

高通量测序解析契达奶酪在加工过程中菌群结构多样性变化

孙蒙, 刘璐, 谭心, 王众, 王永顺, 李晓东, 张秀秀

High-throughput Sequencing to Analyze Changes in the Structural Diversity of the Flora of Cheddar Cheese during Processing

SUN Meng, LIU Lu, TAN Xin, WANG Zhong, WANG Yongshun, LI Xiaodong, and ZHANG Xiuxiu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023050345>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于传统培养和高通量测序方法分析羊肉加工过程中的菌群多样性

Analysis of Microbial Diversity in Mutton Processing Based on Traditional Culture and High-Throughput Sequencing

食品工业科技. 2020, 41(9): 95-101,107 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.015>

基于高通量测序分析刺梨果渣自然发酵过程中细菌群落结构及多样性

Bacterial Community Structure and Diversity during *Rosa roxburghii* Pomace Fermentation Based on High-throughput Sequencing Analysis

食品工业科技. 2019, 40(22): 110-114 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.020>

基于高通量测序分析四川辣椒酱自然发酵过程中细菌群落结构演替规律

Succession of Bacterial Community Structure during Sichuan Chili Sauce Natural Fermentation Analyzed by High-throughput Sequencing

食品工业科技. 2020, 41(24): 81-86 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020262>

基于高通量测序解析四川晒醋固态发酵过程中细菌群落变化

Analysis of Bacterial Community Changes in Sichuan Sun Vinegar Solid-state Fermentation Process Based on High-throughput Sequencing

食品工业科技. 2021, 42(19): 135-143 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030041>

基于高通量测序的江西特色发酵豆豉中微生物群落多样性及其特征分析

Diversity and Characteristics of Microbial Community in Fermented Douchi from Jiangxi Province Using High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2019, 40(3): 85-89,96 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.03.014>

基于高通量测序技术分析东北豆酱的微生物多样性

Analysis of Microbial Diversity of Northeast Soy Sauce Based on High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2020, 41(12): 100-105 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.12.016>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

孙蒙, 刘璐, 谭心, 等. 高通量测序解析契达奶酪在加工过程中菌群结构多样性变化 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(6): 161-168. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050345

SUN Meng, LIU Lu, TAN Xin, et al. High-throughput Sequencing to Analyze Changes in the Structural Diversity of the Flora of Cheddar Cheese during Processing[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(6): 161-168. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050345

· 生物工程 ·

高通量测序解析契达奶酪在加工过程中菌群结构多样性变化

孙蒙^{1,2}, 刘璐^{1,2,3}, 谭心^{1,2}, 王众^{1,2}, 王永顺^{1,2}, 李晓东^{1,2,*}, 张秀秀^{1,2,*}

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030;

2. 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030;

3. 国家乳业技术创新中心, 内蒙古呼和浩特 010000)

摘要: 为明确契达奶酪加工过程中的菌群结构, 本研究采用高通量测序技术分析契达奶酪在加工过程中 (巴氏杀菌后、凝乳和成熟 0、30、60 和 90 d) 三个阶段的菌群结构。结果表明, 契达奶酪加工过程中各阶段微生物群落结构差异较大。巴氏杀菌后, 微生物群落多样性和丰度均为最高 (Chao1 和 Shannon 指数平均值分别为 6.09 和 1415.78); 在属水平上, 巴氏杀菌后的优势菌群为寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*, 21.04%), 在凝乳和成熟阶段菌群结构比较相似, 乳球菌属 (*Lactococcus*) 为两阶段的绝对优势菌群, 丰度平均值达 85% 以上; 在成熟期内, 乳球菌属的相对丰度呈先上升后下降的趋势; 巴氏杀菌后的奶酪体系中菌群结构与其他组相比差异较大, 并且随着成熟期的延长, 各组菌群结构变化较小。该研究为明确契达奶酪菌群结构提供依据, 对契达奶酪的微生物组信息扩充具有参考价值。

关键词: 契达奶酪, 加工, 高通量测序, 菌群结构

中图分类号: TS252.53

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)06-0161-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050345

本文网刊:



High-throughput Sequencing to Analyze Changes in the Structural Diversity of the Flora of Cheddar Cheese during Processing

SUN Meng^{1,2}, LIU Lu^{1,2,3}, TAN Xin^{1,2}, WANG Zhong^{1,2}, WANG Yongshun^{1,2}, LI Xiaodong^{1,2,*}, ZHANG Xiuxiu^{1,2,*}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Harbin 150030, China;

3. National Center of Technology Innovation for Dairy, Hohhot 010000, China)

Abstract: In order to clarify the microflora structure in Cheddar cheese processing, MiSeq high-throughput sequencing technology was used to analyze the community structure of Cheddar cheese at three stages of processing (post-pasteurization, curdling, and ripening 0, 30, 60 and 90 d) in this study. The results showed that the community structure varies widely of cheddar cheese during processing. The highest microbial community diversity and abundance were found after pasteurization (Chao1 index and Shannon index mean values were 6.09 and 1415.78, respectively). The dominant microflora in the pasteurization stage at the genus level was *Stenotrophomonas* (21.04%). The community structure was relatively similar in the curd and ripening stages, *Lactococcus* were the dominant flora in both stages, with abundance averaging more than 85%. During the ripening period, the relative abundance of *Lactococcus* increased first and then

收稿日期: 2023-05-31

基金项目: 国家乳业技术创新中心创建重点项目课题 (2021-国家乳创中心-09)。

作者简介: 孙蒙 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 1394169567@qq.com。

* 通信作者: 李晓东 (1968-) (ORCID: 0000-0003-2348-926X), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: hrblxd@163.com。

张秀秀 (1991-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品科学, E-mail: zhangxiuxiu4284@163.com。

decreased. The community structure in the pasteurized cheeses was different compared to the other groups, and there was less change in the community structure of the groups during the ripening period. This study provides a basis for clarifying the community structure of Cheddar cheese, and has a certain reference value for the expansion of Cheddar cheese microbiome information.

Key words: Cheddar cheese; process; high-throughput sequencing; flora structure

奶酪是一种含有丰富蛋白质、脂肪及全部必需氨基酸、多种维生素和矿物质的高营养乳制品。国际上将其划分为天然奶酪、再制奶酪和奶酪食品三大类。其中契达奶酪口味是最为温和清淡的一种天然奶酪品种,备受我国消费者喜爱,也是我国进口数量最多的奶酪品种^[1]。

契达奶酪的加工过程主要包括原料乳巴氏杀菌、发酵、凝乳、排乳清、契达化和加盐等。此外,契达奶酪是一种成熟型奶酪,需要在一定温度和湿度条件下进行较长时间的成熟才能形成成品。其成熟过程涉及到一系列的化学反应,包括糖酵解、脂解分解和蛋白质水解等一系列的生物化学和微生物学反应,所以对奶酪加工和成熟过程中菌群结构进行测定是必要的。Zhang等^[2]综合代谢组学和高通量测序对内蒙古传统奶酪加工过程中微生物群落演替与风味代谢物之间的动态相关性进行研究,发现其加工过程中微生物群落结构复杂影响着其风味物质的形成。Penland等^[3]对P'elardon奶酪成熟过程中不同时期的样品微生物多样性进行研究,发现副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和青霉菌(*Penicillium*)等微生物为优势菌群。Hao等^[4]发现在契达奶酪成熟过程中添加益生菌更有可能促进更多生物活性肽产生,比如:血管紧张酶抑制剂(Angiotensin-converting enzyme inhibitor)。Tamang等^[5]对奶酪等发酵乳制品中的微生物的功能特性进行总结综述,阐明了其对人体健康的积极作用。由此可见,在奶酪的加工和成熟过程中,体系中微生物参与多种生化代谢反应,产生多样化的代谢产物,影响奶酪的最终品质与营养^[6]。

传统的奶酪微生物研究通常采用分离培养等方法,如变性梯度凝胶电泳^[7](Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE)和时相温度梯度凝胶电泳^[8](Polymerase Chain Reaction-Temporal Temperature Gradient Electrophoresis, PCR-TTGE)等,对于传统发酵食品多菌种的复杂体系,难以快速、全面地分析微生物群落的真实结构。Hermet等^[9]采用SSCP分析了36种奶酪表面微生物,发现了传统的分子生物学技术对奶酪整体微生物群落分析鉴定的局限。高通量测序技术(High-throughput sequencing)即下一代测序技术,可一次性对样品中的几十万到几百万条DNA分子进行序列测定^[10]。它解决了PCR-TTGE、和PCR-DGGE等传统方法的局限^[11],可快速确定样品中微生物的种类和丰度,具有分析全面、灵敏、快

速等特点,能够更客观地反映样品中微生物群落结构的真实情况^[12-13]。近年来,高通量测序技术已广泛应用于传统发酵食品的微生物群落的宏基因组研究中^[14],Silvetti等^[15]利用高通量测序技术对Silter干酪成熟过程中的菌群结构进行测定。Camargo等^[16]利用高通量测序技术对“Entre Serras”手工奶酪成熟过程中的微生物变化进行监测。高通量测序技术在探索微生物群落方面的广泛应用大大增加了人们对奶酪等传统发酵食品的认知^[17],目前主要的研究方向集中在外源添加益生菌对奶酪菌群结构的影响,例如,Hanlon等^[18]研究了在契达干酪制作过程中添加益生元,对其体系内菌群结构以及理化性质的影响。Vinderola等^[19]将不同益生菌株加入乳制品中,对乳酸菌和益生菌之间的相互作用进行了探究,但目前利用高通量测序对无外源物质添加的天然奶酪在加工和成熟过程中的研究较少。

本文采用高通量测序技术监控契达奶酪加工过程中巴氏杀菌后、凝乳以及成熟三个阶段中微生物菌群结构的变化及其演替规律,其中成熟阶段周期较长,故在成熟期内分别选取成熟0、30、60、90 d共4组样本进行微生物复杂度分析,并从不同分类水平下分析加工过程中三个阶段契达奶酪的优势菌群,以为功能性奶酪的开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

生牛乳 黑龙江龙丹乳业科技股份有限公司;氯化钙 食品级,天津市凯通化学试剂有限公司;凝乳酶 山东悠乐滋生物科技有限公司;商业发酵剂乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) 美国科汉森公司;Power Soil DNA分离试剂盒 美国AXYGEN公司。

SYQ-DSX-280B手提式高压灭菌锅 上海申安医疗器械厂;CH-35干酪槽 黑龙江赫益乳业科技有限公司;HYCV-6小型干酪压榨器 黑龙江赫益乳业科技有限公司;14890真空包装机 得力集团有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 契达奶酪的加工 契达干酪的加工参照Hannon等^[20]的方法并部分修改,具体加工过程如图1所示。添加0.01%(w/w)乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)和乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)。选用巴氏

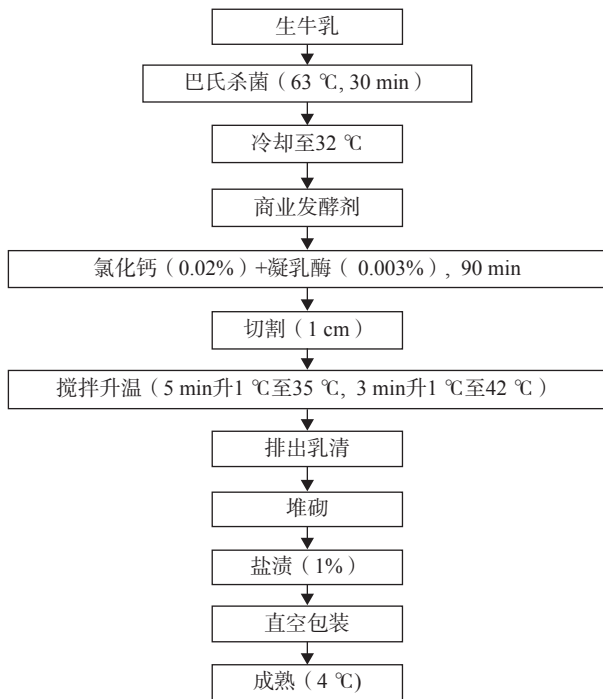


图 1 契达奶酪的加工流程

Fig.1 Processing procedure of Cheddar cheese

杀菌后 (F_milk)、凝乳阶段 (Curd)、成熟阶段 (Ch_0、Ch_30、Ch_60、Ch_90 分别代表成熟 0、30、60、90 d) 的契达干酪样本, 编号 A、B、C、D、E、F 共 6 组, 每组样本取五份, 共计 30 份样本。

1.2.2 DNA 的提取 对上述六组契达奶酪进行 DNA 的提取, 使用 Power Soil DNA 分离试剂盒, 按照说明书提取。用 1% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度法进行 DNA 质量和浓度检测。质检合格的样本储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以备后续试验使用。

1.2.3 PCR 扩增和测序 首先将契达奶酪的 DNA 用特异引物对 16S rDNA 的 V3-V4^[21] 进行扩增。引物序列为: 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) 和 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT)。在上游和下游引物的 5' 末端各添加 8 bp 条形码序列, 以区分不同的样本。PCR 的扩增体系为 25 μL : 5 μL DNA (加入的 DNA 总量为 30 ng)、1 μL Forward Primer (5 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL Reverse Primer (5 $\mu\text{mol/L}$)、3 μL BSA 试剂、12.5 μL 2 \times Taq Plus Master Mix (DNA 聚合酶、2 ng/ μL)、加无菌双蒸水定容到 25 μL 。

在 PCR 仪上于 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 使模板 DNA 充分变性, 然后进入扩增循环。在每一个循环中, 先于 94 $^{\circ}\text{C}$ 保持 30 s 使模板变性, 然后将温度降到 50 $^{\circ}\text{C}$, 保持 30 s, 使引物与模板充分退火; 在 72 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min, 使引物在模板上延伸, 合成 DNA, 完成一个循环。重复循环 30 次, 使扩增的 DNA 片段大量累积。最后, 在 72 $^{\circ}\text{C}$ 保持 7 min, 使产物延伸完整, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

对 PCR 扩增产物进行纯化、回收及定量处理。然后接测序接头, 构建 Miseq 文库, 最后上机测序。

本试验委托北京奥维森基因科技有限公司进行高通量测序及原始数据的初级处理。PCR 产物用于构建微生物多样性测序文库, 用 Illumina Miseq PE300 高通量测序平台进行测序, 测序原始序列上传至 NCBI 数据中心建立的 SRA (Sequence Read Archive, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra>) 数据库。

1.3 数据处理

高通量测序完成后, 进行数据分析和序列优化^[22]。下机数据经过 QIIME1 (v1.8.0) 软件^[23], 根据 Barcode 序列拆分样本, 使用 Pear (v0.9.6) 软件对数据进行过滤、拼接。去除打分低值于 20, 含有模糊碱基, 引物错配序列。拼接后使用 Vsearch (v2.7.1) 软件去除长度小于 230 bp 的序列, 并根据 Gold Database 数据库用 uchime 方法比对去除嵌合体序列。为了确保所有样本的覆盖率都相当高, 把所有样本的数据量均一化至 XXXX 条序列。利用 Qiime 和 Vsearch (v2.7.1), 将 OTU (97% 相似水平下) 进行生物信息统计分析。

2 结果与分析

2.1 契达奶酪微生物群落 Alpha 多样性分析

Alpha 反映单个奶酪样品内部物种的多样性, 如表 1 所示, 本实验中所有奶酪样品的 Coverage ≥ 0.986 , 表明本实验的测序数据能够覆盖样品中的微生物种类, 可以较为真实地反映奶酪样品中物种丰度及多样性, 测序结果的有效性较高^[24]。图 2 所示, 稀释性曲线随着测序深度的增加而逐渐趋于平坦, 表明本实验测序深度较好, 测序数据量合理, 能够反映契达奶酪的微生物群落组成^[25]。

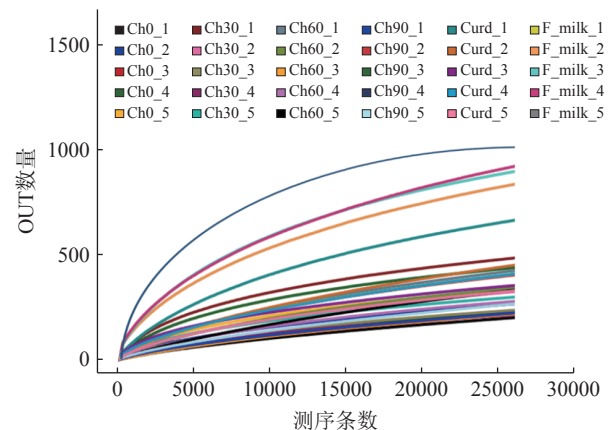


图 2 稀释性曲线

Fig.2 Rarefaction curves

采用 α 多样性指标的 Shannon 指数、Simpson 指数与 Chao1 指数分别对六组样品微生物物种丰富度和多样性进行评估。Shannon 指数和 Simpson 指数反映该组微生物群落多样性和物种分布情况。其中, Shannon 指数常用来评价微生物群落的物种多样性, 对样品中的微生物群落物种丰富度更为敏感, 指数越大代表样品中的微生物多样性越高, Chao1 指数反映该组微生物丰度, 指数越大代表样品中的微生

表1 契达奶酪微生物群落丰度和多样性

Table 1 Microbial community abundance and diversity of Cheddar cheese

组别	样本	Coverage	Shannon	Simpson	Chao1
A组	F-milk-1	0.992	8.517	0.991	1599.573
	F-milk-2	0.987	5.2	0.931	1240.551
	F-milk-3	0.988	4.891	0.904	1277.736
	F-milk-4	0.986	5.195	0.909	1438.525
	F-milk-5	0.993	6.642	0.962	1522.493
B组	Curd-1	0.9896	0.255	0.203	1054.526
	Curd-2	0.991	1.367	0.22	815.368
	Curd-3	0.994	1.231	0.261	557.246
	Curd-4	0.992	1.475	0.275	764.137
	Curd-5	0.993	1.377	0.136	643.962
C组	Ch0-1	0.995	0.809	0.036	500.637
	Ch0-2	0.995	0.688	0.114	568.529
	Ch0-3	0.995	0.382	0.062	577.903
	Ch0-4	0.995	0.557	0.104	506
	Ch0-5	0.994	0.816	0.125	555.375
D组	Ch30-1	0.993	1.403	0.219	733.538
	Ch30-2	0.994	0.737	0.115	622.3
	Ch30-3	0.995	0.565	0.096	436.716
	Ch30-4	0.996	0.567	0.106	353.171
	Ch30-5	0.995	1.004	0.174	519.521
E组	Ch60-1	0.992	0.768	0.116	740.5
	Ch60-2	0.994	0.714	0.116	584.662
	Ch60-3	0.995	0.254	0.035	479.122
	Ch60-4	0.994	0.515	0.078	545.838
	Ch60-5	0.992	0.498	0.077	803.5
F组	Ch90-1	0.995	0.357	0.053	577
	Ch90-2	0.992	0.821	0.124	711.02
	Ch90-3	0.993	1.152	0.178	667.233
	Ch90-4	0.992	0.839	0.128	879.55
	Ch90-5	0.993	0.501	0.083	691.077

物丰度越高^[26]。契达奶酪在加工和成熟过程中微生物群落多样性和物种丰富度变化如表1所示。结果表明, A组内样品 Chao1 指数和 Shannon 指数的平均值均最高, 即微生物群落多样性和丰度平均值均为最高, 多样性指数平均值为 6.09 ± 1.52 , 丰度指数平均值为 1415.78 ± 154.47 , 而在 E 组微生物群落多样性最低, 指数平均值为 0.55 ± 0.20 ; C 组微生物群落丰度最低, 指数平均值为 541.69 ± 35.98 。B 组内样品 Chao1 指数差异大, 变化范围为 $557.25 \sim 1054.53$, 平均值为 767.05 ± 189.84 。成熟初期(D 组)组内样品 Chao1 指数平均值为 533.05 ± 149.98 , 成熟中期(E 组)和成熟后期(F 组) Chao1 指数平均值分别为 630.72 ± 136.21 和 705.18 ± 110.12 , 物种丰度呈现上升的趋势, 但上升幅度明显降低, 表明成熟过程中样品内的微生物正在逐渐适应生长环境, 丰度最终有趋于稳定的可能。成熟过程中, Shannon 指数平均值分别为 0.86 ± 0.35 、 0.55 ± 0.20 和 0.73 ± 0.31 , 表明契达奶酪成熟过程微生物群落多样性呈先下降后上升的趋势。

2.2 契达奶酪 OTU 分布的花瓣图分析

OTUs(Operational Taxonomic Units)是对奶酪样品中的序列进行归类操作(cluster), 一般情况下, 将相似性高于 97% 的不同 16S rDNA 序列定义为一

个 OTU, 每一个 OTU 通常被视为一个微生物物种^[27]。根据 OTUs 聚类分析结果绘制花瓣图(图3)。花瓣图是一种表示样本/组间特有和共有 OTU 数目的展示方式, 每个花瓣代表一组样品, core 数字代表每组共有 OTU 数目, 每个花瓣上的数字代表该组特有的 OTU 数目。由图可知, 契达奶酪样品共有 OTU 数量为 16 个, 其中具体各组样品平均 OTU 数目分别为: 巴氏杀菌后(F_milk): (1458 个; 854 个; 914 个, 942 个; 1258 个)、凝乳阶段(Curd): (681 个; 465 个; 364 个; 422 个; 340 个)、成熟 0 d(Ch_0): (210 个; 276 个; 227 个; 242 个; 345 个)、成熟 30 d(Ch_30): (496 个; 335 个; 245 个; 220 个; 308 个)、成熟 60 d(Ch_60): (437 个; 353 个; 228 个; 288 个; 346 个)、成熟 90 d(Ch_90): (233 个; 416 个; 449 个; 422 个; 278 个)。花瓣图结果表明: 在所测样本内, 巴氏杀菌后的菌群种类最为丰富, 在凝乳阶段其菌群种类丰度逐渐下降, 随着成熟时间的延长, 奶酪体系内的菌群种类丰富度逐渐增加, 到成熟末期, 契达奶酪的特有 OTU 数大于成熟初期, 说明成熟末期, 契达奶酪体系中菌群种类较成熟初期更加丰富。

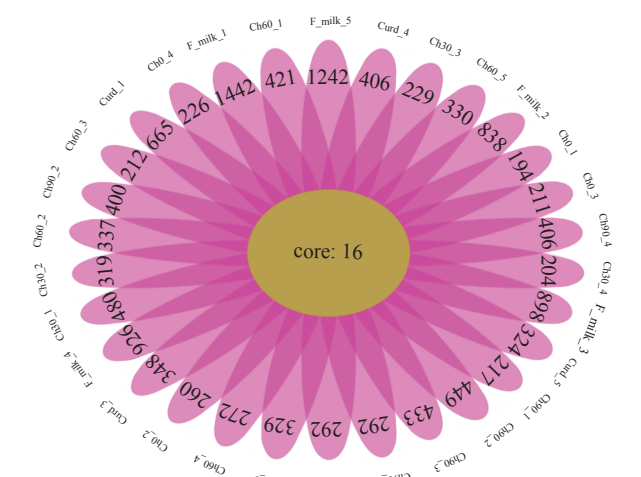


图3 契达奶酪 OTUs 数量花瓣图

Fig.3 Petal diagram of Cheddar cheese OTUs number
注: core 数字代表每组共有 OTU 数目, 每个花瓣上的数字代表该组特有的 OTU 数目, 字母代表各阶段样本组别编号: 巴氏杀菌后(F_milk)、凝乳阶段(Curd)、成熟阶段(Ch_0、Ch_30、Ch_60、Ch_90/成熟 0、30、60、90 d)。

2.3 不同水平上契达奶酪菌群结构分析

将各组契达奶酪样品中得到的 OTUs 序列从门和属 2 个水平进行物种注释, 得到每个 OTU 在不同分类水平的物种分类信息, 观测样本在不同分类水平上的群落结构。将多个样本的群落结构分析放在一起, 观测其变化情况。用柱状图可视化观察不同分组的物种组成情况可以看到不同水平上物种的相对丰度, 如图4所示。

在门水平对契达奶酪中的菌群结构进行分析, 结果如图4A所示。变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)为巴氏

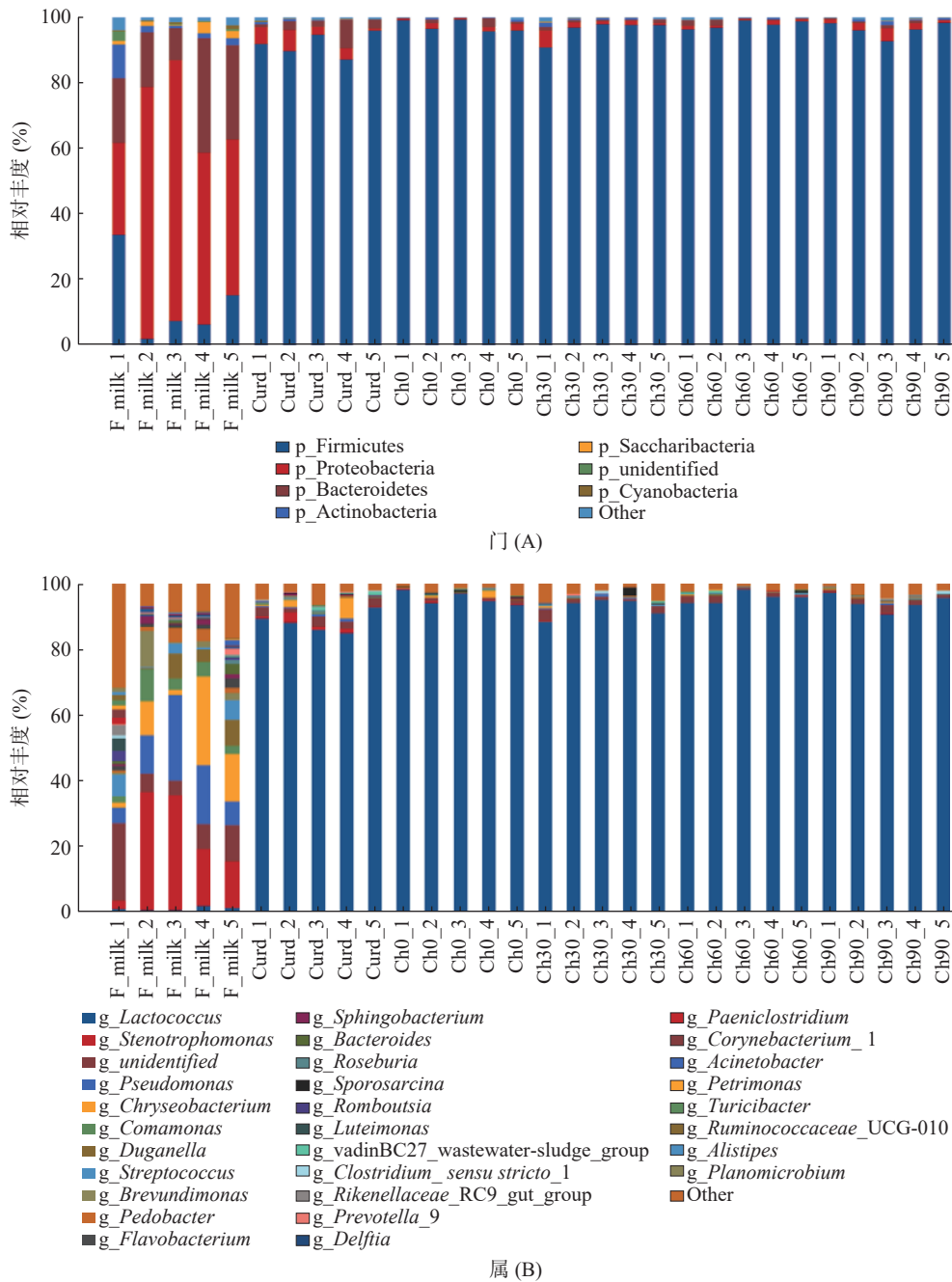


图 4 契达干酪中不同水平上物种的相对丰度

Fig.4 Relative species abundance of microbial at various levels in cheese

注: A: 门; B: 属; 横坐标为物种在样本中的相对丰度, 纵坐标为样本名称。

杀菌后样品的优势菌门, 其相对丰度均值之和达到 91.77%, 其中变形菌门(Proteobacteria)为该组内的绝对优势菌门, 其相对丰度均值达到 56.80%, 而在其余五组中变形菌门的相对丰度分别为 3.58%、1.16%、1.90%、0.78%、0.20%, 这可能是由于变形菌门的大部分细菌为好氧型, 不能适应契达奶酪发酵过程中缺氧、产酸的环境, 因而在发酵后的凝乳阶段以及成熟阶段其丰度迅速大幅度降低。除巴氏杀菌后期的样品以外, 其余样品中厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria)均为各组样品中的优势菌门, 其中厚壁菌门(Firmicutes)为契达奶酪成熟阶段的绝对优势菌门,

成熟阶段四组样品相对丰度均值均达到 96% 以上, 并且整个成熟过程中, 其相对丰度变化不大趋于稳定。可见, 契达奶酪制作过程中各阶段的优势菌门存在明显差异, 巴氏杀菌后的优势菌门与原料奶中大体一致, 主要由厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria)构成。然而在凝乳步骤之后, 厚壁菌门(Firmicutes)则表现为绝对优势菌门, 此外还有少量的变形菌门(Proteobacteria), 这与 Aldrete 等^[17]对墨西哥 Poro 奶酪制作过程中菌群结构的研究一致。

图 4B 显示了在属水平上对契达奶酪的菌群结构的分析结果, 可以明显看出巴氏杀菌后契达奶酪体

系内的菌属展现着高度的多样性,已鉴定出来的菌属就有 20 余种。而在凝乳和成熟两阶段中的多样性明显降低,这与张敏等^[28]对乳制品微生物多样性的总结综述一致,这是由于原料奶发酵后的奶酪中,乳酸菌发酵乳糖产酸形成的生态位和资源竞争优势,将不利于其余大部分微生物的生长,使乳酸菌成为各种发酵乳品中的优势菌群。其中巴氏杀菌后契达奶酪中的优势菌群为金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*),相对丰度均值分别为 11.07% 和 21.04%。而在奶酪凝乳和成熟两阶段中,乳球菌属(*Lactococcus*)则为绝对优势菌群,并且在成熟期间,其相对丰度呈先上升后下降的趋势,丰度均值均达 92% 以上,这与曾椿淋^[29]的研究结果一致。在巴氏杀菌后的契达奶酪中还发现了假单胞菌属(*Pseudomonas*)的存在,但在凝乳和成熟阶段中均未检测到,这可能是由于发酵后的高酸性环境不利于其生长繁殖。契达奶酪中存在的乳球菌属(*Lactococcus*)和部分酵母菌有着促进乳品发酵的功能,而假单胞菌属(*Pseudomonas*)的存在则会造成乳制品的腐败变质,给产品带来安全隐患^[28]。此外,较高含量的乳球菌属(*Lactococcus*)的存在可能是由于在契达干酪发酵阶段加入了乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)和乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*),说明在奶酪中最主要的微生物是发酵剂微生物。Choi 等^[30]的研究也表明奶酪微生物群落的组成在很大程度上取决于所使用的发酵剂种类。但是在凝乳阶段和成熟阶段的样品中仍然发现了相对丰度较高的寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*),说明不能仅仅只关注奶酪中已知占优势的乳酸菌类发酵剂微生物,也要对这些之前未被关注但数量不少的其他微生物进行研究。

2.4 契达奶酪 Beta 多样性分析

Beta 多样性分析是对两组干酪样本微生物群落构成的差异。本研究采用 PCA(Principal Component Analysis)分析和 NMDS(Non-metric Multidimensional Scaling)两种方式分析比较契达奶酪加工阶段的样本群落构成差异。PCA 分析,即主成分分析,通过降维处理,把多维数据作图,直观每组样本间群落构成的相似性^[31]。NMDS 分析同样是通过降维处理,研究不同组样本间群落构成的相似情况^[32]。通过点与点的距离表现在图中,两点之间的距离越远,表明两个样品中微生物群落的差异越大^[33],结果如图 5A、B 所示。

图 5A 所示, A 组内五份样品分布较为分散,说明灭菌阶段的契达奶酪体系中菌群组成存在差异,而其余五组内样品分布较为集中,并且成熟阶段的四组样品分布十分集中,说明凝乳阶段和成熟阶段的契达奶酪体系中各组内菌群组成较相似,成熟阶段各组菌群结构存在高度相似。图 5B 所示,对群落测序结果

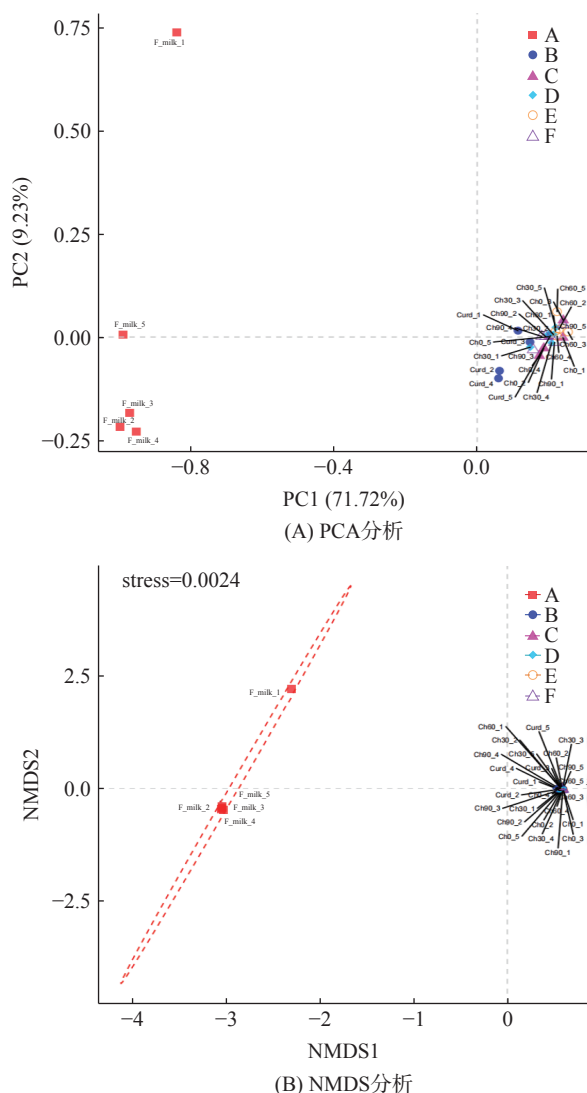


图 5 Beta 多样性分析

Fig.5 Beta diversity analysis

进行排序分析,其 stress 值为 0.0024<0.1,排序结果良好。A 组与其它五组的契达干酪均不存在重合现象,且相距较远,说明灭菌阶段的奶酪体系中菌群结构与凝乳和成熟阶段相比差异较大,综合 α 多样性和菌群结构分析可知,此种差异主要来源于细菌相对丰度的改变,可能是由于灭菌后的原料乳在发酵过程中产生的酸类及醇类等物质的累积,不利于某些微生物的生长繁殖,引起微生物总体丰度下降,导致发酵后取样的凝乳阶段以及成熟阶段内菌群结构与灭菌阶段相比具有明显差异。另外,在不同成熟阶段各组样品之间都存在明显重叠部分,相距很近,说明成熟期的延长对其菌群结构影响较小,这可能是由于成熟过程中微生物已经逐渐适应了当前的生长环境,因此各组内菌群结构稳定而呈现明显的相似性。

3 结论

本研究采用高通量测序分析契达奶酪加工过程中菌群变化情况,发现契达奶酪加工各阶段微生物群落结构差异较大。巴氏杀菌后的优势菌门为厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门,而在凝乳后,厚壁菌门则

表现为绝对优势菌门,此外还存在少量的变形菌门。在属水平上,巴氏杀菌后契达奶酪体系内菌属体现出高度的多样性,而在凝乳和成熟两阶段多样性明显降低。巴氏杀菌后优势菌群为寡养单胞菌属,凝乳和成熟阶段菌群结构相似,乳球菌属为两阶段的绝对优势菌群。同时 Beta 多样性分析结果也表明巴氏杀菌后奶酪体系中的菌群结构与另外两阶段相比差异较大,成熟期的延长对菌群结构影响较小。本研究通过高通量测序技术监控契达奶酪加工过程中微生物菌群结构的变化,不仅可以锚定优势菌种,还将为契达奶酪体系内的微生态结构调控奠定理论基础,为探究添加外源物质对契达奶酪加工过程中原本菌群结构的影响提供对照参考,但本研究仅在属水平上对菌种进行鉴定,之后拟采用全基因组测序技术在种水平对其进行进一步分析。

参考文献

- [1] 干佳俪,谭励,王蓓,等. 切达奶酪挥发性特征风味物质的多典型相关融合分析[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(9): 12-18,27. [GAN Jiali, TAN Li, WANG Bei, et al. Identification of volatile flavor characteristics of Cheddar cheese with Multi-CCA Fusion[J]. China Dairy Industry, 2021, 49(9): 12-18,27.]
- [2] ZHANG X, ZHENG Y R, FENG J, et al. Integrated metabolomics and high-throughput sequencing to explore the dynamic correlations between flavor related metabolites and bacterial succession in the process of Mongolian cheese production[J]. *Food Research International*, 2022, 160: 111672.
- [3] PENLAND M, FALENTIN H, PARAYRE S, et al. Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 345: 109130.
- [4] HAO Xinyue, XIA Yu, WANG Yuxin, et al. The addition of probiotic promotes the release of ACE-I peptide of Cheddar cheese: Peptide profile and molecular docking[J]. *International Dairy Journal*, 2023, 137: 105507.
- [5] TAMANG J P, SHIN D H, JUNG S J, et al. Functional properties of microorganisms in fermented foods[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 578.
- [6] SAIDI V, SHEIKH-ZEINODDIN M, KOBARFARD F, et al. Profiling of bioactive metabolites during the ripening of a semi-hard non-starter culture cheese to detect functional dietary neurotransmitters[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 28: 101734.
- [7] DIMITRAKOPOULOU M E, PANTELELI E, VANTARAKIS A. Improved PCR-DGGE analysis by emulsion-PCR for the determination of food geographical origin: A case study on Greek PDO “avgotaracho Mesolonghiou” [J]. *Current Research in Food Science*, 2021, 4: 746-751.
- [8] 董晓婉,李宝坤,李开雄,等. 新疆蒙古族和哈萨克族传统乳制品中乳酸菌多样性的比较[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 162-166. [DONG Xiaowan, LI Baokun, LI Kaixiong, et al. Diversified comparison of lactic acid bacteria from traditional dairy products in Mongolian and Kazakh in Xinjiang[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(21): 162-166.]
- [9] HERMET A, MOUNIER J, KERAVEC M, et al. Application of capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis for identification of fungal communities in cheese[J]. *Food Microbiology*, 2014, 41: 82-90.
- [10] SHENDURE J, BALASUBRAMANIAN S, CHURCH G M, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future[J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 345-353.
- [11] WANG X H, WANG S H, ZHAO H. Unraveling microbial community diversity and succession of Chinese Sichuan sausages during spontaneous fermentation by high-throughput sequencing[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(7): 3254-3263.
- [12] YUN J M, ZHAO F Q, ZHANG W W, et al. Monitoring the microbial community succession and diversity of Liangzhou fumigated vinegar during solid-state fermentation with next-generation sequencing[J]. *Annals of Microbiology*, 2019, 69(3): 279-289.
- [13] 熊香元,张立钊,陈力力,等. 米粉发酵过程中乳酸菌多样性及功能分析[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 85-91. [XIONG Xianguan, ZHANG Lizhao, CHEN Lili, et al. Analysis of the diversity and function of lactic acid bacteria in fermented rice noodles during fermentation[J]. *Food Science*, 2020, 41(18): 85-91.]
- [14] LIU A Q, YANG X, GUO Q Y, et al. Microbial communities and flavor compounds during the fermentation of traditional hong qu glutinous rice wine[J]. *Foods*, 2022, 11(8): 1097.
- [15] SILVETTI T, CAPRA E, MORANDI S, et al. Microbial population profile during ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Silter cheese, produced with and without autochthonous starter culture[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 84: 821-831.
- [16] CAMARGO A C, COSTA E A, FUSIEGER A, et al. Microbial shifts through the ripening of the “Entre Serras” Minas artisanal cheese monitored by high-throughput sequencing[J]. *Food Research International*, 2021, 139: 109803.
- [17] ALDRETE T A, ESCOBAR R M C, TAMPLIN M L, et al. High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese[J]. *Food Microbiology*, 2014, 44: 136-141.
- [18] HANLON M, CHOI J, GODDIK L et al. Microbial and chemical composition of Cheddar cheese supplemented with prebiotics from pasteurized milk to aging[J]. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(3): 2058-2068.
- [19] VINDEROLA C G, MOCCHIUTTI P, REINHEIMER J A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products[J]. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85(4): 721-729.
- [20] HANNON J A, WILKINSON M G, DELAHUNTY C M, et al. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese[J]. *International Dairy Journal*, 2003, 13(4): 313-323.
- [21] CLAESSEON M J, O'SULLIVAN O, WANG Q, et al. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6669.
- [22] 吴树坤,谢军,卫春会,等. 四川不同地区浓香型大曲微生物群落结构比较[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 144-152. [WU S K, XIE J, WEI C H, et al. Comparison of microbial structure of starter cultures (Daqu) for Luzhou flavor liquor in different regions of Sichuan[J]. *Food Science*, 2019, 40(14): 144-152.]
- [23] BOLYEN E, RIDEOUT J R, DILLON M R, et al. Author correction: Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(9): 1091.
- [24] 贾曼,杨絮,周国燕,等. 高通量测序分析黄酒糟制香糟自然

- 发酵过程中微生物群落多样性[J/OL]. 食品科学, 1-11 [2022-11-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220819.0914.018.html>. [JIA Man, YANG Xu, ZHOU Guoyan, et al. Microbial community diversity analysis during spontaneous fermentation of aromatic lees made from huang jiu (yellow rice wine) lees by high-throughput sequencin[J/OL]. Food Science, 1-11 [2022-11-16].]
- [25] 王泽晗, 陶昱豪, 孙黎明, 等. 苗族酸酢鱼发酵过程中微生物群落、氨基酸及水分动态变化规律[J]. 食品科学, 2021, 42(12): 116-122. [WANG Zehan, TAO Yuhao, SUN Liming, et al. Dynamic changes of microbial community, amino acid composition and moisture distribution during the fermentation of miao ethnic Suanzuo Fish[J]. Food Science, 2021, 42(12): 116-122.]
- [26] ROSWELL M, DUSHOFF J, WINFREE R, et al. A conceptual guide to measuring species diversity[J]. *Oikos*, 2021, 130(3): 321-338.
- [27] 陈申习, 宿智新, 张磊, 等. 基于高通量测序的清香型和酱香型酒曲真菌群落特征研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 5. [CHEN Shenxi, SU Zhixin, ZHANG Lei, et al. Fungal community characteristics of light-flavor and sauce-flavor Jiuqu based on high throughput sequencing[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 5.]
- [28] 张敏, 张艳, 兰国伟, 等. 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 Min, ZHANG Yan, LAN Guowei, et al. Review of high-throughput sequencing technology in microbial diversity of dairy product[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2016, 32(32): 48-52.]
- [29] 曾椿淋. 内蒙古手工奶酪微生物多样性和功能性研究[D]. 南京: 江苏大学, 2020. [ZENG Chunlin. Studies on the microbial diversity and functionality of microbes of inner mongolia handmade cheese[D]. Nanjing: Jiangsu University, 2020.]
- [30] CHOI J, LEE S I, RACKERBY B, et al. Microbial communities of a variety of cheeses and comparison between core and rind region of cheeses[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(5): 4026-4042.
- [31] WANG Y, SHENG H F, HE Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8264.
- [32] NOVEAL R M, BURTON O T, WISE P, et al. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013, 131(1): 201-212.
- [33] 张敏, 张艳, 黄丽丽, 等. 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 Min, ZHANG Yan, HUANG Lili, et al. 16S rDNA high-throughput sequencing-based methods to compare the microbial diversity in dairy products of the western and northern part of Xinjiang, China[J]. Food Science, 2017, 38(20): 27-33.]