet Res, 2020, 16(1): 393-393.
- [12] 普天磊, 金杰, 何璐. 基于 SNP 和 InDel 标记的余甘子群体遗传分析[J]. 果树学报, 2023, 40(5): 875-883.
PU TL, JIN J, HE L. Genetic analysis of *Phyllanthus emblica* population based on SNP and InDel markers [J]. J Fruit Sci, 2023, 40(5): 875-883.
- [13] 刘洋. 用于乳粉中双歧杆菌菌株鉴定的 SNP 位点组合: 中国, CN201710887563.0[P]. 2018-01-19.
LIU Y. SNP locus combination for identification of *Bifidobacterium* strains in milk powder: China. CN201710887563.0 [P]. 2018-01-19.
- [14] 杨光萍. 高通量测序技术在食品微生物检测中的应用[J]. 食品安全导刊, 2022, (30): 182-185.
YANG GP. Application of high-throughput sequencing technology in food microbial detection [J]. China Food Saf Magaz, 2022, (30): 182-185.
- [15] 付博菲, 朱晓龙, 邱斌. 高通量测序技术在食源性病原体快速检测中的应用进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(3): 200-205.
FU BF, ZHU XL, QIU B. The application of high-throughput sequencing technology in the rapid detection of foodborne pathogens [J]. Food Res Dev, 2019, 40(3): 200-205.
- [16] YUAN L, FAN L, LIU S, et al. Bacterial community analysis of infant foods obtained from Chinese markets by combining culture-dependent and high-throughput sequence methods [J]. Food Res Int, 2022. DOI: 10.1016/J.FOODRES.2022.112060
- [17] DIGAMBAR K, SURYAVANSHI MV, SUJATHA K, et al. Bacterial diversity of traditional fermented food, idli by high thorough-put sequencing [J]. J Food Sci Technol, 2022. DOI: 10.1007/s13197-022-05421-4
- [18] 吴怡, 刘露露, 吴永民. 高通量测序检测米线中的食源性致病菌[J]. 食品科学, 2022, 43(6): 347-352.
WU Y, LIU LL, WU YM. Detection of food-borne pathogens in rice noodles in high-throughput sequencing [J]. Food Sci, 2022, 43(6): 347-352.
- [19] 张娜娜, 刘洋, 俞漪. 乳酸菌饮料中嗜酸乳杆菌的实时荧光定量 PCR 检测方法[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 27-32.
ZHANG NN, LIU Y, YU Y. Real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic beverages [J].

- Food Sci, 2019, 40(8): 27–32.
- [20] 王艳丽, 张会敏, 孟雅静. 基于 16S rDNA V4 与 V3-V4 可变区高通量测序对浓香型白酒窖泥菌群组成的比较分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 147–154.
- WANG YL, ZHANG HM, MENG YJ. Comparative analysis of flora composition in pit mud of Luzhou-flavor liquor based on 16S rDNA V4 and V3-V4 variable zone high-throughput sequencing [J]. Mod Food Sci Technol, 2020, 36(6): 147–154.
- [21] EDGAR RC, HAAS BJ, CLEMENTE JC, *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194–2200.
- [22] EDGAR CR. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nat Method, 2013, 10(10): 996–998.
- [23] WANG QL, GARRITY GM, TIEDJE JM, *et al.* Naivebayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 16(3): 5261–5267.
- [24] 苏加坤, 徐达, 郭磊. 基因宏基因组测序的烟叶表面微生物多样性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, (36): 1538–1545.
- SU JK, XU D, GU L. Analysis of microbial diversity on tobacco surface by gene metagenome sequencing [J]. Genom Appl Biol, 2017, (36): 1538–1545.
- [25] OBERAUNER L, ZACHOW C, LACKNER S, *et al.* The ignored diversity complex bacteria communities in intensive care units revealed by 16S pyrosequencing [J]. Sci Report, 2013, 3(3): 4422–4427.
- [26] 崔欣, 孙亚琳, 王开云. 嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种共生关系的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(6): 184–189.
- CUI X, SUN YL, WANG KY. Research progress on symbiotic relationship between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [J]. Food Res Dev, 2021, 42(6): 184–189.
- [27] 焦晶凯. 中国一种乳酸乳球菌乳酸亚种及其在干酪生产中的应用: 中国, CN201610838600.4[P]. 2016-09-21.
- JIAO JK. *Lactococcus lactis* subspecies in China and its application in cheese production: China, CN201610838600.4 [P]. 2016-09-21.
- [28] LAURA SR, GRACIA LC, GAVARA R, *et al.* Evaluation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as protective culture for active packaging of non-fermented foods: Creamy mushroom soup and sliced cooked ham [J]. Food Control, 2021. DOI: 10.1016/J.FOODCONT.2020.107802
- [29] 乌云, 刘红霞, 李洪亮. 双歧杆菌的分离鉴定及保藏性能研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(23): 171–176.
- WU Y, LIU HX, LI HL. Isolation, identification of bifidobacterium and preservation ability research [J]. Food Res Dev, 2017, 38(23): 171–176.
- [30] 邓阳, 姜竹鸣, 张玉琴. 寡养单胞菌属细菌的研究进展[J]. 生物资源, 2021, 43(1): 1–9.
- DENG Y, JIANG ZM, ZHANG YQ. Research progress of *Stenotrophomonas bacteria* [J]. Biotic Resour, 2021, 43(1): 1–9.
- [31] AMANN RI, LUDWIG W, SCHLEIFER KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143–169.
- [32] BEHZAD I, JOHN D, TIM J, *et al.* The power, potential, benefits, and challenges of implementing high-throughput sequencing in food safety systems [J]. NPJ Sci Food, 2022, 6(1): 1.
- [33] DIGAMBAR K, SURYAVANSHI MV, SUJATHA K, *et al.* Bacterial diversity of traditional fermented food, idli by high thorough-put sequencing [J]. J Food Sci Technol, 2022, 59(10): 3918–3927.
- [34] DONG Z, ZHANG RONG Y, *et al.* Distinct bacterial community of a solid-state fermented Chinese traditional food huase sufu revealed by high-throughput sequencing [J]. Food Sci Biotechnol, 2021, 30(9): 1–9.
- [35] 甘永琦, 卢曼曼, 赖青鸟. 高通量测序技术在肉类掺假检测中的应用进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(2): 411–426.
- GAN YQ, LU MM, LAI QN. Application progress of high-throughput sequencing technology in meat adulteration detection [J]. J Bioeng, 2022, 38(2): 411–426.
- [36] 陆惠芳. 食品微生物研究领域高通量测序技术的应用研究[J]. 食品安全导刊, 2022, (36): 157–160.
- LU HF. Study on the application of high-throughput sequencing technology in food microbiology research [J]. China Food Saf Magaz, 2022, (36): 157–160.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



俞 漪, 高级工程师, 主要研究方向为微生物和 PCR 技术在食品检测中的应用。
E-mail: yuyi@sqi.org.cn