

喀什帕米尔高原牦牛乳传统发酵生奶酪中微生物多样性及分子鉴定

伊力米热·热夏提, 努尔古丽·热合曼*, 古丽皮艳·托乎提, 地力呼马尔·阿布都许库
(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 乌鲁木齐 830054)

摘要 目的:研究喀什帕米尔高原塔县地区传统牦牛乳发酵生奶酪中微生物的多样性和菌群结构。方法:从帕米尔高原区不同牧民家庭中采集 6 份生奶酪样品,采用高通量测序技术分析其微生物多样性。通过纯培养方法分离传统牦牛乳发酵生奶酪样品中的菌种,采用传统分类与 16S rDNA 序列测定和 26S rDNA D1/D2 间隔区序列测定方法对分离的细菌和酵母菌进行种属鉴定。结果:通过细菌的 16S rDNA 基因 V3-V4 区测序,共获优化序列 945 432。通过真菌的 ITS 区域测序,共获优化序列 1 302 962。在属水平上,优势细菌属为乳杆菌属和链球菌属,优势真菌属为克鲁维酵母属、有孢圆酵母属、伊萨酵母属和未分类的真菌类群。根据主坐标轴分析,6 份样品的群落结构间既有相似性又有差异性。在 MRS 和 MC 培养基中共分离 52 株细菌,在 YGC 培养基上共分离 46 株酵母菌,通过细菌 16S rDNA 序列和真菌 26S rDNA D1/D2 间隔区序列分析,将 52 株细菌归为 7 个属 11 个种,分别是耐久肠球菌、粪肠球菌、热带芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、类副粘杆菌、希腊假单胞菌、副干酪乳杆菌、鸡乳杆菌、霍氏肠杆菌、细黄链霉菌、表皮葡萄球菌。将 46 株酵母菌归为 8 个属 9 个种,分别是解脂耶氏酵母、涎沫假丝酵母、发酵毕赤酵母、库德毕赤酵母、普兰久浩酵母、异常威克汉逊酵母、马克思克鲁维酵母、东方伊萨酵母、酿酒酵母。本研究首次对帕米尔高原地区传统发酵乳制品中微生物资源进行分析,其结果可为该地区发酵乳制品的研究提供参考。需要进一步更系统的深入研究挖掘。

关键词 帕米尔高原;高通量测序;牦牛生奶酪;微生物多样性;分子鉴定

文章编号 1009-7848(2023)08-0342-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.034

新疆喀什塔什库尔干塔吉克自治县简称塔县^[1],它处于新疆东南部的帕米尔高原,距喀什市 290 km,平均海拔 4 000 m 以上,有特殊的地理环境,高原海拔,气候条件差。塔吉克族人民有独特的饮食文化,许多日常食品与维吾尔族相似。如使用牦牛奶、羊奶、牛奶、酥油等奶制品制作的酸奶、奶疙瘩、奶皮子、奶酪等是塔吉克族日常生活中必不可少的食品。奶酪是一种营养丰富,用途广泛的乳制品,是生鲜乳在发酵剂与凝乳酶作用下发生凝固并经一定时间成熟而制成的^[2]。在日常生活中用牦牛奶手工制作奶酪,不同家庭手工制作方式不同,因此不同家庭做出来的奶酪质地、酸度都有所不同。牦牛乳奶酪因独特风味、较高的营养价值,而深受塔吉克族人民的喜爱。帕米尔高原因较偏远,人们生活方式独特,那里的发酵乳制品等很多饮食结构仍处于原生态,没有城市化和工业化的痕迹。传统发酵乳制品更是如此,仅用传统的

发酵引子和手工容器。传统乳制品中蕴含着优质且独特的益生菌资源,有待研究。

随着人们对牦牛乳制品的关注,对微生物多样性以及乳酸菌和酵母菌分离方面的研究报道较多,而对帕米尔高原区域发酵乳制品中微生物多样性及微生物分离方面尚未有文献报道,是一个“研究盲区”。全面了解该地区传统发酵牦牛乳制品中微生物的多样性,挖掘优势微生物资源,具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品 从喀什帕米尔高原塔县地区不同牧民家庭中采集 6 份发酵牦牛乳生奶酪。

1.1.2 试剂与培养基 改良 MRS 培养基、MC 培养基、改良 YGC 培养基,青岛高科园海博生物技术有限公司;全式基因组提取试剂盒 (EE101-01),北京全式金生物技术有限公司;PCR 试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 仪器与设备 生物显微镜(Ci-L 型),上海千欣仪器有限公司;PCR 仪(LNB48+型),上海皓

收稿日期:2022-08-15

基金项目:国家自然科学基金项目(32060528)

第一作者:伊力米热·热夏提,女,硕士生

通信作者:努尔古丽·热合曼 E-mail: nurgulum@163.com

庄仪器有限公司;离心机(BLF6型),上海一恒科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样本的准备 将6份样本在无菌环境下分别装入灭菌处理的5 mL离心管中密封,置于-80℃冰箱冻存。样本信息见表1。

1.2.2 样本高通量测序及数据分析 高通量测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成,数据由上海美吉生物医药科技有限公司平台处理。所选引物见表2。

表1 样本信息

Table 1 Sample information		
采集样本编号	样本编号	
1号样品	A、A_1、A_2	
2号样品	B、B_1、B_2	
3号样品	C、C_1、C_2	每个样本准备3个平行
4号样品	D、D_1、D_2	
5号样品	E、E_1、E_2	
6号样品	F、F_1、F_2	

表2 引物表

Table 2 Primer table

引物名称	
细菌 16S rDNA(V3+V4)区域	338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCGCAGCA-3')
	806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
真菌 ITS 区域	ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')
	ITS2R(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')

1.2.3 菌株的分离纯化 取500 μL混匀的样品加入4 500 μL无菌生理盐水中,以稀释法进行梯度稀释。将样品梯度稀释后涂布于MRS、MC和YGC平板培养皿中,将MRS和MC平板培养皿置37℃培养48 h,YGC平板培养皿置28℃培养48 h。挑取特征单菌落反复划线分离,直至可在显微镜下清晰看到纯菌种为止。将分离纯化的细菌进行革兰氏染色^[3],将酵母菌进行美兰染色^[4],并用甘油管保存于-80℃。

1.2.4 基因组DNA提取及其电泳检测 基因组

DNA的提取;DNA的提取步骤按基因组提取试剂盒说明书,并将提取的DNA保存于-20℃。基因组DNA电泳:采用1.0%的琼脂糖凝胶对提取的DNA进行电泳,电压80 V,时长40 min^[5],观察电泳结果。

1.2.5 PCR扩增细菌16S rDNA序列和酵母菌26S rDNA D1/D2隔间区序列

1) 细菌16S rDNA序列PCR扩增体系^[6]见表3。

表3 细菌16S rDNA序列PCR扩增体系及扩增程序

Table 3 PCR amplification system and procedure of 16S rDNA sequence of bacteria

试剂	25 μL反应体系中加样体积/μL	扩增程序	
基因组模板 DNA	2(预变性)	94℃ 4 min	30个循环
2×Easy Taq™ PCR SuperMix	13.5(变性)	90℃ 30 s	
引物 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')	0.5(退火)	58℃ 30 s	
引物 1495R(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')	0.5(延伸)	72℃ 1 min	
双蒸水	补足至25(延伸)	72℃ 1 min	

PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,最终将PCR产物寄到上海生工生物工程股份有限公司测序,并将得到的序列在NCBI上使用BLAST

进行相似序列搜索程序比对。

2) 酵母菌26S rDNA D1/D2隔间区PCR扩增体系^[7]见表4。

表4 26S rDNA D1/D2 隔间区 PCR 扩增体系及扩增程序
Table 4 PCR amplification system and procedure of 26S rDNA D1 / D2 region

试剂	25 μ L 反应体系中加样体积/ μ L	扩增程序
基因组模板 DNA	2(预变性)	94 $^{\circ}$ C 4 min
2 \times Easy Taq TM PCR SuperMix	10(变性)	90 $^{\circ}$ C 45 s
正向引物 NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')	0.5(退火)	55 $^{\circ}$ C 45 s
反向引物 NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')	0.5(延伸)	72 $^{\circ}$ C 1 min
双蒸水	补足至 25(延伸)	72 $^{\circ}$ C 10 min

PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,将 PCR 产物寄到上海生工生物工程股份有限公司测序,并将得到的序列在 NCBI 上使用 BLAST 进行相似序列搜索程序比对。

2 结果与分析

2.1 测序质量分析

细菌 16S rDNA 基因 V3-V4 区共获优化序列 945 432, 平均序列长度 428 bp, 所有序列按

97%的相似度进行 OTU 聚类,从 18 个样本中共检测到 1 界、5 门、7 纲、12 目、18 科、22 属、30 种、32 OTU; 真菌 ITS 区域共获优化序列 1 302 962, 平均序列长度 281 bp, 所有序列按 97%的相似度进行 OTU 聚类,从 18 个样本中共检测到 1 界、5 门、15 纲、35 目、59 科、81 属、100 种、121 OTU。稀释曲线可用来比较测序数量不同的样本物种丰富度^[8]。

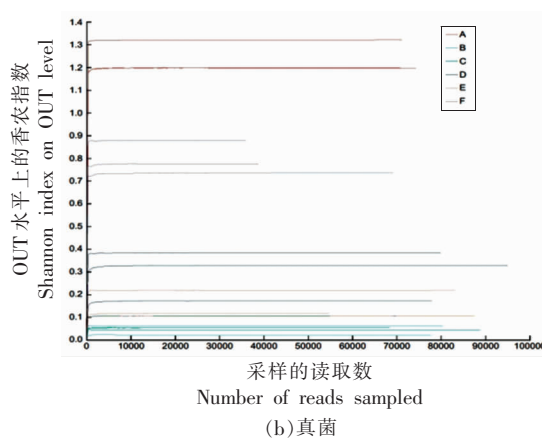
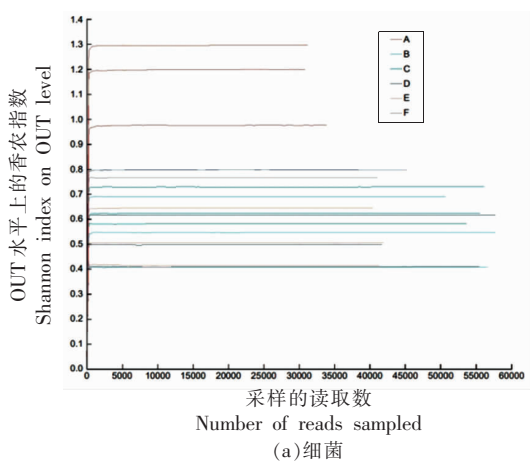


图1 不同样本稀释曲线

Fig.1 Dilution curves of different samples

由图 1a、1b 可知,不同奶酪样品的稀释曲线均趋于平缓,说明本次测序数据量充足,测序量合理,可用来研究细菌和真菌的群落结构。

2.2 不同奶酪样品中微生物 Alpha 多样性分析

常见的 Alpha 多样性指数包括香农指数、辛普森指数、Chao1 指数、Ace 指数和 Coverage 指数等^[9]。群落丰富度指数包括 Ace 指数和 Chao1 指数,通常用这两个指标来衡量物种的丰富度。它们越大表示该样本中的物种越丰富。群落多样性指数包括香农指数和辛普森指数,通常用这两个指

标来衡量样本的多样性。香农指数值越大,辛普森指数值越小表示群落多样性越高。Coverage 指数主要用来检测测序对物种的覆盖度,Coverage 指数值越高,样本中序列没被测出的概率越低。Coverage 指数反映样品测序结果是否具有真实性。

由表 5 和表 6 可知,D 号样品的 Ace 指数最大,说明 D 号奶酪样品中细菌和真菌最丰富。A 号样品的 Chao1 指数最大,说明 A 号奶酪样品中细菌和真菌的群落丰富度最大。A 号样品的香农指

数最大,辛普森指数最小,说明 A 号奶酪样品的细菌和真菌群落多样性相比其它奶酪样品要高。

Coverage 指数对所有样本的覆盖率均在 99%以上,说明样本测序结果具有真实性。

表 5 不同样品细菌 α -多样性分析

Table 5 Analysis of bacterial alpha diversity in different samples

样品编号	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Sobs 指数	Coverage
A	20.58 ± 0.46 ^a	21.06 ± 0.62 ^a	1.15 ± 0.09 ^a	0.43 ± 0.05 ^b	20.33 ± 0.33 ^a	0.99
B	10.50 ± 1.80 ^{bc}	15.99 ± 4.74 ^a	0.55 ± 0.08 ^c	0.66 ± 0.07 ^a	8.00 ± 0.58 ^c	0.99
C	8.17 ± 1.17 ^{bc}	9.39 ± 2.09 ^a	0.64 ± 0.04 ^{bc}	0.58 ± 0.04 ^{ab}	7.67 ± 0.67 ^c	0.99
D	13.33 ± 4.26 ^b	27.34 ± 15.16 ^a	0.51 ± 0.06 ^c	0.69 ± 0.05 ^a	8.33 ± 1.76 ^c	0.99
E	6.50 ± 0.76 ^c	9.16 ± 1.62 ^a	0.52 ± 0.07 ^c	0.68 ± 0.06 ^a	6.00 ± 0.58 ^c	0.99
F	13.83 ± 1.42 ^b	15.08 ± 0.65 ^a	0.79 ± 0.01 ^b	0.55 ± 0.01 ^{ab}	12.67 ± 1.33 ^b	0.99

注:同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

表 6 不同样品真菌 α -多样性分析

Table 6 Analysis of fungal alpha diversity in different samples

样品编号	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Sobs 指数	Coverage
A	32.79 ± 1.95 ^a	33.56 ± 2.63 ^{ab}	1.44 ± 0.08 ^a	0.30 ± 0.05 ^c	30.67 ± 3.38 ^a	0.99
B	10.00 ± 2.08 ^b	21.76 ± 4.13 ^b	0.06 ± 0.03 ^d	0.97 ± 0.01 ^a	6.67 ± 0.67 ^b	0.99
C	9.67 ± 1.69 ^b	11.72 ± 1.74 ^b	0.05 ± 0.01 ^d	0.98 ± 0.01 ^a	8.00 ± 1.00 ^b	0.99
D	31.33 ± 5.90 ^a	36.62 ± 6.16 ^a	0.30 ± 0.06 ^c	0.91 ± 0.02 ^a	29.33 ± 6.89 ^a	0.99
E	16.00 ± 0.58 ^b	16.15 ± 0.60 ^b	0.15 ± 0.04 ^{cd}	0.96 ± 0.01 ^a	16.00 ± 0.58 ^b	0.99
F	26.87 ± 2.77 ^a	37.66 ± 5.63 ^a	0.81 ± 0.05 ^b	0.63 ± 0.03 ^b	21.67 ± 4.81 ^{ab}	0.99

注:同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 不同奶酪样品中微生物群落在门和属水平上的组成分析

为了得知优势物种在个样本中的丰度和变化情况,对微生物的群落组成进行分析。

在门水平上,从 6 份奶酪样本中共检测到 5 个细菌门【分别是厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)、蓝藻菌门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteriota)】和 5 个真菌门【分别是子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、未分类的真菌类群(unclassified_k_Fungi)、被孢霉门(Mortierellomycota)、新丽鞭菌门(Neocallimastigomycota)】,其中厚壁菌门为优势细菌门,子囊菌门为优势真菌门。

在属水平上,6 份奶酪样品中乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)都占绝对优势。其中每组样品中乳杆菌属、链球菌属、醋酸杆菌属(*Acetobacter*)所占比例不同(图 2 所示)。

在属水平上,每组奶酪样品中微生物所占比例都有所不同,其中 A 号和 F 号样品中微生物最

丰富。A 号样品中伊萨酵母属(*Issatchenkia*)占绝对优势,F 号样品中有孢圆酵母属(*Torulasporea*)占绝对优势,其它 4 组样品中克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)占绝对优势(图 3 所示)。

2.4 不同奶酪样品中微生物 Beta 多样性分析

主坐标轴分析(Principalco-ordinates analysis),是一种对数据进行降维的非约束性分析方法,可反映不同样本的群落组成相似性和差异性^[8]。

细菌 PC1 贡献率为 53.35%,PC2 贡献率为 37.82%。6 份传统牦牛乳发酵生奶酪样品中 A 号样品与其它 5 组样品距离较远,说明具有差异性,然而 B、C、D、E、F 相对较近,也有重叠现象,说明这 5 组奶酪样品细菌群落结构具有相似性(图 4 所示)。

真菌 PC1 贡献率为 79.47%,PC2 贡献率为 18.84%。6 份传统牦牛乳发酵生奶酪样品中 A 和 F 号样品与其它 4 组样品距离较远,这说明 A 号和 F 号生奶酪样品中真菌的群落结构比较独立,且与其它 4 份生奶酪样品的真菌群落结构之间是

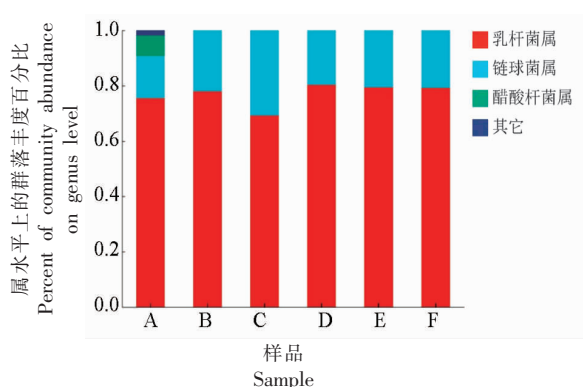


图2 不同样品细菌属水平柱状图

Fig.2 Bar diagram of bacterial genus level in different samples

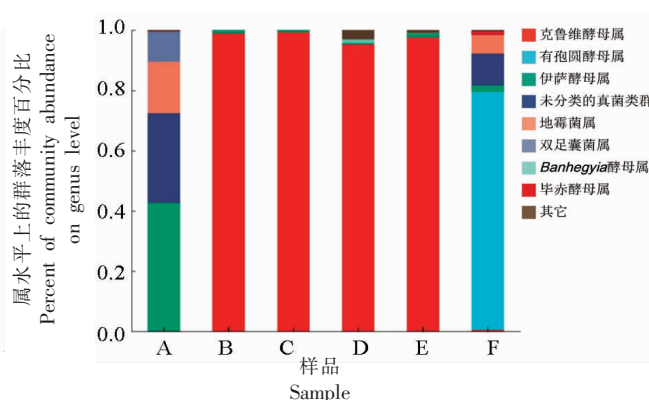


图3 不同样品真菌属水平柱状图

Fig.3 Bar diagram of fungal genus level in different samples

有一定的差异的,而B、C、D、E有重叠现象,说明这4组奶酪样品真菌群落结构具有相似性(图5

所示)。

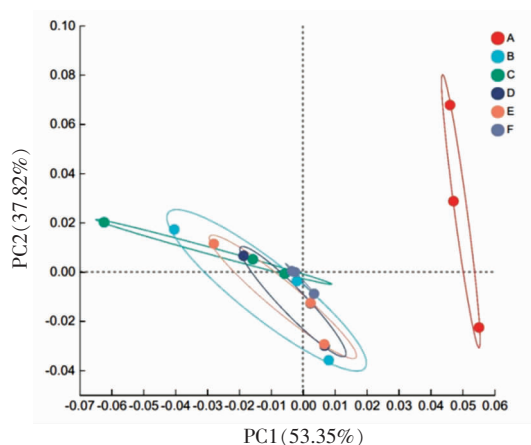


图4 基于加权 Unifrac 距离的不同样品细菌 PCoA 图
Fig.4 Bacterial PCoA diagram of different samples based on weighted unifrac distance

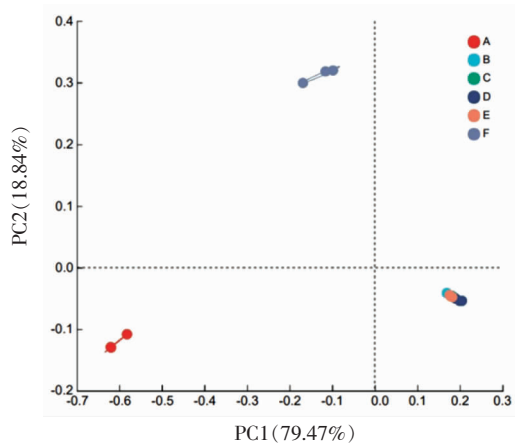


图5 基于加权 Unifrac 距离的不同样品真菌 PCoA 图
Fig.5 Fungal PCoA diagram of different samples based on weighted unifrac distance

2.5 菌株的分离与纯化

6份传统牦牛乳发酵生奶酪中细菌和酵母菌有丰富的微生物多样性,研究发现其中细菌和酵母菌的总数在 10^8 ~ 10^{12} CFU/g之间。6份奶酪样品,在改良的MRS平板上共分离纯化得到46株细菌,在MC平板上共分离纯化得到6株细菌,在改良YGC平板上共分离纯化得到46株酵母菌,观察菌株的形态学特征。菌株的菌落形态或大而凸起、或小而扁平,菌落颜色有白色或乳白色,菌落边缘整齐不透明。

2.6 16S rDNA 序列分析结果

以52株细菌的基因组DNA为模板,采用引物27F、1495R扩增出16S rDNA序列,并对扩增产物进行电泳,电泳条带在1500 bp左右。鉴定结果见表7。

由表7可知,52株细菌经分子鉴定归属为7个属11个种,其中TM-1、TM-7、TM-10、TM-25、TM-28属于耐久肠球菌, TM-3、TM-16、TM-20、TM-24属于粪肠球菌, TM-9、TM-22、2TM-9、3TM-2、3TM-3、3TM-4、3TM-5、3TM-6、4TC-2、

4TM-5、4TM-6、4TM-7、4TM-9、4TM-10、5TM-1、5TM-10、5TC-1、5TC-2、6TM-1、6TM-3、6TM-5、6TM-10、6TM-12 属于热带芽孢杆菌,2TC-1、2TM-6、2TM-12、3TC-3 属于蜡样芽孢杆菌,5TC-3 属于类副粘杆菌,TM-26、TM-27、TM-31 属于副

干酪乳杆菌,TM-30 属于鸡乳杆菌,TM-21 属于希腊假单胞菌,3TM-9 属于霍氏肠杆菌,3TM-1、3TM-10、3TM-11、4TM-1、4TM-11、5TM-3、6TM-6、6TM-8 属于细黄链霉菌,5TM-4 属于表皮葡萄球菌。

表 7 细菌鉴定结果

Table 7 Bacterial identification results

属名	菌株编号	种名	同源性/%
肠球菌属	TM-1、TM-7、TM-10、TM-25、TM-28	耐久肠球菌(<i>Enterococcus durans</i>)	>99
	TM-3、TM-16、TM-20、TM-24	粪肠球菌(<i>Enterococcus faecium</i>)	>99
芽孢杆菌属	TM-9、TM-22、2TM-9、3TM-2、3TM-3、3TM-4、3TM-5、3TM-6、4TC-2、4TM-5、4TM-6、4TM-7、4TM-9、4TM-10、5TM-1、5TM-10、5TC-1、5TC-2、6TM-1、6TM-3、6TM-5、6TM-10、6TM-12	热带芽孢杆菌(<i>Bacillus tropicus</i>)	>99
	2TC-1、2TM-6、2TM-12、3TC-3	蜡样芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	>99
	5TC-3	类副粘杆菌(<i>Bacillus paramycoides</i>)	>99
乳杆菌属	TM-26、TM-27、TM-31	副干酪乳杆菌(<i>Lactobacillus paracasei</i>)	>99
	TM-30	鸡乳杆菌(<i>Lactobacillus gallinarum</i>)	>99
假单胞菌属	TM-21	希腊假单胞菌(<i>Pseudomonas helleri</i>)	100
肠杆菌属	3TM-9	霍氏肠杆菌(<i>Enterobacter hormaechei</i>)	>99
链球菌属	3TM-1、3TM-10、3TM-11、4TM-1、4TM-11、5TM-3、6TM-6、6TM-8	细黄链霉菌(<i>Streptomyces microflavus</i>)	>99
	5TM-4	表皮葡萄球菌(<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	>99

2.7 细菌系统发育树的构建

采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树 (Neighbor-Joining 法),结果如图 6 所示。

2.8 26S rDNA D1/D2 隔间区序列分析结果

以 46 株酵母菌的基因组 DNA 为模板,采用通用引物 NL1、NL4 扩增出 26S rDNA D1/D2 隔间区序列,并对扩增产物进行电泳,电泳条带在 600 bp 左右。鉴定结果见表 8。

由表 8 可知,46 株酵母菌经分子鉴定归属为 8 个属 9 个种,其中 TY-6、TY-7 属于解脂耶氏酵母,TY-17 属于诞沫假丝酵母,TY-20 属于发酵毕赤酵母,2TY-1、2TY-2、2TY-3、2TY-4、2TY-5、2TY-6、2TY-7、2TY-8、2TY-10、3TY-1、3TY-2、3TY-3、3TY-4、3TY-5、3TY-6、3TY-8、3TY-11、4TY-1、4TY-2/4TY-3、4TY-4、4TY-8、5TY-3、

5TY-4、5TY-5、5TY-6、5TY-8、5TY-9、5TY-10、6TY-1、6TY-4 属于库德毕赤酵母,TY-25 为普兰久浩酵母,2TY-9、4TY-9、6TY-6 属于异常威克汉逊酵母,4TY-5、4TY-6、4TY-11、5TY-1 属于马克思克鲁维酵母,5TY-2、5TY-6 属于东方伊萨酵母,6TY-2 属于酿酒酵母。

2.9 酵母菌系统发育树构建

将采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树 (Neighbor-Joining 法)。如图 7 所示。

2.10 高通量测序与传统培养法在属水平上的比较

高通量测序结果与实验室通过传统培养方法分离鉴定出来的菌之间也有差异性,见表 9。

由表 9 可知,通过高通量测序技术检出的细菌和酵母菌除了链球菌属、醋酸杆菌属、有孢圆酵

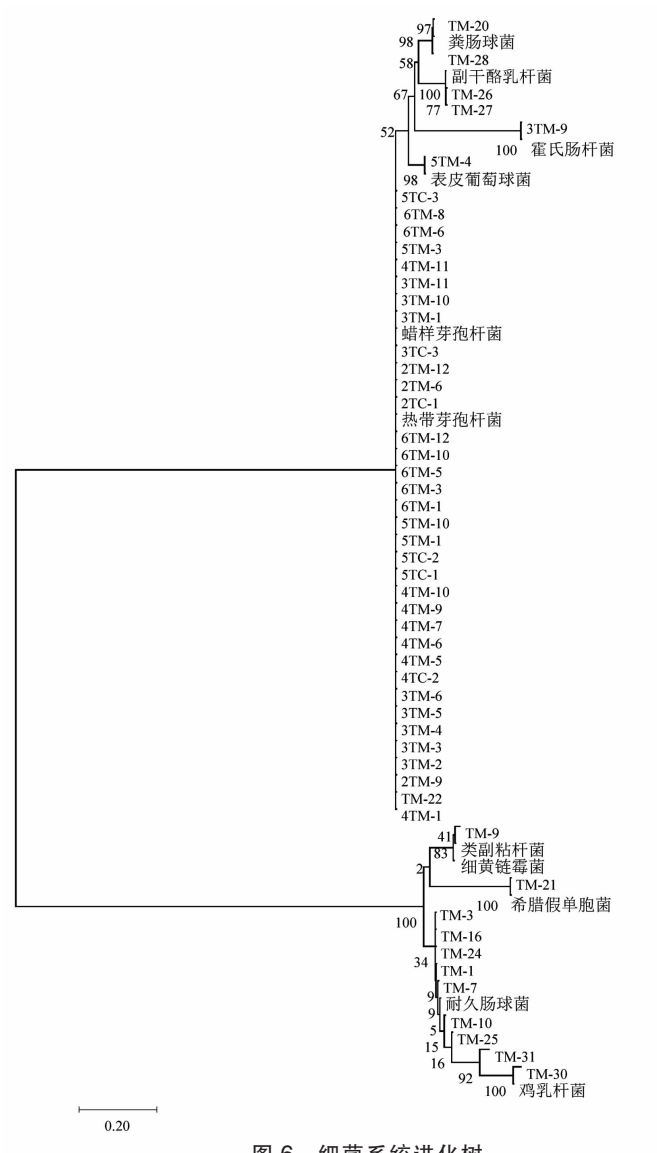


图 6 细菌系统进化树

Fig.6 Bacterial phylogenetic tree

表 8 酵母菌鉴定结果

Table 8 Yeast identification results

属名	菌株编号	种名	同源性/%
耶氏酵母属	TY-6、TY-7	解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>)	>99
假丝酵母	TY-17	诞沫假丝酵母 (<i>Candida zeylanoides</i>)	>98
毕赤酵母属	TY-20	发酵毕赤酵母 (<i>Pichia fermentans</i>)	>99
	2TY-1、2TY-2、2TY-3、2TY-4、2TY-5、2TY-6、2TY-7、2TY-8、2TY-10、3TY-1、3TY-2、3TY-3、3TY-4、3TY-5、3TY-6、3TY-8、3TY-11、4TY-1、4TY-2、4TY-3、4TY-4、4TY-8、5TY-3、5TY-4、5TY-5、5TY-6、5TY-8、5TY-9、5TY-10、6TY-1、6TY-4	库德毕赤酵母 (<i>Pichia kudriavzevii</i>)	>99

(续表 8)

属名	菌株编号	种名	同源性/%
久浩酵母	TY-25	普兰久浩酵母 (<i>Guehomyces pullulans</i>)	>99
威克汉逊酵母属	2TY-9、4TY-9、6TY-6	异常威克汉逊酵母 (<i>Wickerhamomyces anomalus</i>)	>99
克鲁维酵母属	4TY-5、4TY-6、4TY-11、5TY-1	马克思克鲁维酵母 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	>99
伊萨酵母属	5TY-2、5TY-6	东方伊萨酵母 (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	>99
酵母属	6TY-2	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	>99

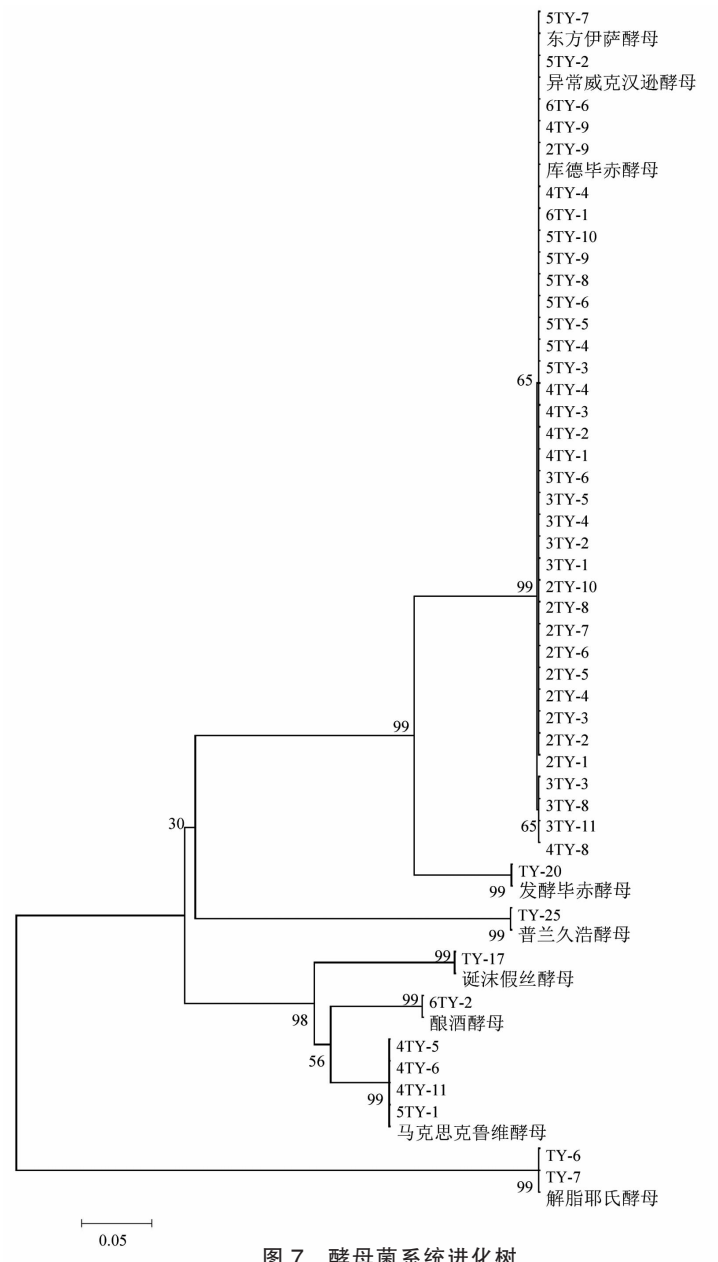


图 7 酵母菌系统进化树

Fig.7 Yeasts phylogenetic tree

母属、地霉菌属、双足囊菌属、*Banhegyia* 酵母属以外,都可通过可培养的方法分离出来。未分离出的细菌和酵母菌说明传统培养方法的局限性,也有

可能是选择的培养基不全面。今后可继续改良培养基以分离更多与高通量测序结果一致的优势菌。

表9 两种方法在属水平上的分析

Table 9 Analysis of two methods at genus level

微生物	属水平	高通量测序	传统培养法
细菌	乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)	+	+
	链球菌属	+	-
	醋酸杆菌属	+	-
	肠球菌属(<i>Enterococcus</i>)	+	+
	芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>)	+	+
	假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)	+	+
酵母菌	克鲁维酵母属(<i>Kluyveromyces</i>)	+	+
	有孢圆酵母属(<i>Torulasporea</i>)	+	-
	伊萨酵母属	+	+
	地霉菌属(<i>Geotrichum</i>)	+	-
	双足囊菌属(<i>Dipodascus</i>)	+	-
	<i>Banhegyia</i> 酵母属(<i>Banhegyia</i>)	+	-
	毕赤酵母属(<i>Pichia</i>)	+	+
	维克汉姆酵母属(<i>Wickerhamomyces</i>)	+	+
	酵母属(<i>Saccharomyces</i>)	+	+

3 结论与讨论

本文的高通量测序结果显示,细菌 16S rDNA 基因 V3-V4 区共获得优化序列 945 432。真菌 ITS 区域共获得优化序列 1 302 962。在属水平上,优势细菌属为乳杆菌属和链球菌属,优势真菌属为克鲁维酵母属、有孢圆酵母属、伊萨酵母属和未分类的真菌类群。张冬蕾^[10]通过高通量测序技术对新疆昭苏县和特克斯县采集酸牛奶样品中的微生物资源进行分析,在属水平上,乳杆菌属是优势细菌属,酿酒酵母属是优势真菌属;玛依拉·艾海提^[9]对南疆传统酸奶中微生物多样性的分析表明,乳杆菌属和链球菌属为优势细菌属,酵母菌属和克鲁维酵母属为优势真菌属。本研究结果表明,喀什帕米尔高原牦牛乳传统发酵生奶酪微生物结构与其它地区发酵乳制品微生物结构有明显的差距,具有自己的微生物多样性。主坐标轴(PCoA)分析表明,6份样品的群落结构之间既有相似性也有差异性,这是由不同家庭的手工制作方式和制作环境的不同所致。

通过在实验室纯培养方法分离鉴定了 52 株细菌,将其归为 7 个属 11 个种;分离鉴定了 46 株酵母菌,将其归为 8 个属 9 个种。这个结果说明塔县传统牦牛乳发酵奶酪中细菌和酵母菌资源种类

丰富。刘珊春等^[11]、Ao 等^[12]在我国传统牦牛乳中发现了耐久肠球菌和副干酪乳杆菌。Dolci 等^[13]在传统奶酪(Castelmagno PDO)中发现副干酪乳杆菌。不同地区乳制品中都发现耐久肠球菌、粪肠球菌和副干酪乳杆菌,说明本研究分离出来的耐久肠球菌、粪肠球菌、副干酪乳杆菌是生奶酪中常见的乳酸菌。肠球菌作为非发酵剂乳酸菌(NSLAB)存在于各种奶酪中^[14]。副干酪乳杆菌广泛存在与奶酪中,不仅能增进发酵食品的营养价值,改善口感和风味,还能产生抗菌物质,延长发酵食品的保存时间^[15]。Lopandic 等^[16]、Jakobsen 等^[17]在奶酪乳制品中发现了解脂耶氏酵母、诞沫假丝酵母、酿酒酵母和马克斯克鲁维酵母。李宇辉等^[18]、芦文娟等^[19]、王冠群等^[20]、李王强等^[21]、王远微等^[22]在新疆传统奶酪乳制品中发现了发酵毕赤酵母、酿酒酵母、马克斯克鲁维酵母、库德毕赤酵母、东方伊萨酵母。这说明本研究分离的解脂耶氏酵母、诞沫假丝酵母、发酵毕赤酵母、库德毕赤酵母、马克斯克鲁维酵母、东方伊萨酵母、酿酒酵母是生奶酪乳制品中常见的酵母菌。解脂耶氏酵母中含有的大量脂肪酶和酯酶,是在奶酪成熟过程中发挥重要作用的分解脂肪的菌株之一^[23],这一特性需进一步研究。

本研究中还发现了热带芽孢杆菌、蜡样芽孢

杆菌、类副粘杆菌、希腊假单胞菌、鸡乳杆菌、霍氏肠杆菌、细黄链霉菌、表皮葡萄球菌等。Von 等^[24]从生牛奶中分离出希腊假单胞菌。文献报道假单胞菌属是原料奶样品和半成品奶制品中最普遍和最丰富的属。这些菌在低温下生长良好,能分解乳中蛋白质导致牛乳酪化,分解脂肪导致牛乳产生哈喇味,引起乳制品腐败变质。帕米尔高原地区温度较低,为假单胞菌生长提供了良好的条件。霍氏肠杆菌是正常的肠道微生物。任冬艳等^[25]在传统奶酪样品中发现了霍氏肠杆菌为优势菌群。王晓雯等^[26]在塔城奶酪中发现了表皮葡萄球菌,它是滋生生物体表面的一种正常细菌,大多数为非致病菌。这些细菌虽不是致病菌,但影响奶的质量和口感,它反映生奶酪制作过程中不良的卫生条件。

综上所述,喀什帕米尔高原塔县地区传统牦牛乳发酵生奶酪中微生物资源丰富。本研究结果为今后该地区传统发酵生奶酪微生物资源开发提供了参考。

参 考 文 献

- [1] 宋榭. 塔什库尔干地区铁矿成因类型及成矿环境研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
SONG Y. Study on genetic types and metallogenic environment of iron deposits in the Taxkorgan area [D]. Changchun: Jilin University, 2019.
- [2] 顾春华, 刘煜, 王建军, 等. 奶酪的营养价值及奶酪中生物活性肽的研究进展[J]. 食品安全导刊, 2021(20): 186-189.
GU C H, LIU Y, WANG J J, et al. Nutritional value of cheese and research progress of bioactive peptides in cheese[J]. China Food Safety Magazine, 2021(20): 186-189.
- [3] 谭啸, 章熙东. 革兰氏染色法观察与区分细菌[J]. 生物学教学, 2019, 44(7): 71-72.
TAN X, ZHANG X D. Observation and differentiation of bacteria by Gram staining[J]. Biology Teaching, 2019, 44(7): 71-72.
- [4] 陈兴民, 刘军, 李建国, 等. 酵母菌的分离培养及发酵实验方法[J]. 生物学通报, 2016, 51(5): 43-44.
CHEN X M, LIU J, LI J G, et al. Isolation and culture of yeast and experimental method of fermentation[J]. Bulletin of Biology, 2016, 51(5): 43-44.
- [5] 古丽娜孜·卡哈尔, 努尔古丽·热合曼, 迪丽拜尔·玉山, 等. 新疆传统发酵酸奶中酵母菌的分子鉴定及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(4): 12-19.
GULNAZ K, NURGUL R, DILBAR Y, et al. Molecular identification and antioxidant activity of yeasts isolated from traditional fermented milk in southern Xinjiang[J]. Food & Machinery, 2018, 34(4): 12-19.
- [6] 申磊. 细菌分类学方法研究概况[J]. 安徽农学通报, 2011, 17(23): 64-66.
SEHN L. Overview on the research methods of bacterial taxonomy[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2011, 17(23): 64-66.
- [7] 王庆国, 刘天明. 酵母菌分类学方法研究进展[J]. 微生物学杂志, 2007(3): 96-101.
WANG Q G, LIU T M. Advanced in yeast taxonomical methods[J]. Journal of Microbiology, 2007(3): 96-101.
- [8] 姜伟, 白红梅, 薛国萍, 等. 基于高通量测序的设施连作果类菜根际土壤细菌群落结构和多样性分析[J]. 华北农学报, 2021, 36(4): 82-89.
JIANG W, BAI H M, XUE G P, et al. Analysis of bacterial community structure and diversity in rhizosphere soil of different fruit vegetables in greenhouse continuous cropping on high-throughput sequencing[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2021, 36(4): 82-89.
- [9] 玛依乐·艾海提, 西热娜依·阿布力克木, 努尔古丽·热合曼, 等. 应用高通量测序法检测新疆传统酸奶中微生物多样性[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 126-131.
MAYIRA A, XIRINAY A, NURGUL R, et al. Diversity of culturable microorganisms in traditional fermented milk from south Xinjiang as analyzed by high-throughput pyrosequencing[J]. Food Science, 2018, 39(20): 126-131.
- [10] 张冬蕾. 应用焦磷酸测序技术对新疆地区传统发酵乳制品中微生物多样性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
ZHANG D L. Assessment of the microbial diversity in traditional fermented dairy products of Xinjinag by pyrosequencing[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016.
- [11] 刘珊春, 赵欣, 骞宇, 等. 西藏羊八井地区牦牛酸

- 乳中乳酸菌菌种鉴定[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 208-212.
- LIU S C, ZHAO X, QIAN Y, et al. Identification of *Lactobacillus* isolated from fermented yak milk in Tibetan Yangbajing area[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(10): 208-212.
- [12] AO X, ZHANG X, SHI L, et al. Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products[J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(3): 1073-1084.
- [13] DOLCI P, ALESSANDRIA V, RANTSIOU K, et al. Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 122(3): 302-311.
- [14] GIRAFFA G. Functionality of *Enterococci* in dairy products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 88(2/3): 215-222.
- [15] 陈冲, 宋丽菊, 齐盼盼, 等. 干酪乳杆菌在乳制品中的应用研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(4): 88-91.
- CHEN C, SONG L J, QI P P, et al. Review on the probiotic properties of *Lactobacillus casei* in dairy products[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2015, 51(4): 88-91.
- [16] LOPANDIC K, ZELGER S, BANSZKY L K, et al. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques[J]. Food Microbiology, 2006, 23(4): 34.
- [17] JAKOBSEN M, LARSEN M D, JESPERSEN L. Production of bread, cheese and meat[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012: 3-22.
- [18] 李宇辉, 王俊钢, 刘成江, 等. 新疆伊犁牧区发酵乳制品中酵母菌的分离和多样性分析[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(7): 98-103.
- LI Y H, WANG J G, LIU C J, et al. Analysis on separation and diversity of yeast from traditional fermented milk product in Xinjiang Yili of China[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(7): 98-103.
- [19] 芦文娟, 李宝坤, 卢士玲, 等. 新疆塔城地区哈萨克族传统奶酪中酵母菌的分离鉴定[J]. 中国酿造, 2016, 35(7): 24-29.
- LU W J, LI B K, LU S L, et al. Isolation and identification of yeast from traditional cheese of Kazak in Tacheng region of Xinjiang[J]. China Brewing, 2016, 35(7): 24-29.
- [20] 王冠群, 韩培杰, 杨文菊, 等. 新疆传统发酵乳制品及酵头中酵母菌的分离鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(7): 691-698.
- WANG G Q, HAN P J, YANG W J, et al. Isolation and identification of yeasts from the traditional fermented dairy products and fermented flour starters in Xinjiang[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(7): 691-698.
- [21] 李王强, 刘月, 孟祥栓, 等. 新疆塔城地区乳源酵母菌的分离、鉴定及其抗胁迫特性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 99-106.
- LI W Q, LIU Y, MENG X S, et al. Isolation and identification of yeast and its resistance to stress of Xinjiang Tacheng area dairy products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(22): 99-106.
- [22] 王远微, 张诚民, 索化夷, 等. 传统发酵牦牛酸奶中马克斯克鲁维酵母菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 食品科学, 2014, 35(15): 216-220.
- WANG Y W, ZHANG C M, SUO H Y, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Kluyveromyces marxianus* strains from traditional fermented yak yoghurt[J]. Food Science, 2014, 35(15): 216-220.
- [23] 王晖, 薛庆节, 杨媛媛, 等. 解脂耶氏酵母在食品工业中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(8): 291-297.
- WANG H, XUE Q J, YANG Y Y, et al. Application of *Yarrowia lipolytica* in food industry[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(8): 291-297.
- [24] VON N M, HUPTAS C, GIUCK C, et al. *Pseudomonas helleri* sp. nov and *Pseudomonas weihenstephanensis* sp. nov. isolated from raw cow's milk[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2015, 66(3): 1163.
- [25] 任冬艳, 莫蓝馨, 靳昊, 等. 应用 PacBio SMRT 测序技术分析蒙古传统奶酪细菌多样性[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(3): 4-9.
- REN D Y, MO L X, JIN H, et al. Bacterial biodiversity of traditional cheese in Mongolia based on pacbio SMRT sequencing technology[J]. China Dairy Industry, 2020, 48(3): 4-9.
- [26] 王晓雯, 李宝坤, 蒋彩虹, 等. 哈萨克族传统奶酪中 NSLAB 的分离鉴定[J]. 中国食品学报, 2018, 18

(5): 273–279.

WANG X W, LI B K, JIANG C H, et al. Isolation and identification of NSLAB from Kazak traditional

cheese[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(5): 273–279.

Microflora Diversity and Molecular Identification from Traditional Fermented Raw Cheese of Yak Milk in Tashkorghan Pamirs

Elmira Rixat, Nurgul Rahman*, Gulpiya Tohti, Dilhumar Abduxukur

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

Abstract Objective: To explore the microbial diversity and community structure of traditional fermented raw cheese of yak milk in Tashkorghan Pamirs Xinjiang. Methods: 6 raw cheese samples were collected from different herdsman's families. The microbial diversity was analyzed by high-throughput sequencing technology. At the same time, the traditional yak milk fermented cheese samples were selected and isolated by pure culture. The species of bacteria and yeast were identified by traditional classification, 16S rDNA sequencing and 26S rDNA D1/D2 spacer sequencing. Results: The optimized sequence 945 432 was obtained by sequencing the V3–V4 region of 16S rDNA gene. The optimized sequence 1 302 962 was obtained by sequencing the ITS region of fungi. At the genus level, *Lactobacillus* and *Streptococcus* belonging to Firmicutes were the dominant bacterium, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Issatchenkia* and *unclassified dipodascaceae* belonging to Ascomycota were the dominant fungi. According to PCoA analysis, the community structure of the six samples had both similarities and differences. 52 strains of bacteria were isolated on MRS and MC medium and 46 strains of yeast were isolated on YGC medium. Through the analysis of bacterial 16S rDNA sequence and fungal 26S rDNA D1/D2 compartment sequence, 52 strains of bacteria were classified into 7 genera and 11 species. They were *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus tropicus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus paramycoides*, *Pseudomonas helleri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus gallinarum*, *Enterobacter hormaechei*, *Streptomyces microflavus* and *Staphylococcus epidermidis*. 46 yeast strains were classified into 8 genera and 9 species. They were *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides*, *Pichia fermentans*, *Pichia kudriavzevii*, *Guehomyces pullulans*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. In this study, the microbial resources in traditional fermented dairy products in Tashkorghan Pamirs were analyzed for the first time. There is diversity of microorganisms in yak milk fermented milk products in this area. Further in-depth research and excavate are needed.

Keywords Pamirs; high throughput sequencing; yak milk raw cheese; microbial diversity; molecular identification