DOI:10.12441/spyswjs.20250812001 [文章编号] 1673-1689(2026)06-0001-11

益生菌产品中菌群组成快速鉴别技术研究进展

谷贤晶 于 颖 夏永军 王光强 艾连中 杨昳津*

(上海理工大学健康科学与工程学院,上海 200093)

摘要:益生菌对人体健康具有多种促进作用,目前已广泛应用于食品、医药等领域。益生菌的功效高度依赖于产品中特定的微生物群落组成,因此,快速、准确的菌群组成鉴别技术对产品质量控制、功效评估与市场监督管理具有重要支撑作用。作者将现有鉴别方法划分为基于培养的方法、单细胞分析技术、分子生物学技术3类,综述了各类技术的原理、具体分析内容(如活菌计数、群落多样性解析),同时指出当前技术所面临的挑战,并对未来研究方向进行了展望,旨在为益生菌产品质量控制及相关领域的发展提供参考。

关键词:益生菌产品;群落组成;快速鉴别技术

Research Progress in Rapid Identification Technologies for Community Composition in Probiotic Products

*GU Xianjing YU Ying XIA Yongjun WANG Guangqiang AI Lianzhong YANG Yijin**

(School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Probiotics exert multiple beneficial effects on human health and have been widely applied in fields such as food and medicine. Their efficacy is highly dependent on the specific microbial community composition in the products. Therefore, rapid and accurate identification technologies for community composition play a crucial supporting role in product quality assurance, efficacy control, and market supervision and management. According to technical principles, the author classifies existing identification methods into three categories: culture-based methods, single-cell analysis technologies, and molecular biology technologies. The author elaborates on the principles and specific analytical contents (such as viable count and community diversity analysis) of each category of technologies. Meanwhile, the author points out the challenges currently faced by these technologies and provides prospects for future research directions, aiming to offer a reference for the quality control of probiotic products and the development of related fields.

Keywords: probiotic product; community composition; rapid identification technology

作为一类对人体健康具有显著正向调节作用的功能性微生物,“益生菌”这一专业术语最早由德国科学家Kollath于20世纪50年代提出,当时用来指代微生物产生的能够促进其他有益微生物生长的活性物质[1-2]。随着研究的深入,联合国粮食及农业组织/世界卫生组织(FAO/WHO)将益生菌定义为“当摄入足够剂量时,能对宿主产生健康作用的活性微生物”[3-5]。随后大量研究证实益生菌对人类健康有多方面益处,如减缓压力、促进生长、增强免疫力、增强肠道屏障功能、降低慢性疾病发生风险等[6-11]。

要实现益生菌的健康促进作用,最终产品必须满足菌群组成明确、菌株真实、活菌数达标等基本

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2024YFD2100901);国家自然科学基金项目(32372307);上海市启明星项目(24QA2706000);中国科协青年人才托举工程项目(YESS20220128)。

通信作者:杨昳津(1991—),女,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要从事基于功能导向的优良食品微生物选育及其应用机制研究。E-mail:yijinyang@usst.edu.cn

收稿日期:2025-08-12 **修回日期:**2025-10-15

条件[12-13]。其中活菌数需达到每克或每毫升 1×10^8~1×10^9 CFU，以确保至少有 1×10^6 CFU 的活菌能抵达直肠[14-15]。常见的某品牌活性乳酸菌酸奶，不仅出厂时乳酸菌活菌数可高达 8×10^8 CFU/mL，符合上述剂量要求，其标注的发酵菌株（如乳双歧杆菌、嗜热链球菌等）经检测也与实际群落组成一致。基于明确的健康价值，益生菌产品在注重健康的消费群体中越来越受欢迎，这推动了全球益生菌产品的需求量不断增长[16]。随着益生菌产品的大量涌现，功效宣传夸大、配方合理性不足、菌株真实性与活性难以保障等市场乱象日益凸显。多项针对欧美市售益生菌产品的研究发现，部分产品的微生物群落组成与生产商宣传的存在差异，且活菌数不足[17-18]。因此，构建一套全面、精准、快速、灵敏且普遍适用的检测方法已成为推动益生菌行业快速发展的首要任务[19-20]。

当前益生菌群落组成的检测方法种类繁多，依据技术原理可划分为基于培养的方法、单细胞分析技术、分子生物学技术 3 类。其中基于培养的方法中的平板培养法与分子生物学技术中的聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）应用较为普遍，具有操作简便、成本较低的优点，但难以全面评估微生物群落组成。近年来，分析益生菌群落组成的检测方法持续迭代优化，基于培养的方法作为传统核心技术，其操作体系已较为成熟，目前优化方向聚焦于缩短培养周期、提升选择性培养基对目标菌株的分离效率。在单细胞分析技术领域，流式细胞术（flow cytometry，FCM）已广泛用于细菌计数，不仅能快速完成细菌定量，还能同步测定细菌的代谢活力，提升了检测效率[21-22]。在分子生物学技术领域，新一代测序技术通过靶向 16S 核糖体核酸（16S ribosomal RNA，16S rRNA）编码基因并结合宏基因组鸟枪法测序技术，可在不依赖菌体培养的前提下，精准评估益生菌样品中微生物的相对丰度；实时荧光定量聚合酶链式反应（quantitative polymerase chain reaction，qPCR）则在 PCR 基础上进一步提升了目标菌株的定量精度与检测效率[23-24]。此外，Nami 等[25]围绕乳酸杆菌属约翰逊乳杆菌（*Lactobacillus johnsonii*）的 CRISPR-Cas 系统展开研究，为分子生物学技术在益生菌群落组成快速鉴定中的应用提供了多方面的技术思路和理论支持，对推动相关检测技术的发展具有重要意义。

各类技术的发展完善弥补了基于培养的方法在复杂样品分析、快速检测等方面的不足。但不同技术之间并非简单的替代关系（如基于培养的方法仍是获取纯培养物的核心方法），实际应用中常通过多技术联用实现更精准的微生物检测。鉴于此，作者系统综述了益生菌群落组成的鉴定技术。从基于培养的方法（平板培养法、生理生化法）、单细胞分析技术（流式细胞术）、分子生物学技术（PCR、qPCR、高通量测序、CRISPR-Cas12a 技术）的原理入手，对比各类技术的优势与应用局限，阐明其在益生菌群落鉴定中的独特价值，旨在为益生菌产品研发、质量控制等方面提供参考。

1 益生菌产品的群落组成

健康是消费者的核心需求，在快节奏的现代生活中，人们往往借助与健康相关的外界资源来维持健康，益生菌产品便是其中的热门品类[26-29]。这类产品中微生物群落组成丰富多样，包含多种对人体有益的菌属，如乳杆菌属（*Lactobacillus*）[30]、双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）[31]、芽孢杆菌属（*Bacillus*）[32]、酵母菌属（*Saccharomyces*）[33]。它们在生物学特征、代表性菌株及功能上各有侧重：乳杆菌属是一类革兰氏阳性、无芽孢的兼性厌氧杆菌，常见的菌株包括鼠李糖乳酪杆菌（*Lacticaseibacillus rhamnosus*）、嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）等，其核心功能包括调节肠道菌群，以及通过发酵产生的乳酸维持肠道酸性环境，从而抑制有害菌；双歧杆菌属是革兰氏阳性、无芽孢的专性厌氧杆菌，代表性菌株有长双歧杆菌长亚种（*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*）、短双歧杆菌（*Bifidobacterium breve*）等，常见功能包括增强免疫力、促进消化等；芽孢杆菌属是革兰氏阳性、能形成芽孢的需氧或兼性厌氧杆菌，常见菌株包括枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*），凭借芽孢结构可耐受极端环境，从而定植肠道，具有改善便秘、抗氧化等功效；酵母菌属作为单细胞真菌，具有兼性厌氧特性，其中布拉氏酵母菌（*Saccharomyces boulardii*）是酵母菌属中应用最广泛、研究最深入的益生菌之一，常见功能包括治疗抗生素相关性腹泻等。这些菌属通过各自的独特功能协同作用，共同发挥调节肠道菌群、增强免疫力、促进消化等功效。

为满足不同的使用需求，益生菌产品通常以

多种形式呈现：液体形式如益生菌发酵乳、益生菌饮料等，有利于菌群进入肠道并发挥作用；固体形式如口服胶囊、咀嚼片等，便于携带且利于长期储存；此外还有滴剂等半流体形式产品，见表1。当前，为提升产品综合功效，益生菌产品多采用多菌株或跨菌属复配的形式，通过不同菌群的协同作用，满足人体更多样的生理调节需求。而益生菌产品能否真正起效，核心在于各菌株是否达到有效活菌数标准，以及不同菌属的菌株比例是否合理。这高度依赖检测技术的支撑，上述3类检测技术为解析益生菌群落组成提供了不同路径，在不同应用场景中均展现出独特的应用价值，为深化对益生菌产品菌群的认识奠定了基础。

表1 常见益生菌产品的核心功能菌株分类及应用

Table 1 Classification and applications of core functional strains in common probiotic products

菌属	代表性菌株	功能特性	常见产品形式
乳杆菌属	鼠李糖乳酪杆菌	调节肠道菌群、缓解腹痛	益生菌制剂、发酵乳
	嗜酸乳杆菌	抑制有害菌、改善乳糖不耐受	酸奶、咀嚼片
双歧杆菌属	长双歧杆菌长亚种	增强免疫力、促进消化	婴幼儿配方奶粉
	短双歧杆菌	调节过敏体质、适合母婴群体	益生菌滴剂
芽孢杆菌属	枯草芽孢杆菌	耐100 ℃高温、抗氧化	膳食补充剂
酵母菌属	布拉氏酵母菌	治疗抗生素相关性腹泻	口服胶囊、液体益生菌

2 基于培养的方法

基于培养的方法以“微生物在特定培养基上的生长特性”为核心，通过人工模拟生长环境使微生物形成可见菌落或发生生化反应，进而鉴别微生物。这类技术是微生物研究领域的经典方法，适合基层实验室进行常规检测。

2.1 平板培养法

平板培养法依据不同微生物在特定培养基上的生长特性，将益生菌样品接种到选择性培养基中，在适宜环境中培养成可见菌落后，通过菌落形态（颜色、大小、形状、质地等）对微生物进行初步分类。该方法在益生菌发酵乳制品的早期研究阶段发挥了重要作用。如徐松滨等[34]通过将酸奶样品接种到选择性培养基上，成功分离并鉴定出保加利亚乳杆菌（*Lactobacillus bulgaricus*），为后续微生物分离鉴定技术的发展提供了重要参考。但是平板培养法在益生菌鉴定中存在明显不足，如难以全面反映产品的群落组成，且操作周期长。赵婷等[35]研究证实，该方法仅能检测出特定培养基与培养条件下可生长的微生物，对不可培养的微生物易造成漏检，且培养阶段就需要72 h，检测效率偏低。因此，平板培养法难以满足精准的群落组成分析需求。

2.2 生理生化法

在益生菌群落组成鉴别中，生理生化法是基于不同菌株独特的生理代谢特性与生化反应能力，通过特异性反应实现菌株分类鉴定。由于该方法需以纯培养物为前提，因此通过平板培养法获得纯培养菌落后，通常需结合生理生化测试进一步提升鉴别准确性。以法国生物梅里埃公司开发的生化鉴定试剂盒API 50 CHL为典型代表，该试剂盒通过检测细菌对碳水化合物的发酵能力等核心生理特性指标，实现对乳酸菌等菌株的精准分类与鉴别[36]。相较于形态学分类方法，API 50 CHL试剂盒显著提升了鉴定的特异性。Lee等[37]通过API 50 CHL试剂盒初步鉴定菌株为嗜酸乳杆菌A12，同源性达99.9%，其精准度远超仅依赖形态学特征的鉴定方法。尽管API 50 CHL试剂盒推动了鉴定技术的进步，但实际应用中仍存在以下问题：一是重复性不足。对相同嗜酸乳杆菌菌株的50种表型模式进行测试时，结果均无一致性反应[38]。二是鉴定效率有限。经API 50 CHL鉴定的菌株中有1/3无法明确鉴定[39]。三是准确性不够。研究证实，API 50 CHL的检测结果与已知原始菌种存在差异[36,40]。生理生化法本质上是对纯培养物进行单菌株检测，无法满足复合益生菌产品群落组成的解析需求，这一技术特性决定了其在群落组成整体鉴定方面存在精度不足的问题。

基于培养的方法虽在微生物研究史上发挥过关键作用，但随着益生菌产业的快速发展，其在实际应用中的不足日益凸显。一是不同微生物生长速度差异较大。对于难以培养的微生物，该方法可能需要数周时间，不符合快速鉴定要求。二是对不

可培养微生物及群落形态与生理功能相似的菌群存在检测盲区，难以精准识别。因此，基于培养的方法在区分或选择性计数复合益生菌产品中的菌落组成方面存在困难，无法满足当前快速发展的益生菌行业的需求[41-42]。在此背景下，无需依赖微生物培养的检测技术正逐渐成为新的方向。

3 单细胞分析技术

益生菌产品通常宣称包含多种菌株，且菌株种类与产品标注一致，然而部分产品因生产工艺缺陷、储存不当等问题，实际活菌数远低于宣传值。因此，对复合益生菌产品进行活菌计数是保障产品品质的关键[43]。

几十年来，细菌存活力一直采用标准化平板计数方法进行评估，其原理是对琼脂培养基上生长的细菌进行定量，以可见菌落的形式呈现结果[44]。基于培养的方法（如琼脂扩散法、平板计数法）不仅耗时长、灵敏度低，还存在一个关键问题：许多益生菌可能无法培养或在培养条件下生长有限，无法培养并不意味着细胞已经死亡，这类微生物仍表现出活细胞的典型特征，这些“活但不可培养微生物（viable but non-culturable，VBNC）”往往被基于培养的方法所遗漏。

FCM 在微生物计数方面，有效地平衡了检测效率、精准度、操作成本这三者的关系，相较于基于培养的方法，其应用更广泛[45]。作为一种单细胞分析技术，FCM 可通过检测荧光信号和散射光信号来识别细胞的特征[46-47]。如图 1 所示，其基本原理可分为样本处理、信号检测、数据分析 3 个核心环节。先将益生菌样本制备成单细胞悬液，用特异性荧光染料（如活细胞染绿色、死细胞染红色）标记；再让细胞在鞘液驱动下以单细胞流形式通过激光检测区，产生反映细胞大小/结构的散射光信号、反映活/死状态的荧光信号；最后通过计算机软件分析信号，实现活菌计数、活死区分及细胞特性判定，全程无需依赖微生物培养。

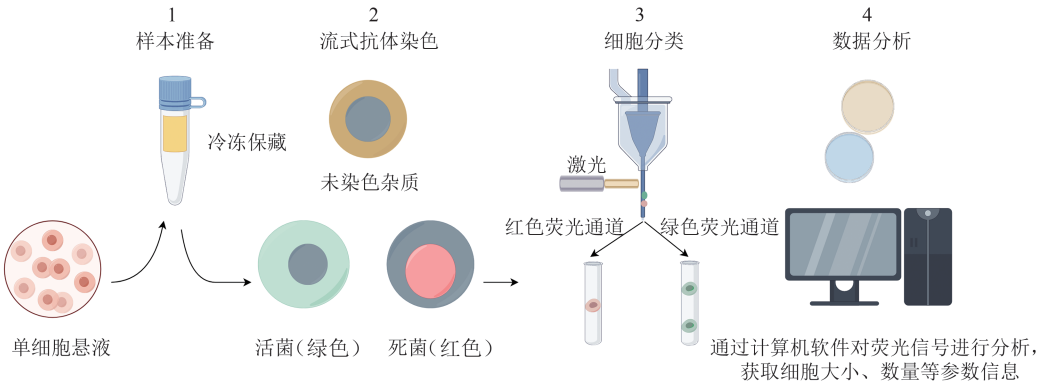


图 1 FCM 基本原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the basic principle of FCM

Tracey 等[45]研究表明，相较基于培养的方法（如平板计数法），FCM 可将检测时间从数天缩短至数小时，显著提升了检测效率。同时 FCM 还可检测到平板计数法所遗漏的 VBNC 菌株。在益生菌产品的工业生产过程中，VBNC 在培养物中频繁出现，因此，FCM 能够避免因低估活菌数导致的产品质量误判，这是仅通过培养法无法实现的[48-49]。但有研究发现，当样本中含有高比例非活菌菌株（如 CUL61）时，FCM 检测出的活菌回收率达到了 111.56%，表明在复杂混合菌中，双重染色信号与活菌的绿色荧光信号可能产生重叠，从而影响检测结果的真实性[45]。

因此，FCM 虽在益生菌活菌定量分析中具备检测快速、单细胞分辨率高的优势，还能提供活菌计数、菌株鉴定、生理特性分析等检测功能[50-51]。但受样本微生物组成特性的影响，当样本中含有较高比例非活菌时，FCM 可能因染色重叠问题高估活菌数量，从而导致结果偏差。未来可开发具有特异性识别与多靶点结合能力的荧光标记体系，利用多通道信号交叉验证减少染色重叠干扰；同时，结合微流控芯片技术实现样本中活菌的精准富集与单细胞捕获，降低高比例死细胞的背景干扰，进一步提升检测的准确性。

4 分子生物学技术

4.1 PCR技术

在益生菌群落组成鉴别中，PCR技术的核心原理是通过体外模拟DNA复制过程，实现目标菌株特异性核酸片段的快速扩增与检测，从而精准识别样本中是否存在特定益生菌菌株。PCR作为分子生物学领域的革命性突破，相较于平板培养法和生理生化测试，其优势主要体现在检测灵敏度和速度等方面。例如，Sheu等[52]利用PCR技术成功鉴定出益生菌产品中的双歧杆菌属菌株，且仅需数小时即可完成，极大缩短了检测时间。但是该技术也具有明显不足：一方面，PCR技术依赖特异序列设计的引物来识别目的基因，这使其难以精准识别基因库中未录入序列的菌株，以及部分基因序列高度相似的近缘物种（如乳酪杆菌属组，该组以干酪乳酪杆菌为核心，还包含与其基因序列高度相似的同属近缘菌株），导致引物和分子探针的设计难度增加。因此，需结合高质量基因组序列与先进生物信息学工具才能突破这一限制。另一方面，PCR检测十分灵敏，即使是微量污染的DNA也会导致检测结果假阳性，如此高的灵敏度对检测操作流程提出了严格要求，操作复杂度随之提升，进而增加了时间和成本。这一点在Kwon等[53]利用PCR检测乳酸杆菌以及上述双歧杆菌鉴定试验中均有体现。

尽管PCR检测技术在益生菌群落组成鉴定中已得到广泛应用，但其对目标序列的依赖以及通量限制等问题，导致该技术无法满足多菌株复配益生菌产品中全面解析群落组成的需求。这些技术瓶颈推动学术界开始探索更具针对性的分子生物学检测技术。

4.2 qPCR技术

qPCR技术的核心原理是在PCR的基础上引入荧光信号实时检测扩增过程，实现对目标菌株特异性核酸片段的定性与定量分析，精准确定目标益生菌的含量。目前qPCR已成为核酸与微生物定量的金标准，对保障产品的质量与功效具有重要意义[54]。在检测性能上，qPCR的检测限通常较低，可达到10^3 CFU/mL甚至更低。例如，在针对嗜酸乳杆菌的检测中，通过设计特异性引物构建的qPCR检测体系已达到这一灵敏度[55]。同时，qPCR的检测效率显著优于基于培养的方法（提升10~100倍），见表2。不过与PCR类似，该方法存在明显局限：一方面无法区分死细胞与活细胞；另一方面高度依赖目标菌株的DNA或RNA序列，由于并非所有微生物的核酸序列都是已知的，因此会限制其对未知菌株或序列信息不足的微生物的检测能力，还可能因序列信息缺失导致漏检[41]。

表2 qPCR针对特定益生菌的检测效率与检测限的结构化信息表

Table 2 Structured information table for detection efficiency and limit of detection of qPCR for specific probiotic strains

菌株名称	靶基因	样本类型	检测限	检测效率
植物乳植杆菌P-8	*16S rRNA*	发酵乳	1×10^3 CFU/mL[56]（活菌）	90%~110%
嗜酸乳杆菌	*SPIDR*	发酵乳	1×10^3 CFU/mL[55]	90%~105%
鼠李糖乳酪杆菌GG	*Lc-Nu*	发酵乳	1×10^2~1×10^3 CFU/mL[57]	90%~110%
动物双歧杆菌	*K1717_01615*	纯培养物	1×10^4 CFU/mL[58]（菌液）	88%~102%

针对上述问题，可在qPCR检测前用叠氮化丙锭（PI）或叠氮化乙锭（EB）等染料对样本进行预处理，这类染料可穿透死细胞膜并与DNA结合，抑制死菌核酸的扩增，从而保证仅能检测到活菌核酸，使检测结果更接近产品的有效活菌量；同时，通过设计双重特异性引物进行验证，减少对单一序列的依赖，降低菌株漏检的风险，使qPCR检测技术在益生菌检测中发挥更重要的作用。

4.3 高通量测序技术

在益生菌群落组成解析中，PCR、qPCR等分子生物学技术虽提升了检测效率，但受限于靶标序列设计，仍难以全面鉴定复杂群落的多样性，而高通量测序技术的出现为微生物群落组成研究提供了革命性的技术支持[59-60]。该技术通过大规模同步测序，一次性获取样本中所有微生物的核酸序列信息，再结合生物信息学分析，实现对益生菌群落的物种组成、丰度及多样性（α多样性、β多样性）的全面解析。

目前，基于高通量测序的微生物组成分析方法主要有2类，即16S rRNA基因测序和宏基因组测序。其中，16S rRNA基因测序可在属水平快速

鉴定群落组成，但在种或菌株水平，由于其基因序列的保守性较高，难以实现精准区分；而宏基因组测序则直接对样本中总DNA进行测序，实现菌株水平的鉴定[61]。Lugli等[61]通过16S rRNA基因测序技术初步确定益生菌补充剂的组成，再结合宏基因组鸟枪法测序技术解析菌株基因组序列，最终发现产品实际菌株与生产商宣传不符。

高通量测序技术的优势主要体现在检测准确性高、灵敏度高、测序通量大3个方面，且不依赖培养过程，这一优势在益生菌鉴定中得到了充分体现。Shehata等[62]研究证实，高通量测序不仅能够有效检测产品中嗜酸乳杆菌、动物双歧杆菌乳亚种（*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*）、副干酪乳酪杆菌（*Lacticaseibacillus paracasei*）等10种目标菌株的存在情况，还能排查变形杆菌属（*Proteus*），如奇异变形菌（*Proteus mirabilis*）、粘液变形菌（*Proteus myxofaciens*）等未声明物种，同时还可以对多个样本展开评估，为益生菌产品质量把控与标签准确性评估提供了有力手段。然而高通量测序也存在一定局限性，如二代测序读长较短（一般为50~300 bp），对结构复杂、高度重复序列测序难度较大；三代测序虽读长较长，但主要针对全基因组测序，检测成本较高。

因此，益生菌检测无需依赖单一技术。多数益生菌企业的常规质控（如验证产品是否有宣传的核心菌株、有无未声明杂菌等）无需采用昂贵的三代全基因组测序技术，只需针对益生菌的特征基因片段（如*16S rRNA*基因V4—V5高变区、乳杆菌*pola*基因等）设计靶向检测方案，再结合二代测序的高通量优势，既能降低检测成本，又能通过多种基因片段交叉验证来弥补其读长较短的缺陷，满足菌株属甚至种水平的鉴定需求。

4.4 基于CRISPR-Cas12a系统的微生物群落检测新方法

在益生菌群落组成检测领域，基于培养的方法存在周期长、无法检出难培养微生物等问题。尽管FCM、PCR、qPCR、高通量测序等方法弥补了平板计数法在检测精度方面的不足，但仍面临设备成本高昂（如单细胞测序仪售价超百万元）、数据分析复杂度高、部分技术环节（如荧光标记的特异性）尚待优化等问题[63-66]。理想的检测平台应具备以下条件：正确、高效地扩增多个核酸靶标；在适宜温度下进行扩增与鉴定；不受任何因素干扰，精确识别靶标；准确区分信号并将其与每个独立靶标相关联[67-69]。

CRISPR-Cas12a技术的出现为解决上述问题提供了新方向。该技术的核心原理是依托细菌自身的CRISPR免疫防御系统，通过向导RNA（gRNA）引导Cas12a蛋白精准识别目标菌株的特异性核酸序列，识别结合后，Cas12a蛋白被激活，既切割目标核酸，又启动非特异性反式切割活性，切割体系中预先加入的荧光报告分子（荧光基团与猝灭基团）并产生荧光信号，通过检测荧光信号可判断目标菌株是否存在，实现精准检测。近年来，大量研究围绕不同生物中的CRISPR-Cas系统展开。但目前CRISPR-Cas技术在原核生物（尤其是与食品微生物和人类健康相关的重要物种）中应用的巨大潜力尚未被完全挖掘[70]。有研究者通过将微流控装置、CRISPR-Cas12a及重组酶聚合酶扩增技术相结合，开发出一种高效多重核酸检测技术，见图2[71]。CRISPR-Cas12a技术基于微流控空间编码技术，仅需单一荧光探针即可实现对30种核酸靶标的同步高效检测，且多重检测仅需40 min，不仅大幅缩短了检测时间，还显著降低了成本[72]。有研究者通过高效检测9价HPV疫苗对应的9种HPV亚型，验证了CRISPR-Cas12a技术的实用性，同时成功检测出8种临床常见的呼吸道病毒，进一步体现了其应用价值。

尽管CRISPR-Cas12a系统在益生菌群落组成鉴定中的运用尚未成熟，但其在菌株精准区分领域已展现出独特价值。Nami等[25]采用CRISPR-Cas系统对800株约翰逊乳杆菌菌株的基因组进行鉴定，并分析了CRISPR-Cas间隔体的进化路径，结果表明CRISPR-Cas系统间隔序列的多态性可作为“分子指纹”用于区分近缘菌株，尤其是II-A亚型菌株的间隔序列模式差异显著，能够追溯产品中菌株的来源，并评估不同生产批次间菌株的遗传稳定性。因此，明确不同菌株CRISPR-Cas系统的差异，可设计特异性检测方法，为益生菌产品的质量控制提供参考。

在益生菌质控中采用单一技术往往难以同时满足全面解析群落组成、精准区分活菌与死菌、保障计数准确性等核心需求，而不同类型技术的结合具备“协同检测”的优势，这也为CRISPR-Cas12a系

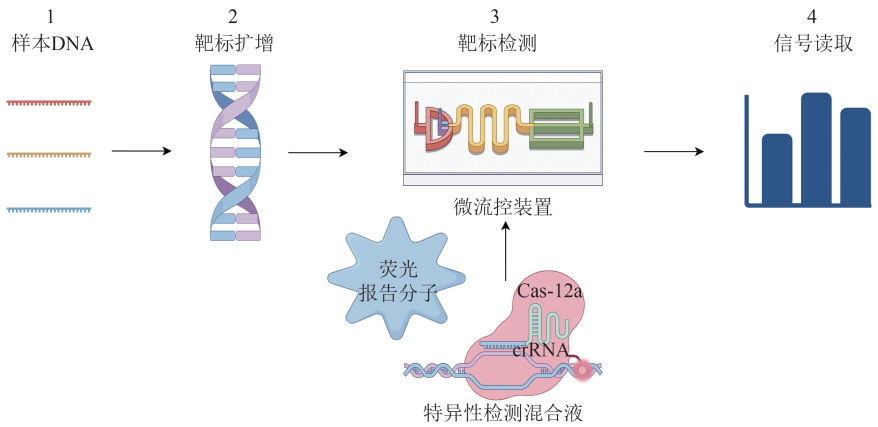


图2　基于微流控平台的CRISPR-Cas12a与重组酶聚合酶扩增技术联用的原理示意图

Fig. 2　Schematic diagram of the principle of CRISPR-Cas12a combined with recombinase polymerase amplification based on microfluidic platform

统未来的应用提供了可靠的技术参考。采用FCM检测复合益生菌时，针对高比例死菌导致的染色信号重叠问题，Tracey等[45]结合平板计数法校准结果，将活菌回收率从111.56%修正至95.00%，显著提升计数准确性。在益生菌产品质控中，Shehata等[62]先通过高通量测序全面解析群落组成，排查出未声明杂菌，再用基于培养的方法中的选择性培养基分离技术对测序发现的目标菌株进行活菌验证，既弥补了高通量测序“无法区分活菌与死菌”的短板，又解决了基于培养的方法“漏检不可培养菌”的问题。这些结果均表明，单细胞分析技术、分子生物学技术的高效、灵敏特性与基于培养的方法的精准、稳定、低成本特性形成互补，见表3。

表3　益生菌产品菌群组成鉴别中不同技术的核心指标对比

Table 3　Comparison of core indicators of different technologies for identifying microbial community composition in probiotic products

技术类别	技术名称	原理	分析内容	优缺点
基于培养的方法	平板培养法（含生理生化测试）	人工模拟生长环境，使微生物在特定培养基上形成可见菌落或发生生化反应，结合生理代谢特性鉴别	活菌计数、初步区分属/种水平	优点：操作简便、成本低 缺点：周期长（72 h至数周）、漏检不可培养菌、精度低
单细胞分析技术	FCM	荧光染色后经激光检测，通过散射光/荧光信号分析单细胞特性	活菌计数、细胞代谢活力	优点：速度快（1~2 h）、可检VBNC菌、具有单细胞分辨率 缺点：成本高、高估活菌数、难辨属/种
分子生物学技术	PCR	体外模拟DNA复制，特异性引物扩增目标核酸片段	菌株定性	优点：速度较快（数小时）、可检部分难培养菌 缺点：仅能定性、无法区分活死菌、难以精准识别近缘菌
	qPCR	PCR基础上引入荧光信号，实时监测扩增情况，实现定性、定量分析	菌株定量、相对丰度	优点：速度快（2~4 h）、灵敏度高（部分可达10^2 CFU/mL）、可定量 缺点：无法直接区分活死菌、漏检未知菌、荧光试剂成本较高
	高通量测序	大规模同步测序、生物信息学分析，获取所有微生物核酸序列	α多样性、β多样性、相对丰度、属/种水平鉴定	优点：无需培养、准确度高、灵敏度高、通量大 缺点：周期较长（1~3 d）、二代读长短、三代成本高
	CRISPR-Cas12a	Cas12a-gRNA靶向识别目标核酸，激活反式切割，荧光报告检测	多重靶标同步检测、菌株特异性鉴别	优点：速度极快（40 min~2 h）、灵敏度极高[71]、设备成本低 缺点：尚未形成标准化检测流程，需进一步开发

注：1. α多样性指样本内的物种多样性，β多样性指样本间的群落差异；2. 成本水平分级依据中，“低”指仅需实验室常规设备（如培养箱、移液器），“较高”指需专用试剂或小型仪器（如PCR仪、荧光染料），“高”指需大型专用设备或数据分析服务（如高通量测序仪、流式细胞仪）。

未来随着CRISPR-Cas12a技术标准化流程的构建，若能借鉴上述不同类型技术结合的思路，将其与PCR等核酸检测技术结合，有望进一步突破检测瓶颈，成为益生菌鉴定领域的核心技术之一，为复杂益生菌产品的群落鉴定提供更可靠的技术支撑。

5 展望

益生菌产品的功效具有严格菌株特异性，这意味着精准掌握其菌株组成是保障产品功效的核心。因此，深入研究菌株组成鉴别技术对解决益生菌产业实际问题具有重要的现实意义。目前，益生菌检测以基于培养的方法以及部分成熟的单细胞分析技术、分子生物学技术为主。基于培养的方法因操作简便、成本较低，是基层检测的常用手段，但存在周期长、精度有限等不足。FCM、高通量测序等技术虽已用于复杂微生物群落解析与活菌快速计数，但在成本控制、排除复杂样本干扰方面仍需不断研究与优化。因此，急需探索准确、高效且经济的检测方法。以CRISPR-Cas12a为代表的前沿技术，凭借独特的核酸靶向识别能力和多重检测潜力，已受到该领域研究者的广泛关注，但目前尚未形成标准化检测流程。

未来，需要在优化现有技术的基础上，推动不同类型技术的结合，既保留基于培养的方法在基础检测中的稳定性与低成本优势，又借助单细胞分析技术、分子生物学技术的高灵敏度、高通量等特性突破检测瓶颈，为益生菌行业的发展提供可靠的技术支持。

参考文献

[1] Crane J，Barthow C，Kang J，et al. Probiotics for humans：hoax，hype，hope，or help[J]. Journal of the Royal Society of New Zealand，2020，50(3)：456-469.

[2] Singh D，Singh A，Kumar S. Probiotics：friend or foe to the human immune system[J]. Bulletin of the National Research Centre，2023，47(1)：126.

[3] Afrin S，Akter S，Begum S，et al. The prospects of *Lactobacillus oris* as a potential probiotic with cholesterol-reducing property from mother's milk[J]. Frontiers in Nutrition，2021，8：619506.

[4] Frakolaki G，Katsouli M，Giannou V，et al. Novel encapsulation approach for *Bifidobacterium* subsp. *lactis* (BB-12) viability enhancement through its incorporation into a double emulsion prior to the extrusion process[J]. LWT-Food Science and Technology，2020，130：109671.

[5] Yao M F，Xie J J，Du H J，et al. Progress in microencapsulation of probiotics：a review [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety，2020，19(2)：857-874.

[6] Cristofori F，Dargenio V N，Dargenio C，et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation：a door to the body[J]. Frontiers in Immunology，2021，12：578386.

[7] Wang Y B，Xie Q H，Zhang Y，et al. Combination of probiotics with different functions alleviate DSS-induced colitis by regulating intestinal microbiota，IL-10，and barrier function [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2020，104(1)：335-349.

[8] Liu Q，Yu Z M，Tian F W，et al. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier [J]. Microbial Cell Factories，2020，19(1)：23.

[9] Lew L C，Hor Y Y，Yusoff N A A，et al. Probiotic *Lactobacillus plantarum* P8 alleviated stress and anxiety while enhancing memory and cognition in stressed adults：a randomised，double-blind，placebo-controlled study [J]. Clinical Nutrition，2019，38(5)：2053-2064.

[10] Gomes A C，Hoffmann C，Mota J F. Gut microbiota is associated with adiposity markers and probiotics may impact specific Genera [J]. European Journal of Nutrition，2020，59(4)：1751-1762.

[11] Zhu H，Cao C J，Wu Z C，et al. The probiotic *L. casei* Zhang slows the progression of acute and chronic kidney disease[J]. Cell Metabolism，2021，33(10)：2091-2093.

[12] Han C J，Song S Z，Cui C C，et al. Strain-specific benefits of *Bacillus* probiotics in hybrid grouper：growth enhancement，metabolic health，immune modulation，and *Vibrio harveyi* resistance[J]. Animals，2024，14(7)：1062.

[13] Aponte M，Murru N，Shoukat M. Therapeutic，prophylactic，and functional use of probiotics：a current perspective [J]. Frontiers in Microbiology，2020，11：562048.

[14] da Silva T M，Sonza P V，Ramires F S V，et al. Viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* by complex coacervation associated with enzymatic crosslinking under application in different fruit juices[J]. Food Research International，2021，141：110190.

[15] Shori A B. Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit[J]. HAYATI Journal of Biosciences，2017，24(1)：1-5.

[16] Mano M C R，Neri-Numa I A，da Silva J B，et al. Oligosaccharide biotechnology：an approach of prebiotic revolution on the industry[J]. Applied Microbiology and

Biotechnology，2018，102(1)：17-37.

[17] Drago L，Rodighiero V，Celeste T，et al. Microbiological evaluation of commercial probiotic products available in the USA in 2009[J]. Journal of Chemotherapy，2010，22(6)：373-377.

[18] Toscano M，de Vecchi E，Rodighiero V，et al. Microbiological and genetic identification of some probiotics proposed for medical use in 2011[J]. Journal of Chemotherapy，2013，25(3)：156-161.

[19] Chen T T，Wu Q L，Li S J，et al. Microbiological quality and characteristics of probiotic products in China[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture，2014，94(1)：131-138.

[20] Warzée J P，Elli M，Fall A，et al. Supranational assessment of the quality of probiotics：collaborative initiative between independent accredited testing laboratories[J]. Microorganisms，2021，9(7)：1456.

[21] Mudroňová D. Flow cytometry as an auxiliary tool for the selection of probiotic bacteria[J]. Beneficial Microbes，2015，6(5)：727-734.

[22] Chiron C，Tompkins T A，Burguière P. Flow cytometry：a versatile technology for specific quantification and viability assessment of micro-organisms in multistrain probiotic products[J]. Journal of Applied Microbiology，2018，124(2)：572-584.

[23] Morovic W，Hibberd A A，Zabel B，et al. Genotyping by PCR and high-throughput sequencing of commercial probiotic products reveals composition biases[J]. Frontiers in Microbiology，2016，7：1747.

[24] Patro J N，Ramachandran P，Barnaba T，et al. Culture-independent metagenomic surveillance of commercially available probiotics with high-throughput next-generation sequencing[J]. mSphere，2016，1(2)：e00057-e00016.

[25] Nami Y，Rostampour M，Panahi B. CRISPR-Cas systems and diversity of targeting phages in *Lactobacillus johnsonii* strains：insights from genome mining approach[J]. Infection，Genetics and Evolution，2023，114：105500.

[26] Ali N R M M，Amjad S，Ashraf S，et al. Extraction of polyphenols from apple and pomegranate peels employing different extraction techniques for the development of functional date bars[J]. International Journal of Fruit Science，2020，20(3)：S1201-S1221.

[27] Ranjha M M A N，Irfan S，Lorenzo J M，et al. Sonication，a potential technique for extraction of phytoconstituents：a systematic review[J]. Processes，2021，9(8)：1406.

[28] Nadeem H R，Akhtar S，Ismail T，et al. Heterocyclic aromatic amines in meat：formation，isolation，risk assessment，and inhibitory effect of plant extracts[J]. Foods，2021，10(7)：1466.

[29] Ali N R M M，Irfan S，Nadeem M，et al. A comprehensive review on nutritional value，medicinal uses，and processing of banana[J]. Food Reviews International，2022，38(2)：199-225.

[30] Zhang J B，Ren X L，Wang S，et al. Microbial interventions in yak colibacillosis：*Lactobacillus*-mediated regulation of intestinal barrier[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology，2024，14：1337439.

[31] Touré R，Kheadr E，Lacroix C，et al. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Applied Microbiology，2003，95(5)：1058-1069.

[32] Penaloza-Vazquez A，Ma L M，Rayas-Duarte P. Isolation and characterization of *Bacillus* spp. strains as potential probiotics for poultry[J]. Canadian Journal of Microbiology，2019，65(10)：762-774.

[33] Sun S Y，Xu X X，Liang L，et al. Lactic acid-producing probiotic *Saccharomyces cerevisiae* attenuates ulcerative colitis *via* suppressing macrophage pyroptosis and modulating gut microbiota[J]. Frontiers in Immunology，2021，12：777665.

[34] 徐松滨，李威娜. 酸奶中保加利亚乳杆菌的分离和鉴定[J]. 中国乳品工业，2003，31(3)：16-18.
Xu S B，Li W N. The isolation and identification of *L. bulgaricus*[J]. China Dairy Industry，2003，31(3)：16-18.(in Chinese)

[35] 赵婷，韩辉，刘波，等. 发酵乳中动物双歧杆菌乳亚种分离及鉴定[J]. 微生物学通报，2010，37(3)：407-412.
Zhao T，Han H，Liu B，et al. Isolation and identification of *Bifidobacterium animails* subsp. *lactis* in fermented milk products[J]. Microbiology China，2010，37(3)：407-412.(in Chinese)

[36] Alvarez-Olmos M I，Barousse M M，Rajan L，et al. Vaginal lactobacilli in adolescents：presence and relationship to local and systemic immunity，and to bacterial vaginosis[J]. Sexually Transmitted Diseases，2004，31(7)：393-400.

[37] Lee N K，Yun C W，Kim S W，et al. Screening of lactobacilli derived from chicken feces and partial characterization of *Lactobacillus acidophilus* A12 as an animal probiotics[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology，2008，18(2)：338-342.

[38] Brolazo E M，Leite D S，Tiba M R，et al. Correlation between api 50 ch and multiplex polymerase chain reaction for the identification of vaginal lactobacilli in isolates[J]. Publication of the Brazilian Society for

Microbiology，2011，42（1）：225-232.

[39] Boyd M A，Antonio M A，Hillier S L. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species[J]. Journal of Clinical Microbiology，2005，43（10）：5309-5311.

[40] Nagy E，Petterson M，Mårdh P A. Antibiosis between bacteria isolated from the vagina of women with and without signs of bacterial vaginosis[J]. APMIS，1991，99（8）：739-744.

[41] Boyte M E，Benkowski A，Pane M，et al. Probiotic and postbiotic analytical methods：a perspective of available enumeration techniques[J]. Frontiers in Microbiology，2023，14：1304621.

[42] Sibanda T，Marole T A，Thomashoff U L，et al. *Bifidobacterium* species viability in dairy-based probiotic foods：challenges and innovative approaches for accurate viability determination and monitoring of probiotic functionality[J]. Frontiers in Microbiology，2024，15：1327010.

[43] 周立光，杨明喆，冯会粉，等. 复合益生菌产品菌种鉴定及活菌定量检测方法[J]. 食品与发酵工业，2022，48（9）：235-244.
Zhou L G，Yang M Z，Feng H F，et al. Study on methods of species identification and quantitative detection of viable cells in composite probiotics products[J]. Food and Fermentation Industries，2022，48（9）：235-244.（in Chinese）

[44] Wendel U. Assessing viability and stress tolerance of probiotics-a review[J]. Frontiers in Microbiology，2021，12：818468.

[45] Tracey H，Coates N，Hulme E，et al. Insights into the enumeration of mixtures of probiotic bacteria by flow cytometry[J]. BMC Microbiology，2023，23（1）：48.

[46] Robinson J P. Flow cytometry：past and future[J]. BioTechniques，2022，72（4）：159-169.

[47] Robinson J P. Overview of flow cytometry and microbiology[J]. Current Protocols in Cytometry，2018，84：e37.

[48] Visciglia A，Allesina S，Amoruso A，et al. Assessment of shelf-life and metabolic viability of a multi-strain synbiotic using standard and innovative enumeration technologies[J]. Frontiers in Microbiology，2022，13：989563.

[49] Saarela M. Methods to improve the viability and stability of probiotics[M]. Amsterdam：Elsevier，2007：391-403.

[50] Ou F，McGoverin C，Swift S，et al. Absolute bacterial cell enumeration using flow cytometry[J]. Journal of Applied Microbiology，2017，123（2）：464-477.

[51] Pane M，Allesina S，Amoruso A，et al. Flow cytometry：evolution of microbiological methods for probiotics enumeration[J]. Journal of Clinical Gastroenterology，2018，52（Suppl 1）：S41-S45.

[52] Sheu S J，Hwang W Z，Chiang Y C，et al. Use of *Tuf* gene-based primers for the PCR detection of probiotic *Bifidobacterium* species and enumeration of bifidobacteria in fermented milk by cultural and quantitative real-time PCR methods[J]. Journal of Food Science，2010，75（8）：M521-M527.

[53] Kwon H S，Yang E H，Yeon S W，et al. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA[J]. FEMS Microbiology Letters，2004，239（2）：267-275.

[54] Hou Y B，Zhang H，Miranda L，et al. Serious overestimation in quantitative PCR by circular（supercoiled）plasmid standard：microalgal pcna as the model gene[J]. PLoS One，2010，5（3）：e9545.

[55] 张娜娜，刘洋，俞漪，等. 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 N N，Liu Y，Yu Y，et al. Real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic beverages[J]. Food Science，2019，40（8）：27-32.（in Chinese）

[56] 韩之皓，郭帅，黄天，等. 叠氮溴化丙锭结合实时荧光定量PCR技术检测发酵乳中植物乳杆菌P-8活菌数[J]. 食品与发酵工业，2019，45（1）：183-189.
Han Z H，Guo S，Huang T，et al. Detection of viable *Lactobacillus plantarum* P-8 in fermented milk using propidium monoazide combined with real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Food and Fermentation Industries，2019，45（1）：183-189.（in Chinese）

[57] Shehata H R，Newmaster S G. A validated real-time PCR method for the specific identification of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG（ATCC 53103）[J]. Journal of AOAC International，2020，103（6）：1604-1609.

[58] 赵磊，张栋，刘洋. 动物双歧杆菌乳亚种i797菌株特异性量化分析方法研究[J]. 中国乳品工业，2024，52（5）：51-58.
Zhao L，Zhang D，Liu Y. Real-time PCR assays for the strain-specific detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* i797[J]. China Dairy Industry，2024，52（5）：51-58.（in Chinese）

[59] 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 G P. Application of high-throughput sequencing technology in food microbial detection[J]. China Food Safety Magazine，2022（30）：182-185.（in Chinese）

[60] 陆惠芳. 食品微生物研究领域中高通量测序技术的应用研究[J]. 食品安全导刊，2022(36)：157-160.
Lu H F. Research on the application of high-throughput sequencing technology in the field of food microbiology research[J]. China Food Safety Magazine，2022(36)：157-160.(in Chinese)

[61] Lugli G A，Mangifesta M，Mancabelli L，et al. Compositional assessment of bacterial communities in probiotic supplements by means of metagenomic techniques[J]. International Journal of Food Microbiology，2019，294：1-9.

[62] Shehata H R，Newmaster S G. The power of DNA based methods in probiotic authentication [J]. Frontiers in Microbiology，2023，14：1158440.

[63] Davis C. Enumeration of probiotic strains：review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods，2014，103：9-17.

[64] Wilkinson M G. Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products：a review[J]. Trends in Food Science & Technology，2018，78：1-10.

[65] Martinon A，Cronin U P，Quealy J，et al. Swab sample preparation and viable real-time PCR methodologies for the recovery of *Escherichia coli*，*Staphylococcus aureus* or *Listeria monocytogenes* from artificially contaminated food processing surfaces[J]. Food Control，2012，24(1/2)：86-94.

[66] Zand E，Froehling A，Schoenher C，et al. Potential of flow cytometric approaches for rapid microbial detection and characterization in the food industry：review[J]. Foods，2021，10(12)：3112.

[67] Li Y，Li S Y，Wang J，et al. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing [J]. Trends in Biotechnology，2019，37(7)：730-743.

[68] Puig H，Lee R A，Najjar D，et al. Minimally instrumented SHERLOCK (miSHERLOCK) for CRISPR-based point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 and emerging variants [J]. Science Advances，2021，7(32)：eabh2944.

[69] Wang B B，Xu W H，Yang H. Structural basis of a Tn7-like transposase recruitment and DNA loading to CRISPR-Cas surveillance complex[J]. Cell Research，2020，30(2)：185-187.

[70] Hidalgo-Cantabrana C，Goh Y J，Pan M C，et al. Genome editing using the endogenous type I CRISPR-Cas system in *Lactobacillus crispatus* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2019，116(32)：15774-15783.

[71] Xu Z C，Chen D J，Li T，et al. Microfluidic space coding for multiplexed nucleic acid detection *via* CRISPR-Cas12a and recombinase polymerase amplification[J]. Nature Communications，2022，13：6480.

[72] Liu H，Hu X W，Zeng H J，et al. A rapid and high-throughput system for the detection of transgenic products based on LAMP-CRISPR-Cas12a[J]. Current Research in Food Science，2023，7：100605.