

综述

高通量测序技术在食品微生物研究中的应用

吴林寰^{1,2}, 陆震鸣¹, 龚劲松¹, 史劲松¹, 许正宏^{1,3}

1 江南大学 药学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

3 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000

吴林寰, 陆震鸣, 龚劲松, 等. 高通量测序技术在食品微生物研究中的应用. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1164–1174.

Wu LH, Lu ZM, Gong JS, et al. Application of next generation sequencing in studying food microorganisms—a review. Chin J Biotech, 2016, 32(9): 1164–1174.

摘要: 高通量测序技术的快速发展对食品微生物发酵过程和机制研究产生了深刻的影响, 主要体现在食品微生物生理功能、代谢能力和进化的研究以及食品微生物群落结构、动态变化及其对环境的响应机制等方面。另外, 通过对食品微生物基因组和元基因组进行数据分析, 也对食品发酵过程优化、微生物功能改造、食源性微生物疾病预防和控制等提供了重要的依据。本文总结了近年来利用高通量测序技术对食品微生物基因组和元基因组进行测序的研究, 并探讨了测序技术的发展对食品微生物研究的影响及发展趋势。

关键词: 高通量测序技术, 食品微生物, 元基因组

Application of next generation sequencing in studying food microorganisms—a review

Linhan Wu^{1,2}, Zhenming Lu¹, Jinsong Gong¹, Jinsong Shi¹, and Zhenghong Xu^{1,3}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, Sichuan, China

Abstract: Next generation sequencing technology has revolutionized studies in fermentation process, in particular, to

Received: December 25, 2015; **Accepted:** June 12, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31271922), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2012AA021301, 2014AA021501, 2013AA102106).

Corresponding author: Zhenghong Xu. Tel: +86-510-85918206; E-mail: zhenghuxu@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31271922), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2012AA021301, 2014AA021501, 2013AA102106) 资助。

explore the mechanism by which food microorganisms, including physiology, metabolic pathways, diversity and dynamic changes of microbial community. In addition, phylogenetic characteristics of different species or strains of the food microorganisms are disclosed. All these aspects will help explain how the microbes are interacting and responding to environmental factors. Bioinformatics analysis of genome and metagenome sequence data of food microorganisms could provide essential clues to improve fermentation process and function of microbes as well as control and prevention of foodborne disease outbreak. In this review, we summarized recent genomics and metagenomics studies on food microorganisms. The impact of next generation sequencing for the development and trends of food microorganism researches were discussed in details.

Keywords: next generation sequencing, food microorganism, metagenomics

1 引言

食品微生物是与食品相关的微生物总称, 主要包括食品发酵微生物和工业生产用食品微生物; 从广义角度看, 食源性致病微生物也应该属于这个范畴。

在工业生产中使用的食品微生物主要是利用其生理特性生产某些食品组分或者改进食品的功能。微生物用于食品发酵在国内外均具有非常悠久的历史, 发酵食品不仅具有重要的食用价值, 也具有重大的工业价值。用于发酵的食品微生物主要包括丝状真菌、酵母和细菌, 或者是这些微生物共同作用的结果。在发酵过程中, 食品微生物的主要作用包括可以通过生成乙醇、有机酸、细菌素等代谢物抑制其他微生物的生长从而更好地保存食物; 通过抑制病原体或者消除有毒化合物来提高食品的安全性; 增加食品的营养或者风味^[1]。例如, 酵母菌可以在发酵过程中将面粉中的糖类物质分解产生 CO₂、醇、醛和有机酸等物质, 因此在酿酒的过程中发挥了重要的作用。乳酸菌是最重要的食品微生物之一, 参与了酱油、泡菜等食品发酵过程, 其代谢产生的乳酸能有效防止食物腐烂。醋酸菌则广泛地运用在食醋, 可可饮料

和白酒的酿造中^[2]。近年来, 利用微生物发酵生产食品添加剂迅速发展, 微生物发酵法生产醛类、酮类、内酯、萜类化合物等风味物质是食品中风味物质的重要来源^[3]。

另一方面, 微生物会造成食品的腐烂, 给人类的健康带来危害。食源性致病菌是指在食品的加工和流通过程中引入的病原菌, 由于其在食品中存活、生长代谢并引起食物的变质和破坏, 是引发食品安全事故的主要因素, 其中沙门氏菌、大肠杆菌、单增李斯特菌和肉毒梭状芽孢杆菌等都是重要的食源性致病菌^[4]。

早期的食品微生物研究主要依赖于传统的微生物技术, 如纯培养技术、菌种改造技术、发酵条件优化技术等。人们对食品微生物的研究, 产生了大量关于微生物的生理生化性状、功能特性、食品发酵过程参数等信息。随着高通量测序技术的发展, 产生了大量的食品微生物基因组和元基因组数据, 对食品微生物的研究方法和研究内容产生了深远的影响。微生物全基因组是指微生物的完整的基因组核苷酸序列信息, 利用该信息能够分析基因组结构, 认识其生物学功能, 对具有重要应用价值的微生物进行深入的研究。由于大量环境中的微生物难以分离培养, 并利用传统的方法进行全基因

组测序, Handelsman 提出了元基因组的概念。元基因组 (Metagenome), 也称微生物环境基因组或群落基因组, 是指生境中全部微小生物遗传物质的总和, 包含了可培养的和未可培养的微生物的基因^[5]。元基因组数据使得人们能够系统地分析微生物的代谢、微生物群落的相互作用及其对环境的反应机制。

2 高通量测序技术的发展

1953年, James Watson 和 Francis Crick 共同提出了 DNA 双螺旋结构, 标志着生命科学的发展进入了分子生物学阶段, 并由此引发了一场生命科学和生物技术革命。随后, DNA 测序技术便应运而生, 随着以 Sanger 测序技术为基础的第一代测序技术不断发展, 人类基因组计划于 1990 年正式启动, 截止到 2004 年人类基因组计划的测序工作基本完成^[6], 正式进入了后基因组时代。传统的测序方法已不能满足测序深度和测序效率等大规模测序的需求, 促使了以罗氏公司的 454、Illumina 公司的 HiSeq 以及 life technology 公司的 SOLiD、Ion Torrent 为代表的新一代测序技术 (Next-generation sequencing, NGS) 的诞生^[7], 其显著特点是高通量, 测序准确率明显优于以 Sanger 测序为代表的第一代测序技术, 价格也大幅降低。454 life sciences 是 2004 年左右推出的第一批基于焦磷酸测序法的商用超高通量基因组测序系统, 有速度快、读长较长、准确性高等优势, 但由于其通量低、成本高等缺点, 目前已逐步退出市场。随着对测序技术的改进, Illumina、Life technology 等公司生产的新一代高通量测序平台开始占据主流地位。Illumina 公司的 Solexa 和 Hiseq 是目前占据主要市场的第二代测序仪, 采用的是边合

成边测序的方法, 具有通量高、耗时短、成本低等特点。Life technology 推出的 Ion Torrent 的核心技术是通过半导体技术在化学和数字信息之间建立联系, 解读碱基信号, 具有准确性高、速度快、成本低的优势^[8]。

3 利用高通量测序技术开展食品微生物研究的发展迅猛

由于测序技术的飞速发展, 使得进行全基因组测序无论是时间还是费用都大幅降低, 因此近年来对食品微生物基因组和元基因组的研究也呈现出迅猛增长的态势。基因组分析能够系统研究单个微生物的代谢过程以及对环境的响应。中国学者对分离自马奶酒中的专利菌干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* BD-II^[9]和酸奶发酵菌株保加利亚乳杆菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain ND02^[10], 韩国学者对泡菜发酵的香肠乳杆菌 *Lactobacillus farciminis*^[11]、棒状乳杆菌 *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*^[12] 和高丽魏斯氏菌 *Weissella koreensis*^[13], 德国学者对分离自奶酪表面的变异棒状杆菌 *Corynebacterium variabile*^[14]和棒状杆菌 *Corynebacterium casei*^[15]都相继进行了全基因组测序, 并且进行了相关的比较基因组、代谢能力的分析。

由于测序效率以及测序质量的提高, 越来越多的物种被进行全基因组重测序 (Resequencing)。全基因组重测序是对已知参考基因组序列的物种进行不同个体间的基因组测序, 并在此基础上对个体或群体进行差异性分析, 剖析物种遗传和进化的过程, 获得新的功能基因。2014年, 日本学者 Kamada 等同时利用第三代测序仪 PacBio RS sequencer 和第二代

测序仪 Illumina MiSeq 对纳豆枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* BEST195 进行了重测序, 得到了一个更为完整和高质量的全基因组序列, 填补了之前对该菌株测序的空白部分, 并发现了 330 个新的蛋白质编码序列^[16]。

由于测序成本的大幅降低, 对不同的亚种和菌株进行测序, 利用比较基因组的方法, 构建某个物种的泛基因组 (Pan-Genome) 也成为可能。2005 年, Tettelin 等提出了微生物泛基因组概念, 包括核心基因组 (Core genome) 和非必需基因组 (Dispensable genome)。其中, 核心基因组指的是在所有菌株中都存在的基因; 非必需基因组指的是仅在部分菌株中存在的基因, 由于非必需基因的数量巨大, 泛基因组比单个基因组的要大几个数量级^[17]。泛基因组对于研究微生物在不同环境的适应性具有重要的价值。2013 年, Tamara 等对 34 株不同的副干酪乳杆菌 *Lactobacillus paracasei* 菌株进行了测序和比较基因组分析, 包括其核心基因组和非必需基因组。每个基因组大概包含 2 800–3 100 蛋白质编码基因, 其泛基因组大概包括 4 200 个直系同源, 其中 1 800 个为必需基因。必需基因包括与宿主相互作用相关的基因和一些形成支链脂肪酸的基因, 可变基因包括一些假设蛋白、糖代谢或者细胞表面相关的蛋白, EPS 合成蛋白等, 说明了 *Lactobacillus paracasei* 对不同生态的适应性^[18]。

食品微生物发酵通常是一个复杂的过程, 在发酵微生物群落中存在着大量难以培养的微生物, 元基因组测序分析成为研究微生物群落动态变化及其相互作用的重要手段^[19], 在传统食品如泡菜、白酒, 规模化的工业发酵如啤酒、乳制品以及研究食品的腐败过程中, 都已经广

泛地使用。中国学者对普洱茶发酵过程的元基因组进行了测序分析, 得到了微生物的群落结构和代谢功能的基本信息, 并对萜类和酮类化合物等次级代谢产物的生物合成途径进行了详细分析^[20]。日本学者 Takahashi 利用高通量测序对工业规模的啤酒和啤酒类饮料的发酵过程的微生物群落结构进行了分析, 发现细菌的菌群多样性随着煮沸、发酵前期、发酵后期、过滤等过程, 产生了极大的变化^[21]。爱尔兰学者通过对奶酪发酵中一天的不同时间段的微生物群落进行测序发现, 由于环境因素的变化, 在奶酪发酵的整个过程中, 稍晚时间段的奶酪比稍早时间段的有着更加丰富的细菌多样性^[22]。

MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov/>) 是由美国阿贡国家实验室开发的对元基因组数据进行储存和分析的一个重要平台, 目前已经注释了超过 20 万个元基因组, 并开放了 3 万多个元基因组的原始信息。其中, 与食品微生物相关的元基因组项目见表 1。由表中可见, 进行食品微生物元基因组分析的样本主要来自于牛奶、奶酪等乳制品以及泡菜等发酵食品。进行数据分析的种类既包括利用 16S rRNA 分析元基因组的多样性, 又包括对整个元基因组进行测序, 分析其群落功能和代谢能力。

4 高通量测序技术在食品微生物研究中的主要应用

4.1 全基因组测序在改善食品微生物功能研究中的应用

通过对食品中的微生物进行全基因组测序, 并对数据进行生物信息学分析, 能够帮助预测对发酵过程或者产品的性能产生重要作用的基因, 提供关于菌种的代谢途径及其与环境

表 1 重要的元基因组测序项目及数据

Table 1 Important projects and data of metagenome

Project or description (Number of metagenome)	Biome	Feature	Material
Metagenomic Analysis of Kimchi (13)	Food	Food	Food
MAP unmarinated broiler (1)	Food	Food	Food
Metagenome from marinated broiler file strips (1)	Food	Food	Food
Metagenomic DNA was isolated from buttermilk sample and the bacterial diversity of the sample was assessed by 16S based bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (1)	Food	Food	Food
The bacterial and fungal diversity in Mongolian naturally fermented milk in Russia (36)	Terrestrial biome	Dairy	Yogurt
Cheese rind biofilm samples from 137 cheeses, produced in 10 different countries, were analyzed by Illumina sequencing of the bacterial 16S rDNA (V4 region) and the fungal ITS1 region (2)	Temperate broadleaf and mixed forest biome	Biofilm	Cheese product
Illumina data from Dutton Lab cheese rind survey (24)	Temperate mixed forest biome	Biofilm	Cheese product
Sequences of colostrum and milk of 1 and 6 moths (42)	Tundra biome	City	Breast milk
Kefir supplementation (10)	Terrestrial biome	Livestock-associated Habitat	Dairy product
Grape must metagenome (8)	Terrestrial biome	Vineyard	Fermented fruit product

Data source : <http://metagenomics.anl.gov/>

之间相互作用的信息，从而对菌种进行筛选和优化提供重要的指导，提高菌种性能。随着乳制品行业的发展，以及人们对健康的关注，越来越多的益生菌被测序。2012年，印度学者 Prajapati 等相继对瑞士乳杆菌 *Lactobacillus helveticus*^[23]、鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus*^[24] 和嗜热链球菌 *Streptococcus thermophiles*^[25] 进行了全基因组测序，并对 *Streptococcus thermophiles* MTCC 5461 和 CNRZ 1066 进行了比较基因组分析。通过分析，表明与益生特性相关的基因如耐酸（谷氨酸转氨蛋白）、 β -半乳糖苷酶、产细菌素等在这两个基因组中都相对保守，MTCC 5461 的基因组中，还含有一些 DNA 调控和合成的特有基因。但是，在其他致病性的链球菌属，如酿脓链球菌

Streptococcus pyogenes 和肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae* 中，普遍存在的编码解旋酶 RecQ 的基因，在 MTCC 5461 和 CNRZ 1066 等益生菌中则不存在，RecQ 是负责维持基因组稳定性的重要酶。

全基因组测序是研究微生物多样性的一个重要手段，随着测序数据的不断丰富，通过对同属或同种内的菌种基因组序列进行比较，发现存在着相当大的基因和功能的多样性。可以发现，由于不同的环境原因，对同属内菌种或同种内菌株在基因的构成或表达水平上，也有着显著的差异，对于食品微生物的研究也有着重要的意义。对食品来源的微生物和非食品中的微生物进行比较分析研究，能够发现很多对于食品的功能特性有重要价值的基因。荷兰学

者 Bachmann 等对分离乳制品和非乳制品来源的 84 株乳酸链球菌 *Lactococcus lactis* 中涉及氮代谢和脂肪酸代谢的 5 种关键酶进行分析,发现在基因的表达和调控方面存在显著的差异,也说明基因调控的变化是菌种进化的重要动力^[26]。肠球菌 *Enterococci bacteria* 是一种能造成菌血症、心内膜炎等感染的重要的致病菌,然而,近年的研究发现,*Enterococci bacteria* 的某些菌株不仅没有致病性,反而是作为一种益生菌在使用。例如屎肠球菌 *Enterococci faecium* T-110 能够缓解腹泻并且促进康复,已经作为一种益生产品在广泛使用。2015 年,印度学者对 *Enterococci faecium* T-110 进行了全基因组测序,并且与致病性和非致病性的 *Enterococci faecium* 进行了比较基因组分析,发现 *Enterococci faecium* T-110 有 348 个特有的开放阅读框架,编码 ABC 转运蛋白,ABC 转运酶,细菌素以及细菌素相关的膜整合蛋白,这些蛋白大部分都具有已知的抗菌活性。而与 VFDB 数据库中的 40 个毒性基因进行对比,发现包括屎肠球菌表面蛋白 (esp) 在内的 32 个毒性基因是不存在的,这也说明即使是同一属内的菌株,由于环境的差异也会导致进化差异^[27]。

水平基因转移 (Horizontal gene transfer, HGT) 指在差异生物个体之间,或单个细胞内部细胞器之间所进行的遗传物质的交流。进行基因转移的个体可以是远缘的,甚至没有亲缘关系的生物个体。发生在食品微生物之间的水平基因转移会使微生物产生新的代谢特征,例如对底物的利用、细菌素、表多糖、生物胺的产量,抗生素抗性等。如果通过基因转移获得的有利的基因,能够促使性状得到改变或者发酵过程的指标得到提升,相反,如果获得的是有

害的基因,则会有可能产生食品安全等问题^[28]。通过比较基因组学的方法,能够研究食品微生物的水平基因转移。希腊学者 Konstantinos 等对从乳制品中分离的 *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 进行比较基因组研究发现,其基因组中含有能够适应牛奶环境的基因,例如乳糖和半乳糖代谢,酪蛋白水解系统,噬菌体抗性能力等基因簇,这些基因簇都展示了与无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae*、中链球菌 *Streptococcus intermedius*、乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 和 *Streptococcus thermophiles* 等菌株之间极高的序列相似性,显示这些菌株可能是水平基因转移的供体^[29]。

利用性能更加优异的出发菌株,或者优化发酵的过程,是提高食品发酵产物的口味、功能物质、营养成分、产量的重要手段。利用全基因组数据,进行全基因组规模的代谢网络重构,利用计算的方法,对代谢能力进行预测和模拟,实现菌株的改造或者发酵过程的优化。目前,对酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的研究日益增加,产生了大量的基因组数据和实验数据,将二者结合,对酿酒酵母进行全基因组规模的代谢网络重构,利用这个模型就能够对发酵过程中的代谢物的产生和消耗进行研究,模拟在不同条件下代谢反应的过程,从而对基因的功能进行更加准确的研究^[30]。基因组规模的代谢网络可以用来研究基因型和表型之间的关系,比较不同物种之间的差异,也能够提供一个整合转录组、蛋白质组和代谢组数据的框架。在乳酸菌研究方面,目前已经有 4 个物种建立了代谢模型。*Lactococcus lactis* MG1363 的代谢模型用来研究奶酪发酵中的碳代谢和氮代谢形成风味物质的过程^[31]。胚芽乳

杆菌 *Lactobacillus plantarum* 的代谢网络用来评估菌种的营养需求^[32]。罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* JCM1112 的代谢网络重构用来研究菌株的益生特性^[33]。*Lactobacillus casei* ATCC 334 和 12A 的代谢网络模型用来分析基因型和菌种的生理功能之间的关系,从而为菌种的工业改造提供依据^[34]。

4.2 高通量测序技术在食品安全研究中的应用

食品安全是食品工业中的一个重要研究领域,其中,由于微生物腐败导致的食品安全问题是研究重点。利用全基因组测序,对食品中的有害微生物进行全基因组测序,从而进行包括毒力因子的鉴定,生存机制的研究等。鱼乳球菌 *Lactococcus piscium* 是导致食品腐败的嗜冷乳酸菌,主要在冷藏的包装肉类食品中分离得到。芬兰学者 Margarita 等对 *Lactococcus piscium* MKFS47 进行全基因组测序并将其与 *Lactococci* 的其他 29 个基因组进行了比较基因组分析,发现在生成腐烂物质的过程中,丙酮酸代谢途径上存在差异,导致转变成了异型发酵,同时,*Lactococcus piscium* MKFS47 所特有的基因,使其能够产生对肉类物质有害的化合物^[35]。环境和过程的参数的不同,可能对微生物的群落结构和动态变化产生影响,从而影响导致食品腐烂变质的微生物的生长差异,引起食品安全问题。利用快速的 16S rRNA 测序的方法,对环境和过程的变化进行监测,有助于了解微生物的生存机制,并做出有效地控制。通过对存储在真空、空气和气调保鲜包装等不同环境中牛排中的微生物群落结构及代谢物的变化进行监控,发现牛肉的存储时间随着微生物的群落结构以及代谢物的产生有着巨大的差

异,从而能对牛肉的保鲜条件进行指导^[36]。

高通量测序在分析微生物所引起的食品安全事件中也发挥着重要的作用。与传统方法相比,高通量测序能快速、准确地提供毒株的基因组特征信息,从而对引起疾病的微生物菌株进行溯源研究。沙门氏菌是 1 种常见的食源性致病菌,在各类细菌性食物中毒中占有极高的比例。全基因组测序的方法目前已经广泛地运用到了沙门氏菌引起的食物中毒的溯源和追踪研究中。英国科学家通过全基因组测序分析了 2013 年暴发的沙门氏菌感染,证实了分离自蛋黄酱的鼠伤寒沙门氏杆菌 *Salmonella typhimurium* DT 8 导致人类感染^[37]。为了实现快速鉴定的目的,Georgia 大学的科学家建立了 SeqSero 数据库,能够对 *Salmonella* 不同血清型的原始测序数据或者全基因组数据进行比对。

2012 年 3 月,由美国食品药品监督管理局(FDA),加州大学戴维斯分校,安捷伦公司,美国疾病预防控制中心等机构共同合作,提出 100 K 食源性病原微生物基因组测序计划。该计划的目的是利用高通量测序平台,进行 10 万株食源性病原菌基因组测序,从而建立最大的公共数据库,研究致病菌的致病性、药物反应等生物特性,以帮助鉴定食源性病原菌并进行溯源,从而在食源性危机爆发时,在最短的时间能够进行反应和处理。该项目测序产生的数据将全部通过 NCBI 进行公开,对食品安全研究提供最重要的参考数据源 (<http://100kgenome.vetmed.ucdavis.edu/index.cfm>)。

4.3 利用高通量测序进行食品微生物元基因组研究

食品微生物发酵作为一种传统的发酵过

程,通常是混合发酵,其微生物的菌群结构相对复杂,且具有难以分离或培养的成分,因此,通常对于发酵过程及菌群间的相互作用知之甚少,而元基因组的方法不需要对菌株进行分离而直接测序,对于食品微生物的群落研究非常有效。

在对微生物群落结构及其变化的研究中,通过 16S rRNA 测序,能够快速和高效地监控发酵过程中的参数变化,如原材料的量,菌种条件,群落结构等动态变化,将微生物的群落结构和过程参数进行结合分析。例如,为了研究汾酒的微生物发酵群落结构和发酵过程的微生物的组成,对细菌 16S rRNA 和真菌 ITS 序列克隆文库和焦磷酸测序分别进行了测序。结果显示,相较真菌,细菌有着更加丰富的多样性,在窖泥的表面,主要是乳杆菌科 Lactobacillaceae,而在空气和水分相对稀少的窖泥内部,则主要是以芽孢杆菌科 Bacillaceae 为主。真菌的含量在汾酒发酵过程中保持相对稳定^[38]。

然而,由于 16S rRNA 序列的高度保守性,对于相似性较高的种或菌株则难以用来进行分析。此时,通过对整个群落的基因进行直接测序则能够对微生物群落进行更加系统的研究,也更加全面地了解食品发酵过程中微生物群落的复杂性。美国哈佛大学学者 Wolfe 对 24 种不同的奶酪表皮群落进行了元基因组直接测序,揭示了其中 24 种主要的细菌和真菌,并将其作为一种模式生态系统,用来研究微生物之间的相互作用和变化机制^[39]。

微生物元基因组的研究及数据的分析很大程度上依赖于参考菌株数据库的丰富度。例如,传统奶酪的发酵是一个典型的微生物群落作用

的结果,然而,目前对奶酪发酵的群落结构、安全性、不同微生物作用等特征的研究还不够成熟,一个重要的原因就是参考菌株数据库的缺乏。Almeida 等利用低成本测序方法建立了一个奶酪菌群的参考菌群数据库,挑选了分离自乳制品的 67 个属 137 个物种的 142 株细菌的基因组进行了测序,并且重构了 117 个基因组。其中克吕沃尔菌属 *Kluyvera*、黄球菌属 *Luteococcus* 和海生乳杆菌属 *Marinilactibacillus* 等微生物的信息目前在公共数据库中还未出现,对乳制品微生物群落研究起到了重要的作用^[40]。

对微生物群落不同角色的功能研究就更加困难,利用元基因组数据,构建元代谢途径 (Meta-pathway),能够为微生物群落的代谢特征提供更加详细的解析。例如,利用元基因组测序的方法,对巴西可可豆菌群进行分析,发现酵母、乳酸菌和醋酸菌是发酵菌群的主要微生物,其中,酵母主要在发酵的初始阶段用于可浆的脱水作用,碳水化合物的分解并产生乙醇。在发酵过程中,乳酸菌的作用能消耗葡萄糖、果糖和柠檬酸,从而产生乳酸、醋酸和甘露醇。随着环境的变化,醋酸菌逐渐发挥了主要作用,将乙醇和乳酸氧化成醋酸再进一步将醋酸氧化生成二氧化碳和水^[41]。但是,在这个过程中具体的代谢途径、某条特定的代谢途径对于化合物生成的作用、各个物种之间的相互作用及其机制都是不清楚的。因此,Illegheims 等进一步地基于元基因组测序数据,构建了元代谢途径,详细解析了可可豆发酵过程中不同微生物在各代谢物产生中的作用^[42]。

5 展望

随着测序技术的发展,基因组与元基因组技术成为食品微生物研究最重要的推动力之一。2008年 PacBio 公司开发了第三代单分子测序技术,以其更快速、更准确和更廉价等特点为未来测序市场带来颠覆性的影响。未来,高通量测序技术将进一步在以下方面为食品微生物研究提供重要的支持: 1) 利用基因组规模的代谢网络重构与模拟,能够对微生物进行系统水平的研究,并为微生物的调控提供重要线索; 2) 利用基因组技术、元基因组技术与转录组、代谢组等其他组学技术相结合,能够更加全面地研究食品微生物群落的代谢物、代谢能力、生态组成和动态变化等信息; 3) 利用生物信息学工具和大数据的方法,建立预测模型,对食品微生物及其群落的特征及其变化进行研究,也将成为一个重要的方向。

REFERENCES

- [1] Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol*, 2012, 154(3): 87–97.
- [2] Ravyts F, De Vuyst L, Leroy F. Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Eng Life Sci*, 2012, 12(4): 356–367.
- [3] Chen Y, Lu LX, Xiong XH. Production of food flavor by microbial fermentation. *China Cond*, 2011, 36(7): 13–17 (in Chinese).
陈妍, 陆利霞, 熊晓辉. 微生物发酵法生产食品风味物质. *中国调味品*, 2011, 36(7): 13–17.
- [4] Xia AP, Gong HP, Zheng RX. Hazard of microbiology with food security and their rapid detection technology. *Life Sci Instrum*, 2012, 10(5): 8–12 (in Chinese).
夏爱萍, 龚鸿萍, 郑睿行. 微生物对食品安全的危害及其快速检测技术. *生命科学仪器*, 2012, 10(5): 8–12.
- [5] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(4): 669–685.
- [6] International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 2004, 431(7011): 931–945.
- [7] Liu L, Li YH, Li SL, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 251364.
- [8] Metzker ML. Sequencing technologies —the next generation. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(1): 31–46.
- [9] Ai LZ, Chen C, Zhou FF, et al. Complete genome sequence of the probiotic strain *Lactobacillus casei* BD-II. *J Bacteriol*, 2011, 193(12): 3160–3161.
- [10] Sun ZH, Chen X, Wang JC, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain ND02. *J Bacteriol*, 2011, 193(13): 3426–3427.
- [11] Nam SH, Choi SH, Kang A, et al. Genome sequence of *Lactobacillus farciminis* KCTC 3681. *J Bacteriol*, 2011, 193(7): 1790–1791.
- [12] Nam SH, Choi SH, Kang A, et al. Genome sequence of *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* KCTC 3167. *J Bacteriol*, 2011, 193(4): 1014–1015.
- [13] Lee SH, Jung JY, Lee SH, et al. Complete genome sequence of *Weissella koreensis* KACC 15510, isolated from Kimchi. *J Bacteriol*, 2011, 193(19): 5534.
- [14] Schröder J, Maus I, Trost E, et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. *BMC Genomics*, 2011, 12: 545.
- [15] Walter F, Albersmeier A, Kalinowski J, et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium casei* LMG S-19264^T (=DSM 44701^T), isolated from a smear-ripened cheese. *J Biotechnol*, 2014,

- 189: 76–77.
- [16] Kamada M, Hase S, Sato K, et al. Whole genome complete resequencing of *Bacillus subtilis* Natto by combining long reads with high-quality short reads. PLoS ONE, 2014, 9(10): e109999.
- [17] Medini D, Donati C, Tettelin H, et al. The microbial pan-genome. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(6): 589–594.
- [18] Smokvina T, Wels M, Polka J, et al. *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. PLoS ONE, 2013, 8(7): e68731.
- [19] Sieuwerts S, de Bok FAM, Hugenholtz J, et al. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(16): 4997–5007.
- [20] Lyu C, Chen CY, Ge F, et al. A preliminary metagenomic study of Puer tea during pile fermentation. J Sci Food Agric, 2013, 93(13): 3165–3174.
- [21] Takahashi M, Kita Y, Kusaka K, et al. Evaluation of microbial diversity in the pilot-scale beer brewing process by culture-dependent and culture-independent method. J Appl Microbiol, 2015, 118(2): 454–469.
- [22] O’Sullivan DJ, Cotter PD, O’Sullivan O, et al. Temporal and spatial differences in microbial composition during the manufacture of a continental-type cheese. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(7): 2525–2533.
- [23] Prajapati, JB, Khedkar CD, Chitra J, et al. Whole-genome shotgun sequencing of an Indian-origin *Lactobacillus helveticus* strain, MTCC 5463, with probiotic potential. J Bacteriol, 2011, 193(16): 4282–4283.
- [24] Prajapati JB, Khedkar CD, Chitra J, et al. Whole-genome shotgun sequencing of *Lactobacillus rhamnosus* MTCC 5462, a strain with probiotic potential. J Bacteriol, 2012, 194(5): 1264–1265.
- [25] Prajapati JB, Nathani NM, Patel AK, et al. Genomic analysis of dairy starter culture *Streptococcus thermophilus* MTCC 5461. J Microbiol Biotechnol, 2013, 23(4): 459–466.
- [26] Bachmann H, Starrenburg MJC, Dijkstra A, et al. Regulatory phenotyping reveals important diversity within the species *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(17): 5687–5694.
- [27] Natarajan P, Parani M. First complete genome sequence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain T-110 and its comparative genome analysis with pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus faecium* genomes. J Genet Genomics, 2015, 42(1): 43–46.
- [28] Rossi F, Rizzotti L, Felis GE, et al. Horizontal gene transfer among microorganisms in food: current knowledge and future perspectives. Food Microbiol, 2014, 42: 232–243.
- [29] Papadimitriou K, Anastasiou R, Mavrogonatou E, et al. Comparative genomics of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 against related members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. BMC Genomics, 2014, 15: 272.
- [30] Borneman AR, Desany BA, Riches D, et al. Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genet, 2011, 7(2): e1001287.
- [31] Flahaut NAL, Wiersma A, van de Bunt B, et al. Genome-scale metabolic model for *Lactococcus lactis* MG1363 and its application to the analysis of flavor formation. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(19): 8729–8739.
- [32] Teusink B, Wiersma A, Molenaar D, et al. Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. J Biol Chem, 2006, 281(52): 40041–40048.
- [33] Saulnier DM, Santos F, Roos S, et al. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. PLoS ONE, 2011, 6(4): e18783.

- [34] Vinay-Lara E, Hamilton JJ, Stahl B, et al. Genome-scale reconstruction of metabolic networks of *Lactobacillus casei* ATCC 334 and 12A. PLoS ONE, 2014, 9(11): e110785.
- [35] Andreevskaya M, Johansson P, Laine P, et al. Genome sequence and transcriptome analysis of meat-spoilage-associated lactic acid bacterium *Lactococcus piscium* MKFS47. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(11): 3800–3811.
- [36] Ercolini D, Ferrocino I, Nasi A, et al. Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(20): 7372–7381.
- [37] Ashton PM, Peters T, Ameh L, et al. Whole genome sequencing for the retrospective investigation of an outbreak of *Salmonella typhimurium* DT 8. PLoS Curr, 2015, doi: 10.1371/currents.outbreaks.2c05a47d292f376afc5a6fedd8a7a3b6.
- [38] Li XR, Ma EB, Yan LZ, et al. Bacterial and fungal diversity in the starter production process of fen liquor, a traditional Chinese Liquor. J Microbiol, 2013, 51(4): 430–438.
- [39] Wolfe BE, Button JE, Santarelli M, et al. Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity. Cell, 2014, 158(2): 422–433.
- [40] Almeida M, Hébert A, Abraham AL, et al. Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. BMC Genomics, 2014, 15: 1101.
- [41] Illegghems, K, De Vuyst L, Papalexandratou Z, et al. Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. PLoS ONE, 2012, 7(5): e38040.
- [42] Illegghems K, Weckx S, De Vuyst L. Applying meta-pathway analyses through metagenomics to identify the functional properties of the major bacterial communities of a single spontaneous cocoa bean fermentation process sample. Food Microbiol, 2015, 50: 54–63.

(本文责编 郝丽芳)