

研究报告

塔什库尔干地区传统手工乳制品中乳酸菌多样性及其功能分析

麦日艳古·亚生^{1,2}, 李明源¹, 王继莲¹, 刘润忠¹, 努尔古丽·热合曼^{*2}

1 喀什大学生命与地理科学学院 新疆帕米尔高原生物资源与生态重点实验室, 新疆 喀什 844006

2 新疆师范大学生命科学学院 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830054

麦日艳古·亚生, 李明源, 王继莲, 刘润忠, 努尔古丽·热合曼. 塔什库尔干地区传统手工乳制品中乳酸菌多样性及其功能分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 950-969.

Mairiyangu·Yasheng, LI Mingyuan, WANG Jilian, LIU Runzhong, Nurgul·Rahman. Diversity and functions of lactic acid bacteria in traditional handmade dairy products in Tashkurgan region[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 950-969.

摘要: 【背景】传统手工制作乳制品是塔吉克族农牧地区人们最喜爱的食品, 蕴含着十分丰富的乳酸菌资源, 亟待开发利用。【目的】通过解析塔吉克族农牧地区传统自制乳制品中乳酸菌的多样性和功能特性, 为挖掘和保护其中的微生物资源提供保障, 同时为评估传统奶酪的安全性提供理论基础。【方法】采用高通量测序技术对自制乳制品中细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区进行测序分析, 利用传统培养法从 MRS、Lee 氏和 M17 培养基中筛选出可培养疑似乳酸菌, 经生理生化试验及 16S rRNA 基因序列同源性分析技术对其进行属种鉴定, 解析塔县地区传统乳制品中微生物的种类及其基因功能信息。【结果】四份乳制品中共鉴定出 37 个细菌属 65 个细菌种, 其中奶酪和酸奶中的优势细菌属为 *Lactobacillus* 和 *Streptococcus*, 优势乳酸菌种为瑞士乳杆菌, 并且奶酪中含少许致病菌。在此基础上, 利用传统培养法从 MRS、M17 和 Lee 氏培养基筛选出 38 株可培养疑似乳酸菌, 经生理生化试验及 16S rRNA 基因序列同源性分析技术对其进行属种鉴定。38 株疑似乳酸菌分别为 3 株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、1 株芽孢杆菌(*Bacillus luti*)、1 株副炭疽杆菌(*Bacillus paranthracis*)、9 株副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、3 株霍氏肠球菌(*Enterococcus hormeachei*)、1 株溶血性葡萄球菌(*Staphylococcus heamoliticus*)、1 株肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、10 株假肠膜明串珠菌(*Leuconostoc pseudomesenteroides*)、2 株肠系膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、4 株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、1 株塞内加尔醋杆菌(*Acetobacter senegalensis*)、1 株乳肠球菌(*Enterococcus durans*)和 1 株粪肠杆菌(*Enterobacter faecalis*)。其中明串珠菌属(*Leuconostoc*)为优势菌属, 其次为乳杆菌属(*Lactobacillus*), 归类为 7 个属 13 个种。在乳酸菌的属种鉴定上, 传统培

资助项目: 新疆维吾尔自治区帕米尔高原生物资源与生态重点实验室开放课题项目(XJDX1714-2021-04); 喀什大学校级科研项目([2022]2764)

This work was supported by the Open Project of the Key Laboratory of Biological Resources and Ecology in the Pamir Plateau of Xinjiang Uygur Autonomous Region (XJDX1714-2021-04) and the Kahi University Campus level Research Projects ([2022]2764).

*Corresponding author. E-mail: nurgulum@163.com

Received: 2023-06-06; Accepted: 2023-09-26; Published online: 2023-12-12

养法能够更准确地将乳酸菌鉴定到种水平。从 38 株乳酸菌中选取代表性的 11 株菌进行抑菌特性试验, 11 株菌对大肠杆菌(*Escherichia coli*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)均有抑制作用。奶酪微生物基因(clusters of orthologous groups of proteins COG)功能预测结果显示, 奶酪中的微生物富含与氨基酸转运和代谢有关的基因。将各个样品的微生物群落组成与功能组成进行比较, 发现各个样品的细菌群落组成虽存在明显差异, 但其功能组成却具有高度相似性。【结论】以新疆塔县 4 个传统手工乳品为研究对象, 采用现代分子生物学技术和常规培养技术对 4 种传统手工乳品进行菌种鉴定, 发现其菌种组成、多样性均不高, 并且有部分致病菌。这 2 种方法相结合能够更全面地了解奶酪中的微生物菌群结构, 为实现乳品的工业生产奠定理论基础, 并保护了塔吉克牧民地区微生物中丰富的资源。同时为评估乳酸菌安全性提供了理论基础。

关键词: 奶酪; 微生物群落; 传统培养; 丰富度; 功能预测

Diversity and functions of lactic acid bacteria in traditional handmade dairy products in Tashkurgan region

Mairiyangu·Yasheng^{1,2}, LI Mingyuan¹, WANG Jilian¹, LIU Runzhong¹, Nurgul·Rahman^{*2}

1 Key Laboratory of Biological Resources and Ecology of Pamir Plateau in Xinjiang, The College of Life and Geographic Sciences, Kashi University, Kashi 844006, Xinjiang, China

2 Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Traditional handmade dairy products are the favorite food in Tajik agricultural and pastoral areas. They contain abundant lactic acid bacterial resources which need to be exploited and utilized. [Objective] By analyzing the diversity and functions of lactic acid bacteria in traditional homemade dairy products from Tajik agricultural and pastoral areas, we aim to aid in the exploration and protection of microbial resources and provide a theoretical basis for evaluating the safety of traditional dairy products. [Methods] The V3–V4 variable region of bacterial 16S rRNA gene was subjected to high-throughput sequencing. The culturable suspected lactic acid bacteria were screened by the conventional culture methods in the MRS, Lee's, and M17 media and identified by physiological and biochemical tests and 16S rRNA gene sequence homology. Furthermore, the microbial species and gene function information in the dairy products in Tajik autonomous county of Taxkorgan were analyzed. [Results] There were 37 bacterial genera and 65 bacterial species in the 4 dairy samples, among which *Lactobacillus* and *Streptococcus* were the dominant bacterial genera in cheese and yogurt, and *Lactobacillus helveticus* was the dominant species. A small amount of pathogenic bacteria existed in the cheese samples. Moreover, 38 culturable suspected lactic acid bacterial strains were identified from MRS, M17, and Lee's media, including 3 strains of *Bacillus subtilis*, 1 strain of *B. luti*, 1 strain of *B. paranthracis*, 9 strains of *Lactobacillus paracasei*, 3 strains of *Enterococcus hormeachei*, 1 strain of *Staphylococcus heamolyticus*, 1 strain of *Klebsiella pneumoniae*, 10 strains of *Leuconostoc pseudomesenteroides*, 2 strains of *Leuconostoc mesenteroides*, 4 strains of

Lactobacillus plantarum, 1 strain of *Acetobacter senegalensis*, 1 strain of *Enterococcus durans*, and 1 strain of *Enterobacter faecalis*. Among them, the dominant genus was *Leuconostoc*, followed by *Lactobacillus*. The 38 strains were classified into 7 genera and 13 species. The results indicated that the conventional culture method can accurately identify lactic acid bacteria to the species level. Representative 11 strains of lactic acid bacteria were selected from 38 strains for antibacterial tests, and all 11 the strains had inhibitory effects on *Escherichia coli* and *B. subtilis*. The COG (clusters of orthologous groups of proteins) function prediction showed that the microorganisms in cheese carried rich genes involved in amino acid transport and metabolism. Although there were significant differences in the bacterial community composition between samples, their functions were highly similar. **[Conclusion]** The diversity of lactic acid bacteria in four traditional handmade dairy products in Tajik autonomous county of Taxkorgan, Xinjiang was studied by combining the molecular biological methods and the conventional culture method. The richness and diversity of lactic acid bacteria in the dairy products were low, and there were some pathogenic bacteria. The combination of the two methods in this study comprehensively revealed the microbial composition in the dairy products. The findings provided basic data for the industrial production and protection of the abundant microbial resources in this area and laid a foundation for evaluating the safety of lactic acid bacteria in traditional dairy products.

Keywords: cheese; microbial community; conventional culture method; richness; functional prediction

我国地域辽阔, 是一个统一的多民族国家, 其饮食文化中蕴藏着丰富的民族风味, 发酵乳制品作为这类食品的典型代表, 其主要由微生物自然发酵各种动物乳而得到, 产品的主要发酵产物为乳酸^[1]。我国部分地区居民早在 2 000 多年前就有制作和食用发酵乳制品的习俗, 加之气候环境、地理因素及制作工艺的差异, 使得传统发酵乳制品中蕴藏的微生物多样性极为丰富^[2-3]。位于我国西北边疆的塔什库尔干塔吉克自治县有着独特的地理位置、突出的资源优势、悠久的历史和文化底蕴, 具有独特的生态优势。这里的平均海拔 4 000 m, 地貌复杂, 属于特有的青藏高原气候, 紫外线强烈, 温度低(年均温度小于 5 °C), 日间温度变化大(最近 10 年最大日间温度变化可达 22 °C), 氧气缺乏(年均氧气浓度只有平原的 50%), 蕴含着丰富的微生物资源。

现在世界上有很多种可供选择的乳制品, 如奶牛、水牛、山羊、绵羊和骆驼等的乳制品。根

据联合国粮食和农业组织的数据, 2022 年, 世界乳制品产量为 9.3 亿 t, 较 2021 年增加 0.6%, 其中, 牛奶乳在乳制品总量中所占比例为 82.55%, 水牛乳占 13.90%、山羊乳占 1.91%、绵羊乳占 1.30%、骆驼乳占 0.34%^[4]。牛奶以外的其他奶统称为特奶, 既有特殊的保健作用, 又有调节免疫系统、改善矿物质吸收的作用, 所以深受顾客喜爱, 具有良好的发展潜力。

奶酪具有很高的营养价值, 但是在我国, 奶酪和黄油等高增值乳制品的消费量很小^[5-6], 这与奶酪的口感质量不佳有关^[7]。大量研究表明奶酪中存在着 3 种不同的菌群: 乳杆菌^[8-10]、酵母^[11]和霉菌^[12-13], 而乳酸菌是提高乳制品风味的关键。已有研究发现, 酸奶中的乳酸菌在初始阶段会生成一种能够加速乳酪凝固的酸^[14], 并且能够加速乳酪的成熟, 改善乳酪的营养价值和香味成分^[15]。同时, 它还具有改善干酪质构、气孔形成和抑制病原菌等功能^[16-17]。除乳酸菌外, 奶

酪中含有的其他细菌微生物群如丙酸杆菌、凝固酶阴性葡萄球菌、哈夫尼菌及某些需氧放线菌等也有助于奶酪风味和颜色的形成^[18-19]。因此,对传统奶酪中微生物多样性的研究将有助于保护其中的微生物资源。

高通量测序是一种新型的分子生物学手段,可用于土壤、食品和动物肠道等环境中微生物的多样性研究^[20],可实现对复杂或低丰度微生物的全方位、跨物种的研究^[21],而传统培养法作为微生物鉴定的经典方法,可将分离出的微生物进行后续研究及应用。

塔县传统奶酪属于牛乳自然发酵乳制品,其中蕴含的微生物种类繁多,目前采用高通量测序技术结合传统培养的方法研究奶酪中微生物多样性的报道相对较少^[22],对塔县牧区手工奶酪中微生物进行研究的报道更少。因此,本研究在采用高通量测序技术对乳制品中细菌多样性进行分析的基础上,结合传统培养法对乳制品中的乳酸菌进行分离鉴定,并根据其 16S rRNA 基因序列进行功能预测分析,旨在探明塔县地区传统乳制品中微生物种类及其基因功能信息,为挖掘和保护其中的微生物资源提供保障,同时为评估传统奶酪的安全性提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

2023 年 1 月在塔什库尔干乡、达布达尔乡

的牧民家里收集了传统手工制作的酸奶及奶酪样品,收集到一个食品盒子内用密封薄膜密封后立刻装入装有冰袋的保温箱内,运送到化验室并存放在-25 °C的冷冻室里备用。样品信息见表 1。大肠杆菌和枯草芽孢杆菌,南京乐诊生物技术有限公司;乳酸链球菌素,北京索莱宝科技有限公司。

1.2 培养基

MRS 固体培养基参考文献[23]配制, M17 培养基参考文献[24]配制, Lee 氏培养基参考文献[25]配制。

1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 PCR 试剂盒,北京全式金生物技术有限公司; Soil and Stool DNA Kit, Qiagen 公司; 凝胶回收试剂盒,上海一研生物科技有限公司; Complete Genome of *Aureobacteria* DNA 提取试剂盒,北京启研生物技术有限公司; 2×*Easy Taq*TM PCR SuperMix, 北京索莱宝科技有限公司。光学显微镜,麦克奥迪实业集团有限公司; 生物显微镜,上海千欣仪器有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司。

1.4 细菌多样性分析

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取乳制品样品总基因组 DNA,利用紫外分光光度计检测 DNA 的浓度及纯度。采用引物 27F (5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3')和 533R (5'-TTACCG

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

样品类型 Type	试验样品来源 Source	试验样品编号 Experimental sample number	采集样品编号 Sample collection number
酸奶 Yogurt	达布达尔乡 Dabudar Township	DS	1 号样品 Sample 1
	塔什库尔干乡 Tashkurgan Township	WS	2 号样品 Sample 2
奶酪 Cheese	达布达尔乡 Dabudar Township	DN	3 号样品 Sample 3
	塔什库尔干乡 Tashkurgan Township	WN	4 号样品 Sample 4

CGGCTGCTGGCA C-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 5×FastPfu Buffer 4 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 上、下游引物(5 μmol/L)各 0.8 μL, Faustus Polymerase 0.4 μL, BSA 0.2 μL, 模板 DNA 10 μL, ddH₂O 补足 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 27 个循环; 72 °C 10 min。PCR 结束后用 1%琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测。采用 Illumina MiSeq PE 300 型高通量测序仪对乳制品中微生物菌群进行 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区检测, 利用凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行切胶回收和鉴定。

1.5 乳酸菌多样性分析

1.5.1 菌株的分离与纯化

将采集到的样品置于无菌超净工作台中, 使用生理盐水将样品 10 倍比梯度稀释, 分别选 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 和 10⁻⁷ 这 5 个梯度的稀释液 0.1 mL 均匀涂布在含有 2%碳酸钙的 MRS、Lee 氏和 M17 固体培养基上, 将涂布好的培养基静置 20 min 后倒置于 37 °C 培养箱中培养 48 h。选择单个菌落分别进行简单染色或革兰氏染色。用光学显微镜观察是否有明显溶钙圈进行筛选细菌。

1.5.2 16S rRNA 基因序列分析

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的 DNA 作为模板, 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL): 基因组模板 DNA 2 μL, 2×Easy Taq™ PCR SuperMix 13.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 结束后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 16S rRNA 基因的扩增产物。利用

BioEdit 软件对细菌的 16S rRNA 基因序列进行整理, 并利用 BLAST 分析工具, 将有效序列与 NCBI GenBank 数据库进行比较, 找出相似性最高的已知菌株序列, 利用 MEGA 13.0 软件构建系统发育树。

1.5.3 抑菌特性测定

将大肠杆菌和枯草芽孢杆菌转接至 LB 液体培养基中进行活化, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h。使用琼脂挖孔法研究待测菌对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑制能力。将大肠杆菌和枯草芽孢杆菌这 2 种指示菌的菌悬液(约 10⁸ CFU/mL)以 1%的量接种在 LB 固体培养基中, 培养基温度控制在 60 °C 以下, 在培养基未完全凝固时加入指示菌, 指示菌和培养基充分混合后倒平板。待平板完全凝固后, 轻轻打一个直径为(9.00±0.01) mm 的圆形孔。以未接菌的 MRS 培养基(pH 7.0)作为空白对照, 取 100 μL 加入含有乳酸菌的培养液, 并以乳酸链球菌素(nisin)为阳性对照。将加入待测菌培养液的平板于 37 °C 恒温培养 24 h。培养完成后采用游标卡尺测量、记录各菌株的透明圈直径, 对其抑菌能力进行分析。

1.6 数据处理

利用 SPSS 20.0 软件进行数据处理及统计分析, 并用 Origin 2019b 进行图像处理。

2 结果与分析

2.1 乳制品中细菌多样性分析

2.1.1 细菌序列信息及 α 多样性指数

所得到的奶酪样本序列信息及 α 多样性指数见表 2。4 份乳制品样本共得到细菌的 16S rRNA 基因原始序列 561 955 个, 经过质控筛选后, 获得的有效序列为 545 560 个。从菌群数量来看, DN 样品的 Sobs 指数和 Chao1 指数最大, 说明其细菌数目最多, 且与其他样品差异显著。

表 2 四份奶酪样品的序列信息及 α 多样性指数

Table 2 Sequence information and alpha diversity values of 4 traditional dairy product samples

Item	DS	DN	WS	WN
Sobs index	9.00±1.00b	58.00±2.00a	16.67±0.58d	53.33±2.52c
ACE index	25.45±11.94ab	67.64±3.69a	44.40±33.65b	55.21±2.15ab
Chao1 index	12.83±4.33b	65.00±5.00a	24.03±7.21d	55.01±2.13c
Simpson index	0.53±0.02a	0.12±0.01c	0.51±0.06a	0.31±0.01b
Shannon index	0.70±0.03b	2.42±0.09a	0.84±0.08c	1.79±0.15c
Coverage	0.999 9±0.000 0a	0.999 8±0.000 0b	0.999 9±0.000 1a	0.999 9±0.000 0a

同列不同小写字母表示不同奶酪样品间差异显著, $P<0.05$

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences between different cheese samples, with $P<0.05$.

达布达尔乡牧民家庭酸奶 DS 样品的 Sobs 指数和 Chao1 指数较小, 其细菌数目较少。从种类上看, DN 中的 Simpson 指数最低, 而 Shannon 指数最高, 表明 DN 中的微生物多样性最高。样品 DS 的 Simpson 指数最大, Shannon 指数最小, 说明其细菌多样性最低。4 份样品的 Coverage 指数均接近于 1, 说明样品中的序列基本都被完全测出, 测序结果能够充分反映样品中的细菌多样性^[26]。

2.1.2 细菌群落多样性分析

在细菌属水平上(图 1A), 相对丰度排名前三的细菌属依次为乳杆菌属 (*Lactobacillus*, 63.39%)、链球菌属 (*Streptococcus*, 40.43%) 和乳球菌属 (*Lactococcus*, 6.32%), 与张敏等^[27]报道的在牦牛酸奶样品中 11 个属的结果基本一致。本研究奶酪样品中主要的优势菌属为乳球菌属, 酸奶样品中优势菌属为乳杆菌属。本研究中不同区域样品组间细菌群落结构组成相似, 仅组成比例存在一定差异, 乳杆菌属和链球菌属为优势菌属, 平均相对丰度值分别>61.82%和>11.88%。Murugesan 等^[28]利用高通量测序技术分析墨西哥奶酪中的细菌群落, 结果发现链球菌属、乳球菌属、乳杆菌属、气球菌属和魏塞拉菌属是主要菌群, 本研究与其相同之处在于奶酪中均存在

链球菌属和乳杆菌属, 说明上述共同菌群是大部分传统手工奶酪中的常见菌种。本研究未发现气球菌属, 说明由于制作手法及气候条件的不同可能会导致乳制品中的微生物群落结构有所差异。

在细菌种水平上(图 1B), 大部分都属于 unclassified (18.19%), 能准确鉴定到种的只有保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*, 1.86%)、嗜热链球菌 (*Streptococcus salivarius*, 18.94%) 和副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*, 0.46%)。高通量测序结果显示样品中的优势乳酸菌种为 *L. delbrueckii*, 且大部分存在于 WS 样品中, 结果表明, 来自不同样本的优势种有较大差异^[29]。基于 16S rRNA 基因 V3-V4 区序列的 Illumina MiSeq PE300 结果在物种鉴定到种水平上具有一定的局限性, 不能鉴定大部分种类的病原菌, 这与陈泽斌等^[30]的报道一致。

2.1.3 不同样品细菌组成群落差异

主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 多应用于数据分析的方差分解层面上, 主坐标分析的一个重要作用是降低数据维数, 简化分析过程。当样品间的差异不大时, 它们之间的相似程度更大, 从而在 PCoA 图表上反映出来的相似性就会更小。

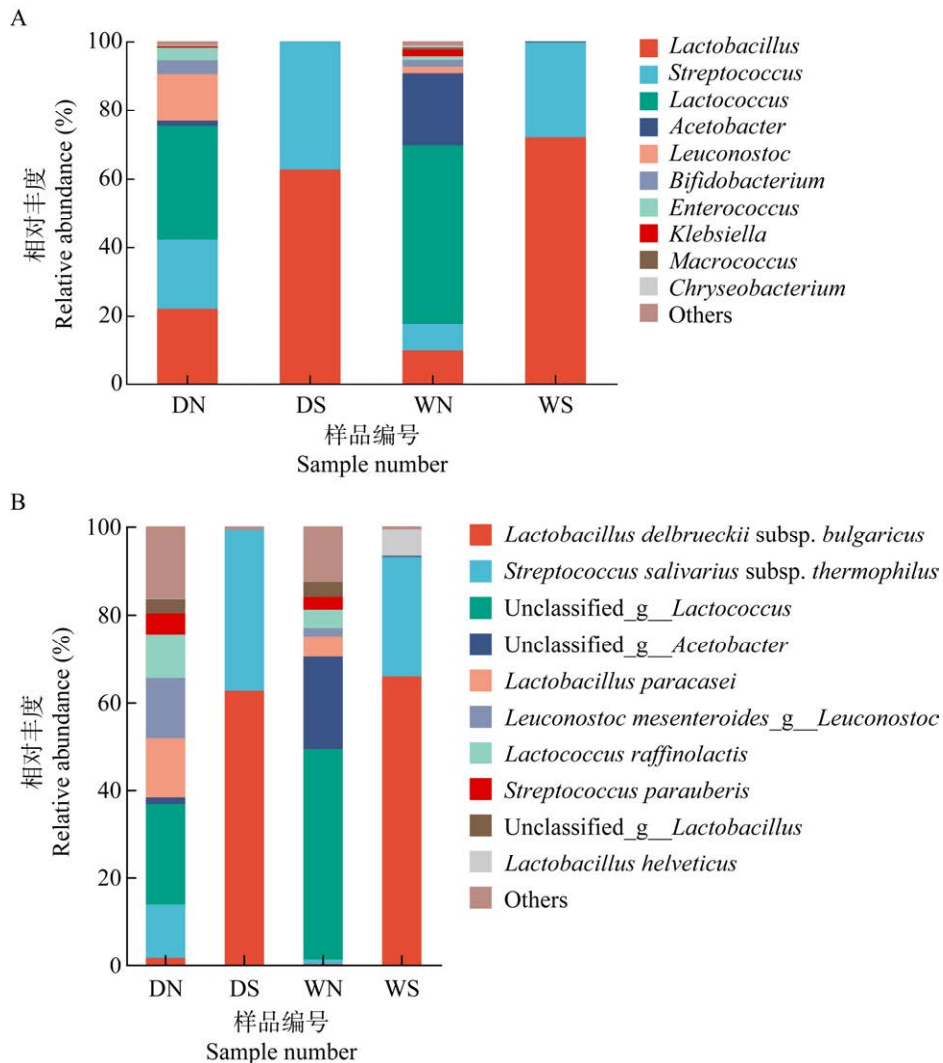


图 1 属水平(A)和种水平(B)的细菌群落组成

Figure 1 Relative abundance of bacteria at genus levels (A) and species levels (B) from all dairy samples.

如图 2 所示,基于加权主坐标中第一主成分的贡献率为 85.29%、第二主成分的贡献率为 9.94%。4 份样品尽管其原材料均为牛奶且制作过程中也均未添加任何外源发酵剂,但由于其制作工艺、生产温度及奶源本身微生物种类的差异^[31]等原因,4 份样品的细菌群落组成也会有所差异。

由 PCoA 曲线(图 2)可知,来自同一地区的样品大致趋向聚集在一个坐标区域范围,不同地区的样品存在一定的差异。4 个样品中的菌群构成大致可以划分为 2 种,其 WN 和 DN 样品处

于相同的区间,说明这 2 种样品中的菌群构成基本相同。两个样本中均含有大量的 *Lactococcus* spp.,但在微生物群落结构及相对丰度上差异不大。如图 2 所示,酸奶 DS、WS 样品的分布也是集中在一起,说明这两个样品的细菌群落组成差异不大,同时 WS、DS 样品中的优势菌群均为 *Lactobacillus* spp.。其次,奶酪 WN、DN 样品与 WS、DS 样品形成 2 个单独类群,不仅优势菌群各不相同,而且菌群组成差异较大,因此在图中各自形成了单独类群且距离较远。

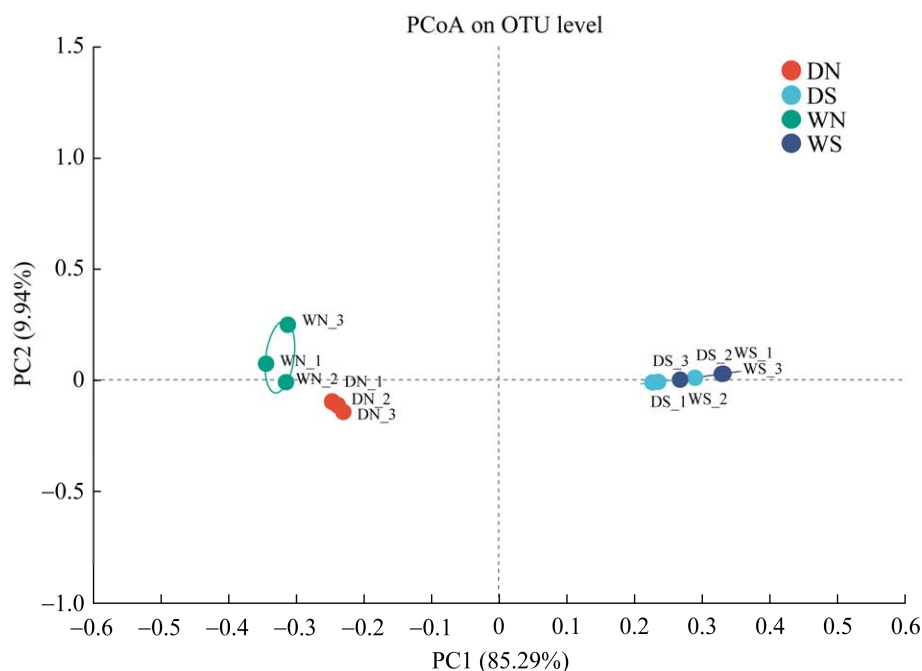


图 2 基于加权 UniFrac 距离的不同样品 PCoA 图

Figure 2 PCoA of different samples based on weighted UniFrac distance.

2.2 乳酸菌多样性分析

2.2.1 乳酸菌形态学观察

为进一步分析乳制品中的菌种,对 4 份乳制品样本采用不同培养基进行了培养。从 MRS、Lee 氏和 M17 培养基中一共分离出 38 株疑似乳酸菌,其中有 10 株球菌(29.4%)、28 株杆菌(70.6%)。在 MRS 固体培养基上为乳白色或微黄色,部分透明,边缘规则或齿状,圆形隆起或扁平且大部分表面光滑(图 3)。根据革兰氏染色均为阳性、过氧化氢酶试验为阴性和生理指标初步确定为乳酸菌^[32]。

经观察发现,菌株 WSM-3、WSL-16 和 WSL-11 等菌落均为乳白色、边缘整齐、较湿润,菌体呈短杆状、半透明或不透明,革兰氏染色均为阳性。菌株 WSL-11 菌落表面比较湿润,乳白色,椭圆形。

2.2.2 细菌 16S rRNA 基因序列分析

将分离得到的 38 株菌展开了测序,所得序

列结果进行 BLAST 比对,选出相似性最高的菌株序列展开分析,菌株 16S rRNA 基因序列电泳结果见图 4。

对 38 个菌株进行 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增,获得序列后,根据 GenBank 数据库核苷酸序列比对结果进行菌株的鉴定^[33](表 3),以序列相似性大于等于 98.7%为同种标准归类,下载相似性最高的模式菌株序列,与测序序列利用 MEGA 13.0 软件构建系统发育树(图 5)。结合生理生化试验和系统发育树结果,将 38 株乳酸菌归为 7 属 13 种,其中菌株 WSM17-3 等 3 株菌为枯草芽孢杆菌;菌株 WSM-4 为芽孢杆菌;菌株 DNM-1 等 3 株菌为干酪乳杆菌;菌株 DNM-12 等 3 株菌为肠系膜明串球菌;菌株 WSL-4 为肺炎克雷伯菌;菌株 DNM-11 为溶血性葡萄球菌;菌株 WSL-12、菌株 WSL-16 为肠系膜明串球菌;菌株 WSM-3 等 10 株菌为明串珠菌;菌株 DNM-7 等 4 株菌为植物乳杆菌;菌株 DSM-11

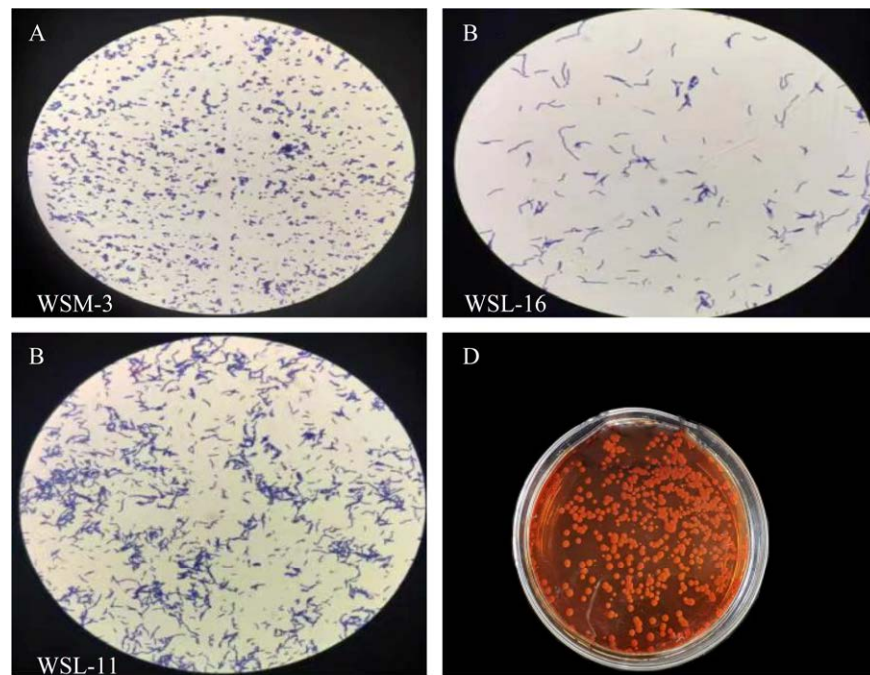


图3 乳酸菌显微染色和平板形态图 A、B、C分别为乳酸菌显微观察图。D为乳酸菌平板图

Figure 3 Microscopic staining and plate morphology of lactic acid bacteria. A, B and C are microscopic observations of lactic acid bacteria, respectively. D is a plate graph of lactic acid bacteria.

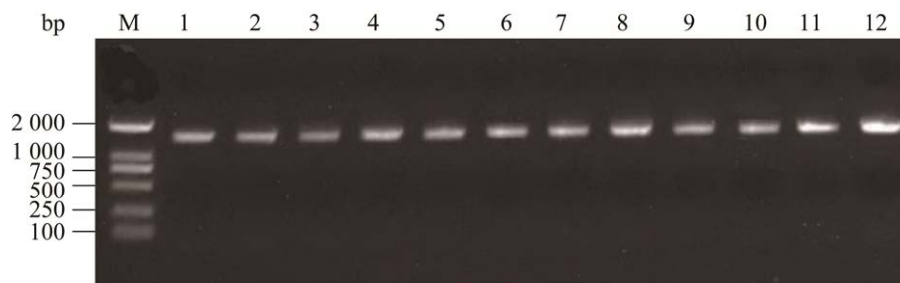


图4 菌株16S rRNA基因序列电泳图

Figure 4 Electrophoretic map of strain 16S rRNA gene sequence. M: DL2000 DNA Marker. 1: WSM17-4; 2: WSM-3; 3: WSL-11; 4: DNM-2; 5: DNM-8; 6: DNM-9; 7: DNM-10; 8: DNM-14; 9: DSM-1; 10: DSM-10; 11: WSM-6; 12: WSM-8.

为塞内加尔醋杆菌；菌株 WSL-5 为乳肠球菌；菌株 WSM-7 为粪肠杆菌；菌株 WSM17-4 为副炭疽杆菌。

2.2.3 不同地区分离的细菌信息统计

本研究进一步对不同地区发酵乳中的细菌

丰富度和多样性进行了分析，结果见表4。

由表4可知，从塔县塔什库尔干乡乳制品中分离纯化及鉴定到的细菌种类最多，塔县达布达尔乡酸奶和奶酪中所含有的细菌种类丰富度比较少。DSM-1和DNM-10是达布达尔村的酸奶和奶

酪，它们的优势菌群都属于假肠膜明串珠菌(*L. pseudomesenteroides*)。

两个区域所获得的主要菌种存在差异，其中塔什库尔干乡样本中发现了独特的乳杆菌，达布达尔乡样本中发现了乳酸菌，且各区域样本中的

乳酸菌存在差异，这与奶酪原料、成熟程度、加工方法和地理环境等因素有关^[34]。

2.2.4 菌株的抑菌活性

从38株菌中挑选代表不同种的11菌株进行抑菌试验，结果见图6。

表3 38株细菌分子生物学鉴定结果

Table 3 Molecular biological identification results of 38 strains of spoilage bacteria

属 Genus	种 Species	代表菌株编号 Representative strain number	相似性 Similarity (%)	GenBank 登录号 GenBank accession No.	相似性最高菌株的 登录号 Accession No. of the most similar strain	菌株数 Number of bacterial strains
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	WSM17-3	99	OQ828445	NZ-CP101135.1	3
	芽孢杆菌 <i>Bacillus luti</i>	WSM-4	100	OQ828072	NZ-CP40336.1	1
	副炭疽杆菌 <i>Bacillus paranthracis</i>	WSM17-4	100	OQ828446	NZ-CP101135.1	1
	乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>	副干酪乳杆菌 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	DNM-1	100	OQ828454	NC-022112.1
植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌	DNM-7	99	OQ828673	NZ-CP028221.1	4
	肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	霍氏肠球菌 <i>Enterobacter hormaechei</i>	DNM-12	100	OQ828456	NZ-CP077392.1
乳肠球菌 <i>Enterococcus durans</i>	乳肠球菌	WSL-5	100	OQ828671	NZ-CP022930.1	1
	粪肠杆菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	WSM-7	100	OQ828674	NZ-KB944666.1	1
	克雷伯氏菌属 <i>Klebsiella</i>	肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	WSL-4	100	OQ828074	NC-01684.5
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	溶血性葡萄球菌 <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	DNM-11	100	OQ828455	NZ-CP033732.1	1
明串珠菌属 <i>Leuconostoc</i>	肠系膜明串珠菌 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	WSL-12	100	OQ826836	NZ-CP028251.1	2
	假肠膜明串珠菌 <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	WSM-3	100	OQ826831	NZ-RIVNO1000037.1	10
	醋菌属 <i>Acetobacter</i>	塞内加尔醋杆菌 <i>Acetobacter senegalensis</i>	DSM-11	100	OQ828669	NZ-LN606600.1

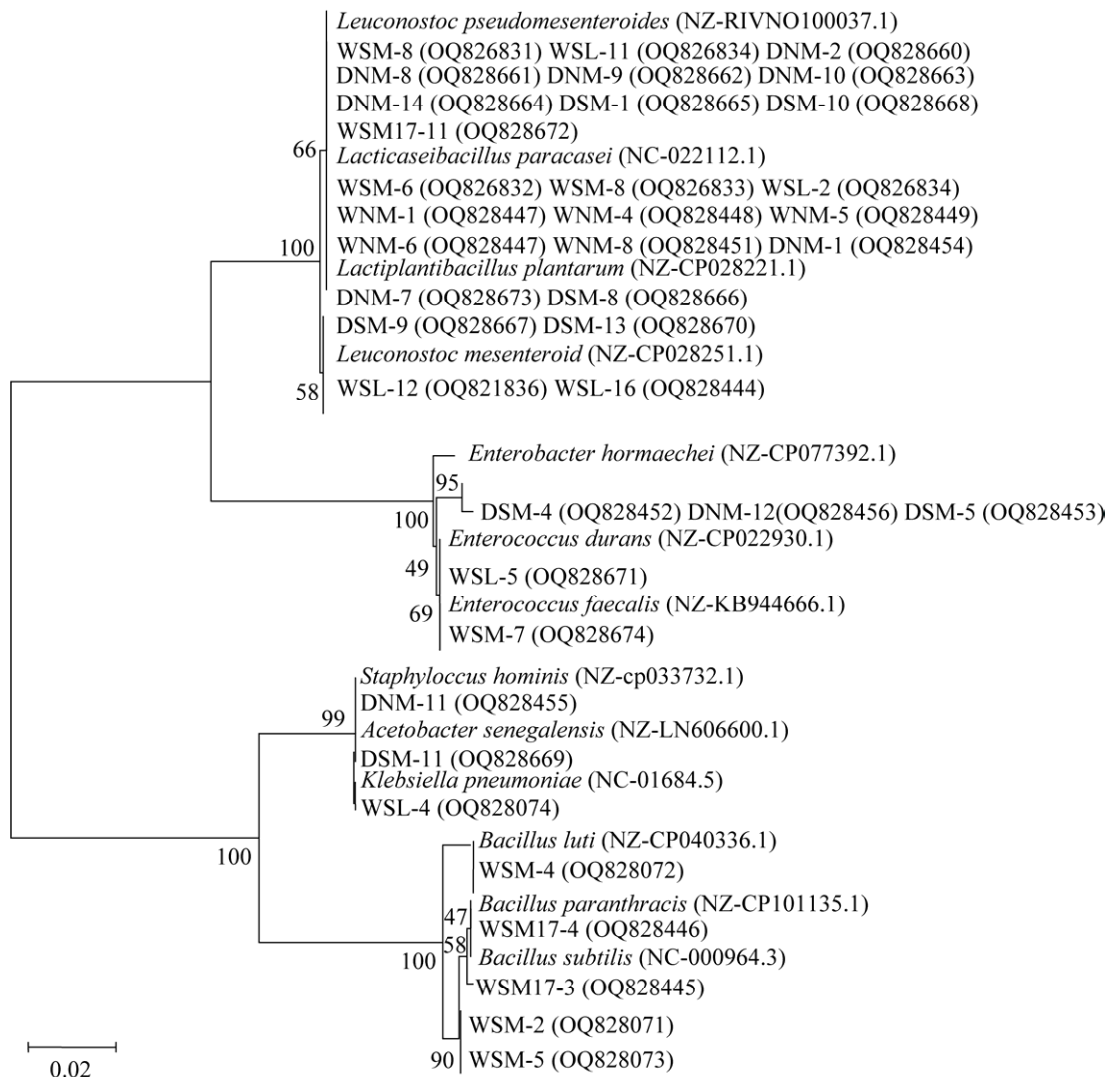


图5 奶酪细菌基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树 分支数字是相对长度; 0.02表示进化距离
Figure 5 Phylogenetic tree of cheese bacteria constructed based on 16S rRNA gene sequence. The branch numbers are the relative lengths; 0.02 represent evolutionary distance.

据报道,乳酸菌的代谢产物在一定程度上可以抑制致病菌的增长^[35]。本试验选用的病原菌分别是 *Escherichia coli* 和 *Bacillus subtilis*^[36]。以乳酸链球菌素对病原菌的抑菌浓度为测试标准,分析并比较11种乳酸菌对病原菌的抑菌效果。乳酸菌对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌抑菌效果如图7和图8所示,随着乳酸菌培养上清液中代谢物抑杀效果的增强,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌在孔周边的生长能力减弱,抑菌圈直径增大。结果

表明,11株乳酸菌都能够抑制2种指示菌的生长,尤其是对枯草芽孢杆菌的抑菌作用较强,抑菌圈较为明显。经测量,对大肠杆菌抑菌圈直径平均为15.12 mm,对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径平均是19.07 mm,都具有较强的抑菌活性。乳酸菌对致病菌的抑菌活性是衡量其功能性益生性能的一个重要指标。如图6所示,11株乳酸菌都能抑制致病菌及非致病菌的生长,菌株WSM17-4和菌株WSM-3对大肠杆菌(*E. coli*)有

表 4 不同地区分离的细菌信息统计

Table 4 Information statistics of bacteria isolated from different areas

样品来源地 Source of sample	菌株编号/菌种名 Strain number/Strain name	合计菌株数 Total number of bacterial strains
塔县塔什库尔干乡瓦尔希迭村牧民家庭酸奶和奶酪 Yogurt and cheese for Herdsmen's families in Walxidi Village, Tashkurgan Township, Taxkurgan County	WSM-2 (<i>Bacillus subtilis</i>), WSM-3 (<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>),	21 (11 个种)
	WSM-4 (<i>Bacillus luti</i>), WSM-5 (<i>B. subtilis</i>), WSM-6 (<i>Lactobacillus paracasei</i>), WSM-7 (<i>Enterococcus faecalis</i>), WSM-8 (<i>L. paracasei</i>), WSL-2 (<i>L. paracasei</i>), WSL-4 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>), WSL-5 (<i>Enterococcus durans</i>), WSL-11 (<i>L. pseudomesenteroides</i>), WSL-12 (<i>Lactobacillus plantarum</i>), WSL-16 (<i>L. plantarum</i>), WSM17-3 (<i>B. subtilis</i>), WSM17-4 (<i>Bacillus paranthracis</i>), WSM-11 (<i>Staphylococcus heamolyticus</i>), WNM-1 (<i>L. paracasei</i>), WNM-4 (<i>L. paracasei</i>), WNM-5 (<i>L. paracasei</i>), WNM-6 (<i>L. paracasei</i>), WNM-8 (<i>L. paracasei</i>)	21 (11 species)
塔县达布达尔乡达布达尔村牧民家庭酸奶和奶酪 Yogurt and cheese for Herdsmen's households in Dabudar Village, Dabudar Township, Taxkurgan County	DSM-1 (<i>L. pseudomesenteroides</i>), DSM-4 (<i>Enterobacter hormaechei</i>),	17 (6 个种)
	DSM-5 (<i>E. hormaechei</i>), DSM-8 (<i>L. plantarum</i>), DSM-9 (<i>L. plantarum</i>), DSM-10 (<i>L. pseudomesenteroides</i>), DSM-11 (<i>Acetobacter senegalensis</i>), DSM-13 (<i>L. plantarum</i>), DNM-1 (<i>L. paracasei</i>), DNM-2 (<i>L. pseudomesenteroides</i>), DNM-7 (<i>L. plantarum</i>), DNM-8 (<i>L. paracasei</i>), DNM-9 (<i>L. pseudomesenteroides</i>), DNM-10 (<i>L. pseudomesenteroides</i>), DNM-11 (<i>S. heamolyticus</i>), DNM-12 (<i>E. hormaechei</i>), DNM-14 (<i>L. pseudomesenteroides</i>)	17 (6 species)

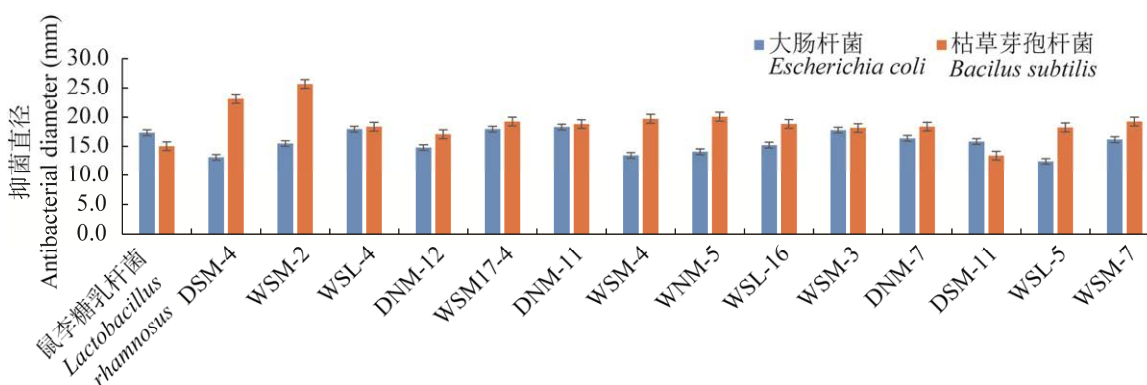


图 6 乳酸菌菌株对指示菌的抑制能力

Figure 6 Inhibition ability of lactic acid bacteria strains on indicator bacteria.

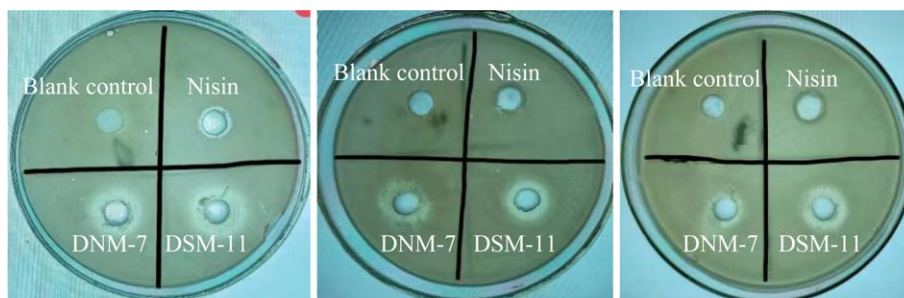


图 7 乳酸菌发酵液对大肠杆菌的抑菌效果

Figure 7 Antibacterial effect of lactic acid bacteria fermentation liquid on *Escherichia coli*.

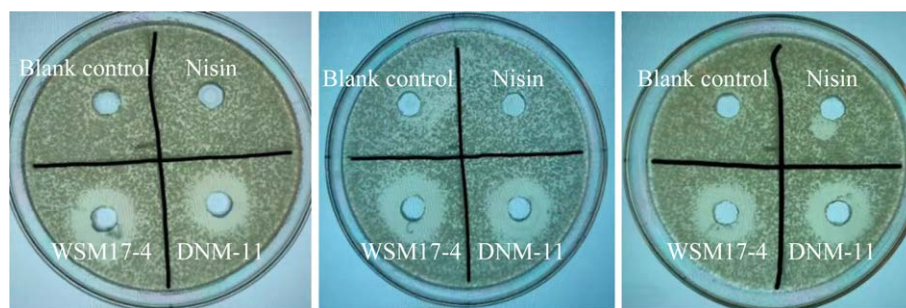


图 8 乳酸菌发酵液对枯草芽孢杆菌的抑菌效果

Figure 8 Antibacterial effect of lactic acid bacteria fermentation liquid on *Bacillus subtilis*.

很强的抑制效果, 抑菌圈与对照组相比较有显著性差异。菌株 DSM-4 和菌株 WSM-2 对非致病菌枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的抑制作用最强。

2.2.5 两种方法在属水平上分析细菌种类

采用高通量测序与常规培养法结合的方法

对 4 种奶酪与酸奶中分离的乳酸菌进行对比研究。经分析发现 2 种检测方法对乳酸菌物种的鉴别有显著的差别(表 5)。

在种水平上, 高通量测序技术鉴定出 8 类乳酸菌, 传统培养法分离出 13 类乳酸菌, 但测序

表 5 两种方法在属水平上分析细菌种类

Table 5 Two methods for analyzing bacterial species at the genus level

种属 Species	高通量测序 High throughput sequencing	传统培养方法 Traditional cultivation methods (proportion)
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+
<i>Bacillus luti</i>	-	+
<i>Lactobacillus paracasei</i>	+	+
<i>Enterococcus hormaechei</i>	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+
<i>Staphylococcus heamolyticus</i>	-	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	-	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+
<i>Acetobacter senegalensis</i>	+	+
<i>Enterococcus durans</i>	-	+
<i>Enterobacter faecalis</i>	-	+
<i>Bacillus paranthracis</i>	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	+	-
<i>Lactococcus vaffinolactis</i>	+	-
<i>Streptococcus parauberis</i>	+	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	+	-

+: 检测到该菌种; -: 未检测到该菌种

+: The bacterial strain was detected; -: The strain was not detected.

法未能鉴定出 *Bacillus subtilis*、*Enterococcus hormaechei* 和 *Leuconostoc pseudomesenteroides* 等；传统培养法未分离出 *Lactobacillus delbrueckii* 及 *Streptococcus parauberis* 等。有以下几种可能的原因：(1) 本研究的测序结果只呈现出了相对丰度大于 2% (图 1B)的细菌属，而 *Bacillus subtilis* 在奶酪中的含量可能低于 2%。在种水平上,传统培养法涂板能够鉴定出更多相对丰度低的乳酸菌。(2) 有些菌种不易在本研究所用的 3 种培养基上生长,无法被传统培养法鉴定出来,而可以被 PCR 扩增并在高通量测序中被鉴定出来。

2.3 样品微生物基因功能预测分析

乳制品中的细菌类型可以调节奶酪在成熟过程中的风味产生,并且与基因组编码的代谢多样性直接相关^[37]。基于(clusters of orthologous groups of proteins COG)数据库中的信息,将各 COG 的说明信息和它们的功能性信息从

eggNOG 数据库中进行分析,得到的功能预测相对丰度如图 9 所示。

四份样品得到的 COG 功能预测信息组成基本相同,但相对丰度差异比较明显。乳制品中相对丰度较高的基因参与到未知功能和一般功能这 2 个 COG 分类中,其余基因大多与 RNA 加工和修饰、能量生产和转换、细胞周期控制、脂质运输、复制转录、辅酶运输代谢和能量转换相关,这和先前的发现^[38]是一致的。因此,在奶酪微生物基因组中,存在着许多与蛋白和糖代谢有关的基因。如图 9 所示,奶酪含有较丰富的与转录和能量转化有关的基因。尽管存在显著差异,但 4 个样品(表 1)中的细菌种群构成明显不同。如表 6 所示,在这些样本中,COG 存在着明显的差别($P < 0.05$),但是它们除了在相对丰度上存在差异以外,在基因的功能上存在着类似的共性^[39-40]。

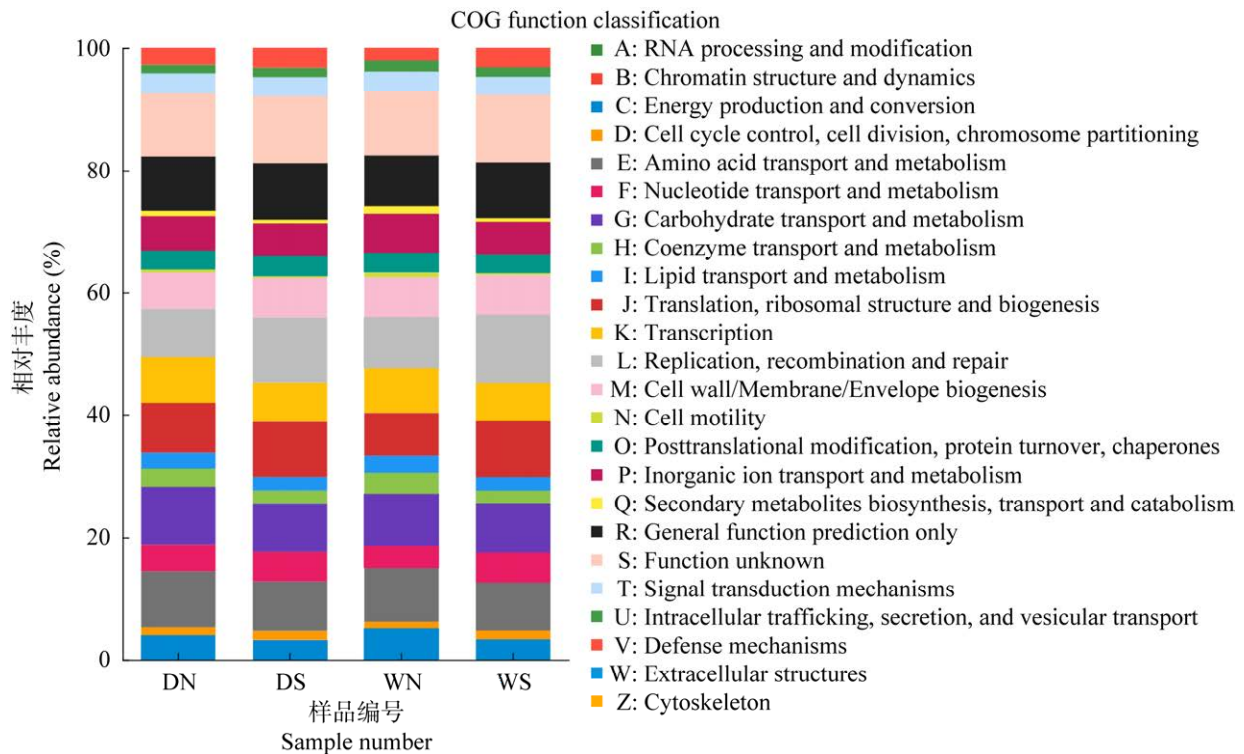


图 9 乳制品微生物基因功能预测分析图

Figure 9 Functional prediction analysis of microbial genes in dairy products.

表6 各样品间的 COG 显著差异

Table 6 Significant differences in COG between different products

COG 功能预测信息	DS	WS	DN	WN
COG function prediction information				
RNA 加工和修复	1.00±0.816g	31.50±29.274be	959.00±416.560n	3 239.75±2 941.000g
RNA processing and modification				
染色质结构与动力学	1.75±0.957g	2.50±1.291e	126.66±60.077h	137.50±101.946g
Chromatin structure and dynamics				
能源生产和转换	366 846.75±	37 508.75±	572 663.00±	676 020.50±
Energy production and conversion	244 585.604cdefg	250 195 858bcde	44 512.502k	461 408.11abcdefg
细胞周期控制、细胞分裂和染色体分割	166 072.75±	166 109.50±	181 180.33±	140 968.75±
Cell cycle control, cell division, and chromosome partitioning	11 072.510fg	110 737.018de	4 831.027k	94 334.271efg
氨基酸运输和代谢	913 996.00±	874 360.50±	1 316 729.33±	1 167 786±
Amino acid transport and metabolism	60 731.749abcde	583 495.50abc	50 621.051bc	784 375.742ab
核苷酸转运和代谢	549 266.50±	552 622.50±	614 799.00±	485 566.50±
Nucleotide transport and metabolism	366 180.295bcdefg	368 418.690bcde	8 564.433h	325 613.398bcdefg
碳水化合物运输和代谢	892 544.25±	918 452.50±	1 352 326.33±527	1 116 147.50±
Carbohydrate transport and metabolism	595 191.203abcde	612 532.305abc	225.9430b	761 897.506abc
辅酶转运与代谢	237 156.25±	229 269.75±	416 784.00±	451 756.50±
Coenzyme transport and metabolism	158 178.140efg	152 934.503cde	21 609.711ij	304 383.232bcdefg
脂质运输和代谢	244 799.25±	247 622.00±	368 082.66±	364 397.50±
Lipid transport and metabolism	163 197.887efg	165 085.205cde	20 023.121j	244 745.640cdefg
翻译、核糖体结构与生物发生	1 023 844.25±	1 016 555.00±	1 172 329.66±	920 971.00±
Translation, ribosomal structure and biogenesis	682 566.246abcd	677 713.198ab	21 249.974d	617 740.426abcde
转录	707 360.50±	702 901.00±	1 055 201.00±	978 255.75±
Transcription	471 575.410abcdefg	468 603.656abcd	45 207.111e	658 967.879abcd
复制、重组和修复	1 211 485.25±	1 251 619.50±	1 129 533.00±	1 097 198.50±
Replication, recombination and repair	807 963.264ab	834 843.096a	34 450.001d	733 908.809abc
细胞壁/膜/包膜生物发生	726 040.75±	722 700.50±	856 987.66±	857 244.75±
Cell wall/Membrane/Envelope biogenesis	22 761.352fg	481 796.663abcd	37 976.622f	577 917.367abcdef
细胞运动	34 137.25±	32 968.50±	58 748.66±	98 032.00±69 761.816fg
Cell motility	22 761.352fg	21 985.336de	17 106.483m	
翻译后修饰、蛋白质周转和伴侣	371 331±	363 729.50±	456 751.33±	442 134.00±
Posttranslational modification, protein turnover, and chaperones	247 585.737cdefg	242 529.176bcde	21 246.447i	297 572.963bcdefg
无机离子运输和代谢	611 610.50±	598 519.50±	794 462.66±46	832 760.75±
Inorganic ion transport and metabolism	407 805.654abcdefg	399 098.931abcde	983.023g	560 076.624abcdef
次生代谢产物的生物合成、运输和分解代谢	55 129.25±	56 512.50±	124 727.33±	170 018.75±
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	36 743.510fg	37 672.934de	14 439.358l	11 637.639efg

(待续)

(续表 6)

COG 功能预测信息	DS	WS	DN	WN
通用函数预测	1 055 387.50±	1 030 937.25±	1 277 488.66±36	110 534.75±
General function prediction only	703 707.358abc	687 469.286ab	633.822c	741 556.085 5abc
功能未知	1 240 001.50±	125 072.25±	1 479 848.33±50	1 377 292.50±
Function unknown	826 675.638a	833 831.985a	341.321a	923 992.396a
信号传导机制	340 741±	323 876.50±	455 613.66±31	429 179.25±
Signal transduction mechanisms	227 345.722defg	216 201.233cde	902.755i	290 131.560bcdefg
细胞内运输、分泌和囊泡运输	172 173.25±	169 237.00±	200 809.33±17	237 760.25±
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	114 783.456fg	112 827.767de	108.486 1k	161 320.917defg
防御机制	364 200.750±	355 532.00±	389 593.66±4	272 173.00±
Defense mechanisms	242 828.170cdefg	237 074.815bcde	788.929j	183 168.953defg
细胞外结构	5.750±11.500g	5.750±11.500e	1.00±1.000n	10±8.678g
Extracellular structures				
细胞骨架	6.00±12.000g	6.00±12.00e	101.33±15.502n	24.48±22.691g
Cytoskeleton				

不同小写字母表示在统计学上具有显著差异($P<0.05$)

Different lowercase letters indicate significant statistical differences ($P<0.05$).

3 讨论与结论

本研究应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术和传统培养相结合的方法对塔县达布达尔乡和塔什库尔干乡的 4 份酸奶和奶酪传统手工乳制品中的乳酸菌进行了细菌多样性研究。结果显示, 奶酪中的细菌 Chao1 指数、OTU 数量均高于酸奶样品, 在 PCoA 中, 奶酪样品分布分散且样品之间间距也较大, 这表明奶酪的微生物群落多样性和总体相对丰度较高, 但其组成成分并不稳定, 样品之间存在着较大的差异, 这可能是由于奶酪繁杂的制作过程以及发酵过程中微生物自身的不稳定性和复杂性造成的。经检测, 在属水平上 4 种样品的优势菌群存在一定的差异, 但是乳杆菌属、链球菌属和葡萄球菌属等优势菌种可以对蛋白质水解, 对乳蛋白进行降解, 对氨基酸进行代谢, 并产生挥发性风味物质, 还可以对奶酪制品的口感和香味的改善起到很大的作用。因为酸奶和奶酪样品的加工方法不同, 它们与外界微生物的接触以及所保持的优势菌群数量也

不同, 这些不同的菌群就形成了各自不同的风味^[41-42]。开放性的发酵过程使其乳制品有十分独特的风味并且保留乳酸菌丰富的微生物资源^[43]。

通过培养法从奶酪中分离出的细菌主要集中在优势性较强的乳杆菌, 在酸奶中优势细菌明串珠菌属为主要优势菌。Jin 等^[44]对自制干酪中的菌群进行了研究, 发现乳酪中的主要菌群以乳球菌(51.46%)和链球菌(17.81%)为主, 与我们前期的研究结论不符, 说明塔县手工乳制品中的菌群结构比较复杂, 其原因在于塔县手工业型乳制品加工的生态系统比较复杂^[45], 而且这些微生物适宜生长在奶酪中。

乳制品中涉及的乳杆菌种类包括乳杆菌属、乳球菌属、链球菌属、双歧杆菌属、肠球菌属 *Enterococcus*、明串珠菌属、芽孢杆菌属和片球菌属等。而我们前期筛选到的主要菌种是乳酸杆菌^[46]等。而本研究中我们所分离出的优势种属为乳杆菌属。李丹丹^[47]对牦牛乳制品中的乳酸菌进行分离鉴定, 获得 27 株干酪乳杆菌、35 株植物乳杆菌和 7 株鼠李糖乳杆菌。与本研究所分离鉴定

出的 9 株干酪乳杆菌和 4 株植物乳杆菌菌株属种相同。高海拔的特殊生产环境使得乳酸菌产酸能力和耐低温发酵在进化上有一定特殊性和差异性。

本研究奶酪样品中除优势的乳酸菌属以外,还存在一些肺炎致病菌(*Klebsiella pneumoniae*),以及感染机体后引起常见的皮肤、软组织化脓性炎症性的致病菌(如 *Staphylococcus hominis*);乳及乳制品因其含有丰富的营养物质而成为理想的细菌培养基,其中几种常见的食源致病菌如副溶血性弧菌、空肠弯曲杆菌、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特氏菌和阪崎肠杆菌等,对乳及乳制品品质安全造成严重威胁^[48]。导致乳品中细菌感染的环节众多,由于原料奶自身含有大量的细菌,在挤奶和贮运过程中容易形成源头的污染。此外,添加剂的使用、生产环境和运输条件等也会导致后续的细菌污染^[49]。

乳酸菌及益生菌的品质安全性评价极为重要,随着食品研究的逐步深入,乳酸菌的产品安全性评价将会日益趋于标准化。未来,人们将筛选到更多的能使食品风味佳且健康益处明显的乳酸菌菌株^[50]。通过上述研究能够更好地解析奶酪中的菌群结构,为实现塔吉克牧区的乳品工业应用奠定理论和技术支撑。为乳酸菌的安全性评价奠定一定的理论依据。

本研究发现,塔县传统发酵乳制品奶酪中微生物群落多样性高于酸奶,该结论与其他相近研究结果一致,这种差别很有可能与所处的环境和生产方式有很大的关系,可能是因为奶酪中所含有的营养物质比酸奶丰富得多,而且它的生境更加稳定,更适合微生物的生长。本研究利用高通量测序分析方法对塔县乳制品中的细菌结构和多样性组成进行了全面分析,确定了优势菌株;然后通过传统培养技术培养和分离了更多的乳酸菌,最后对菌株进行功能研究,从而为乳酸菌

的开发和利用提供正确方向。

REFERENCES

- [1] 张和平. 自然发酵乳制品中乳酸菌的生物多样性[J]. 生命科学, 2015, 27(7): 837-846.
ZHANG HP. Biodiversity of lactic acid bacteria in naturally fermented dairy products[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2015, 27(7): 837-846 (in Chinese).
- [2] 张敏, 张艳, 兰国伟, 关波, 刘忆冬, 周红, 倪永清. 高通量测序技术在乳制品微生物多样性中的研究进展[J]. 中国农学通报, 2016, 32(32): 48-52.
ZHANG M, ZHANG Y, LAN GW, GUAN B, LIU YD, ZHOU H, NI YQ. Review of high-throughput sequencing technology in microbial diversity of dairy product[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2016, 32(32): 48-52 (in Chinese).
- [3] ROH SW, KIM KH, NAM YD, CHANG HW, PARK EJ, BAE JW. Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing[J]. The ISME Journal, 2010, 4(1): 1-16.
- [4] 任建存. 我国特色乳制品的营养功效与产业发展[J]. 中国乳业, 2021(8): 34-39.
REN JC. Nutritional efficacy and industrial development of characteristic dairy products in China[J]. China Dairy, 2021(8): 34-39 (in Chinese).
- [5] 王淑梅, 宋倩倩, 王晓磊, 胡宝忠. 传统发酵乳制品中乳酸菌的分离及鉴定[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(2): 5-7, 17.
WANG SM, SONG QQ, WANG XL, HU BZ. Isolation and identification of lactic acid bacteria in traditional fermented dairy products[J]. Cereals & Oils, 2021, 34(2): 5-7, 17 (in Chinese).
- [6] 吴强, 孙世民, 李全海. 中国乳品消费特征、影响因素及趋势判断[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(4): 43-47.
WU Q, SUN SM, LI QH. Analysis on the present situation of China's dairy consumption and its factors[J]. China Dairy Industry, 2018, 46(4): 43-47 (in Chinese).
- [7] 陈丹, 曾小群, 潘道东, 朱浩嘉, 郭宇星. 特色鲜奶酪加工工艺研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(11): 15-20.
CHEN D, ZENG XQ, PAN DD, ZHU HJ, GUO YX. Study on the processing technic of characteristic fresh cheese[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(11): 15-20 (in Chinese).
- [8] PARTOVI R, GANDOMI H, AKHONDZADEH BASTI A, NOORI N, NIKBAKHT BORUJENI G, KARGOZARI M. Microbiological and chemical properties of siahmazgi cheese, an Iranian artisanal

- cheese: isolation and identification of dominant lactic acid bacteria[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2015, 39(6): 871-880.
- [9] GUIDONE A, ZOTTA T, MATERA A, RICCIARDI A, de FILIPPIS F, ERCOLINI D, PARENTE E. The microbiota of high-moisture mozzarella cheese produced with different acidification methods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 216: 9-17.
- [10] NACEF M, CHEVALIER M, CHOLLET S, DRIDER D, FLAHAUT C. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: the Maroilles[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 247: 2-8.
- [11] GONÇALVES DOS SANTOS MTP, BENITO MJ, de GUÍA CÓRDOBA M, ALVARENGA N, de HERRERA SRMS. Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and -independent DNA approaches[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 262: 63-70.
- [12] COPETTI MV. Yeasts and molds in fermented food production: an ancient bioprocess[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2019, 25: 57-61.
- [13] BANJARA N, SUHR MJ, HALLEN-ADAMS HE. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types[J]. *Current Microbiology*, 2015, 70(6): 792-800.
- [14] GONZÁLEZ L, CUADRILLERO AF, CASTRO JM, BERNARDO A, TORNADIJO ME. Selection of lactic acid bacteria isolated from San simón da Costa cheese (PDO) in order to develop an autochthonous starter culture[J]. *Advances in Microbiology*, 2015, 5(11): 748-759.
- [15] 朱莹丹, 萨如拉, 田文静, 岳林芳, 张和平, 王俊国. 乳酸菌在干酪生产中的应用[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(8): 195-204.
- ZHU YD, SARULA, TIAN WJ, YUE LF, ZHANG HP, WANG JG. The application of lactic acid bacteria in cheese-making[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(8): 195-204 (in Chinese).
- [16] THIERRY A, VALENCE F, DEUTSCH SM, EVEN S, FALENTIN H, Le LOIR Y, JAN G, GAGNAIRE V. Strain-to-strain differences within lactic and propionic acid bacteria species strongly impact the properties of cheese—a review[J]. *Dairy Science & Technology*, 2015, 95(6): 895-918.
- [17] HAMET MF, PIERMARIA JA, ABRAHAM AG. Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 63(1): 129-135.
- [18] BOCKELMANN W. Chapter 6. Secondary cheese starter cultures[M]//*Technology of Cheesemaking*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, 2010: 193-230.
- [19] IRLINGER F, YUNG SAYI, SARTHOU AS, DELBÈS-PAUS C, MONTEL MC, COTON E, COTON M, HELINCK S. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 153(3): 332-338.
- [20] 米其利, 李雪梅, 管莹, 高茜, 桂永发, 朱洲海, 天建华. 高通量测序在食品微生物生态学中的应用[J]. *食品科学*, 2016, 37(23): 302-308.
- MI QL, LI XM, GUAN Y, GAO Q, GUI YF, ZHU ZH, YAO JH. Application of high-throughput sequencing in food microbial ecology: a review[J]. *Food Science*, 2016, 37(23): 302-308 (in Chinese).
- [21] COCOLIN L, ALESSANDRIA V, DOLCI P, GORRA R, RANTSIOU K. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 167(1): 29-43.
- [22] TERESA P GONÇALVES M, BENITO MJ, de GUÍA CÓRDOBA M, EGAS C, MERCHÁN AV, GALVÁN AI, RUIZ-MOYANO S. Bacterial communities in Serpa cheese by culture dependent techniques, 16S rRNA gene sequencing and high-throughput sequencing analysis[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(5): 1333-1341.
- [23] 吴依繁, 张兰威, 韩雪. 乳酸菌分离培养基对粪便样品筛选能力的探究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(17): 5864-5870.
- WU YF, ZHANG LW, HAN X. Study on the screening capability of lactic acid bacteria isolation media for fecal samples[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(17): 5864-5870 (in Chinese).
- [24] 曹文海, 任国谱. 嗜热链球菌的检验培养基(M17)的改良[J]. *中国乳业*, 2006(1): 46-48.
- CAO WH, REN GP. Improvement of test medium (M17) for *Streptococcus thermophilus*[J]. *China Dairy*, 2006(1): 46-48 (in Chinese).
- [25] 西热娜依·阿布力克木. 南疆传统发酵酸奶微生物多样性及其乳酸菌生物被膜的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学硕士学位论文, 2016.
- Xirenayi·Ablikemu. Study on microbial diversity and

- lactic acid bacteria biofilm of traditional fermented yogurt in southern Xinjiang[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Normal University, 2016 (in Chinese).
- [26] 麦日艳古·亚生. 北疆传统发酵生奶酪(Suzme)中微生物多样性及乳酸菌益生特性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学硕士学位论文, 2021.
Mairiyangu·Yasheng. Study on microbial diversity and probiotic characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented raw cheese (suzme) in northern Xinjiang[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Normal University, 2021 (in Chinese).
- [27] 张敏, 张艳, 黄丽丽, 刘忆冬, 周红, 倪永清. 基于16S rDNA高通量测序方法比较新疆西北部地区乳品中微生物的多样性[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 27-33.
ZHANG M, ZHANG Y, HUANG LL, LIU YD, ZHOU H, NI YQ. Application of 16S rDNA high-throughput sequencing for comparative study of the microbial diversity of dairy products from western and northern Xinjiang, China[J]. Food Science, 2017, 38(20): 27-33 (in Chinese).
- [28] MURUGESAN S, REYES-MATA MP, NIRMALKAR K, CHAVEZ-CARBAJAL A, JUÁREZ-HERNÁNDEZ JI, TORRES-GÓMEZ RE, PIÑA-ESCOBEDO A, MAYA O, HOYO-VADILLO C, RAMOS-RAMÍREZ EG, ALFREDO SALAZAR-MONTOYA J, GARCÍA-MENA J. Profiling of bacterial and fungal communities of Mexican cheeses by high throughput DNA sequencing[J]. Food Research International, 2018, 113: 371-381.
- [29] 向书娅, 翟茹, 张海燕, 禹石磊, 潘琳. 不同地区发酵浆水中微生物群落结构比较及优势菌群的鉴定[J]. 现代食品科技, 2023, 39(3): 121-128.
XIANG SY, ZHAI R, ZHANG HY, YU SL, PAN L. Comparison of microbial community structure and identification of dominant microflora in fermented broth "Jiangshui" from different regions[J]. Modern Food Science & Technology, 2023, 39(3): 121-128 (in Chinese).
- [30] 陈泽斌, 李冰, 王定康, 余磊, 徐胜光, 任祺, 靳松, 戴丽君. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析玉米内生细菌多样性[J]. 现代食品科技, 2016, 32(2): 113-120.
CHEN ZB, LI B, WANG DK, YU L, XU SG, REN Z, JIN S, DAI LJ. Study on the diversity of endophytic bacteria in maize using illumina MiSeq high-throughput sequencing system[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(2): 113-120 (in Chinese).
- [31] DOMINGOS-LOPES MFP, STANTON C, ROSS PR, DAPKEVICIUS MLE, SILVA CCG. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. Food Microbiology, 2017, 63: 178-190.
- [32] 杨敬雨, 刘长虹. 中国传统酵子的工业化[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(2): 164-166.
YANG JY, LIU CH. Industrialization of Chinese traditional jiaozi[J]. Food Research and Development, 2007, 28(2): 164-166 (in Chinese).
- [33] 图尔荪阿依·图尔贡, 葛达娥, 潘建林, 付龙龙, 王荣, 努尔古丽·热合曼, 刘小莉. 香辣蟹中特征性腐败菌的分离鉴定以及香料的抑制作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 2539-2544.
Tursunay·Tuergong, GE DE, PAN JL, FU LL, WANG R, Nurgul·Rahman, LIU XL. Isolation and identification of specific spoilage bacteria in spicy crab and antibacterial evaluation of spices[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(9): 2539-2544 (in Chinese).
- [34] YU J, WANG HM, ZHA MS, QING YT, BAI N, REN Y, XI XX, LIU WJ, MENGHE BL, ZHANG HP. Molecular identification and quantification of lactic acid bacteria in traditional fermented dairy foods of Russia[J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(8): 5143-5154.
- [35] 胡斌, 田丰伟, 张灏, 陈卫. 植物乳杆菌脂肪酸构成与胆盐耐受性的相关性分析[J]. 中国食品学报, 2017, 17(9): 27-32.
HU B, TIAN FW, ZHANG H, CHEN W. Correlation analysis of the relationship between fatty acid composition and bile resistance in *Lactobacillus plantarum* strains[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(9): 27-32 (in Chinese).
- [36] 周晓莹, 陈晓琳. 乳酸菌的益生作用及其应用研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(10): 946-949.
ZHOU XY, CHEN XL. The beneficial function of Lactic acid bacteria and research progress in its application[J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(10): 946-949 (in Chinese).
- [37] GANESAN B, WEIMER BC. Amino acid catabolism and its relationship to cheese flavor outcomes[M]// Cheese. Amsterdam: Elsevier, 2017: 483-516.
- [38] 王春艳, 李宇辉, 李应彪, 李宝坤, 王腾斌, 石秀如. 新疆伊犁牧区传统手工奶酪中微生物多样性及其功能分析[J]. 食品科学, 2019, 40(24): 110-118.
WANG CY, LI YH, LI YB, LI BK, WANG TB, SHI XR. Microbial diversity and gene function analysis in traditional hand-made cheese from pastoral areas of Yili in Xinjiang[J]. Food Science, 2019, 40(24): 110-118 (in Chinese).

- [39] HOU QC, KWOK LY, ZHENG Y, WANG LF, GUO Z, ZHANG JC, HUANG WQ, WANG YX, LENG L, LI H, ZHANG HP. Differential fecal microbiota are retained in broiler chicken lines divergently selected for fatness traits[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37376.
- [40] PRAGYA P, KAUR G, ALI SA, BHATIL S, RAWAT P, LULE V, KUMAR S, MOHANTY AK, BEHARE P. High-resolution mass spectrometry-based global proteomic analysis of probiotic strains *Lactobacillus fermentum* NCDC 400 and RS2[J]. *Journal of Proteomics*, 2017, 152: 121-130.
- [41] 张雅卿, 叶书建, 周睿, 张晶, 刘双平. 发酵食品风味物质及其相关微生物[J]. *酿酒科技*, 2021(2): 85-96.
ZHANG YQ, YE SJ, ZHOU R, ZHANG J, LIU SP. Flavoring substances and related microorganisms of fermented food[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2021(2): 85-96 (in Chinese).
- [42] KOK J, van GIJTENBEEK LA, de JONG A, van der MEULEN SB, SOLOPOVA A, KUIPERS OP. The evolution of gene regulation research in *Lactococcus lactis*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(Supp 1): S220-S243.
- [43] 党娜, 刘逸群, 武岳, 史迪, 刘文俊, 孙天松. 布里亚特顿金斯克区发酵乳制品中乳酸菌分离鉴定[J]. *中国乳品工业*, 2021, 49(2): 24-27.
DANG N, LIU YQ, WU Y, SHI D, LIU WJ, SUN TS. Isolation and identification of lactic acid bacteria in fermented dairy products collected from the Dunkinsk district of Buryatia[J]. *China Dairy Industry*, 2021, 49(2): 24-27 (in Chinese).
- [44] JIN H, MO L, PAN L, HOU Q, LI C, DARIMA I, YU J. Using PacBio sequencing to investigate the bacterial microbiota of traditional Buryatian cottage cheese and comparison with Italian and Kazakhstan artisanal cheeses[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(8): 6885-6896.
- [45] MEDEIROS RS, ARAÚJO LM, QUEIROGA NETO V, ANDRADE PP, MELO MA, GONÇALVES MMBP. Identification of lactic acid bacteria isolated from artisanal Coalho cheese produced in the Brazilian Northeast[J]. *CyTA-Journal of Food*, 2016, 14(4): 613-620.
- [46] 蔡静静, 张亚川, 李谔, 张艳, 倪永清. 新疆伊犁地区乳制品中乳酸菌发酵和益生特性及其复合发酵方案优化[J]. *食品科学*, 2020, 41(18): 172-179.
CAI JJ, ZHANG YC, LI X, ZHANG Y, NI YQ. Fermentation and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Yili, Xinjiang and optimization of their mixtures for mixed-culture fermentation[J]. *Food Science*, 2020, 41(18): 172-179 (in Chinese).
- [47] 李丹丹. 西藏传统牦牛乳制品中抗氧化乳酸菌的筛选及发酵性能研究[D]. 拉萨: 西藏大学硕士学位论文, 2020.
LI DD. Screening and fermentation performance of antioxidant lactic acid bacteria from traditional yak dairy products in Xizang[D]. Lhasa: Master's Thesis of Tibet University, 2020 (in Chinese).
- [48] 张竞丰, 王丽, 陈洵, 谢会, 曹潇, 赵力超. 乳及乳制品中常见“活的非可培养态”食源致病菌研究进展[J]. *食品科学*, 2019, 40(3): 300-306.
ZHANG JF, WANG L, CHEN X, XIE H, CAO X, ZHAO LC. A review of viable but nonculturable pathogens in milk and dairy products[J]. *Food Science*, 2019, 40(3): 300-306 (in Chinese).
- [49] 李利军, 马英辉, 卢美欢. 微生物及其毒素在乳制品加工中的污染与控制[J]. *陕西农业科学*, 2016, 62(5): 72-75.
LI LJ, MA YH, LU MH. Pollution and control of microorganisms and their toxins in dairy products processing[J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 62(5): 72-75 (in Chinese).
- [50] 成美玉, 周海红. 乳酸菌在乳品行业的应用与展望[J]. *新农业*, 2020(23): 38-39.
CHENG MY, ZHOU HH. Application and prospect of lactic acid bacteria in dairy industry[J]. *Modern Agriculture*, 2020(23): 38-39 (in Chinese).