

基于宏基因组技术的生鲜乳中耐热酶污染来源分析

代良超¹, 逢晓阳², 胡少震⁴, 喻东威³, 吕加平², 逯刚³, 武俊瑞^{1*}, 张书文^{2*}

(¹沈阳农业大学食品学院 沈阳 110866

²中国农业科学院农产品加工研究所 北京 100193

³内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司 呼和浩特 011517

⁴塔里木大学生命科学与技术学院 新疆阿拉尔 843300)

摘要 生鲜乳中的耐热酶会严重影响产品货架期的质量稳定性,而耐热酶的主要来源和污染途径一直存在争论。基于宏基因组技术分析中国某牧场的环境样本(牛舍垫土、TMR 饲料)和生鲜乳样本(头三把奶、头三把奶之后生鲜乳、储奶罐中生鲜乳)的微生物群落组成及其产胞外蛋白酶(EC 3.4.24.40)和脂肪酶(EC 3.1.1.3)的基因丰度,弄清储奶罐中生鲜乳的耐热酶污染来源。多样性分析结果表明:牛舍垫土中的典型嗜冷菌丰富度,如假单胞菌属(1.57%)和不动杆菌属(1.56%)远高于其它样品,远高于头三把奶(0.26%,0.54%)。通过微生物产酶基因分析,储奶罐中生鲜乳中产生耐热酶的微生物主要来自嗜冷菌,为假单胞菌属和不动杆菌属。各样本中产蛋白酶的基因丰度为:牛舍垫土:8.71、头三把奶:0.18;产脂肪酶各的基因丰度为:牛舍垫土:16.19、TMR 饲料:0.33、头三把奶:0.18、头三把奶之后生鲜乳:0.39、储奶罐中生鲜乳:0.22。此外,储奶罐中生鲜乳的脂肪酶基因在挤奶环节中基因重复率最低为 57.14%。因此,微生物及其嗜冷菌通过牛舍垫土污染奶牛乳头,在挤奶环节会进入生鲜乳收集管路而造成污染。本研究为有效防控生鲜乳中耐热酶的污染提供了理论和数据基础。

关键词 生鲜乳;宏基因组;嗜冷菌;耐热酶;污染来源

文章编号 1009-7848(2024)08-0448-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.040

牛乳营养丰富,受到广大消费者的欢迎,是世界范围内消费量最大的乳品。乳品安全问题是企业和消费者共同关注的重要问题。生鲜乳在生产、加工、运输过程中都可能受到污染,尤其生鲜乳采集时容易受到接触介质污染,例如饲料、垫土、空气、挤奶设备和储备设备等^[1-2]。为了最大限度地抑制微生物生长,生鲜乳被要求在低温(4℃)条件下贮藏、运输^[3]。低温条件下,嗜冷菌仍然可以生长并很快成为优势菌群^[4]。杀菌处理能够杀灭生鲜乳中嗜冷菌,而其产生的耐热酶类,主要包括胞外蛋白酶(EC 3.4.24.40)和脂肪酶(EC 3.1.1.3)无法被完全灭活,仍残留较高酶活^[5]。残留的耐热酶会导致乳品在货架期出现蛋白水解、凝胶沉淀、脂肪上浮、酸败等不良现象,严重影响产品货架期质量^[6-7]。

嗜冷菌分泌的胞外蛋白酶是一种分子质量在 40~50 ku 之间的碱性金属肽酶,属于沙雷肽酶家族,编号为 EC 3.4.24.40^[8-10],其来源包括假单胞菌、沙雷氏菌等^[9]。AprX(又称 AprA)肽酶,是由 *aprx* 基因编码的一种分泌型耐热金属蛋白酶,被认为是导致牛乳变质的主要蛋白酶^[11-12],在 60.3% 的假单胞菌分离株中存在^[13]。脂肪酶是一种酯键水解酶,其能催化长链甘油三酯水解生成甘油和脂肪酸,也被称为三酰甘油脂肪酶(EC 3.1.1.3)^[14]。在液态乳中,嗜冷菌分泌的胞外脂肪酶能水解乳脂肪,释放出游离脂肪酸、单酰基甘油、甘油等,使乳出现酸败、苦味^[15-16]、分层结块^[17]等质量缺陷。在生鲜乳中,嗜冷菌及其胞外酶的存在是影响乳品品质的主要风险因子,而嗜冷菌及其胞外酶是如何进入生鲜乳的,目前没有明确的结论。

随着宏基因组学,特别是高通量测序技术的不断发展,使得研究生鲜乳在环境、生产以及其它潜在的污染状况的特征解析等方面成为可能^[18-19]。Dolye 等^[20]利用宏基因组测序对乳头表面、采奶器具、奶牛粪便及生鲜乳等样本进行分析,研究生产环境与生鲜乳菌群间的关系,结果显示:乳头表面

收稿日期: 2023-08-11

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-36);宁夏重点研发计划项目(2021BEF02022);内蒙古科技计划项目(2021GG0368)

第一作者: 代良超,男,硕士生

通信作者: 武俊瑞 E-mail: junruiwu@126.com

张书文 E-mail: zswcaas@hotmail.com

是最重要的微生物污染源,奶牛粪便是关键来源之一。通过对奶牛的居住环境和牛乳生产的关键环节进行抽样,明确了生鲜乳的最重要污染源。同时,近几年,随着测序技术的发展和测序成本的下降,宏基因组技术被越来越多地应用于环境样本中微生物群落和功能基因的解析。

本研究从中国河北省衡水某牧场抽样采集了牧场牛舍垫土、TMR 饲料、头三把奶、头三把奶之后的生鲜乳、储奶罐中生鲜乳样品,采用宏基因组技术分析和比较不同样品中微生物及其嗜冷菌的多样性,同时筛选产蛋白酶(EC 3.4.24.40)、脂肪酶(EC 3.1.1.3)的微生物组成和基因分布,探明各样品中酶类代谢的差异性,为生鲜乳中微生物及其嗜冷菌和酶类污染来源的分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

APA Library Quantification Kit, KAPA 公司; TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kit、NovaSeq Reagent Kits (300 cycles), Illumina 公司; NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit, New England Biolabs (NEB) 公司; Agilent DNA 1000 Kit, 美国安捷伦科技公司; Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter 公司; PowerSoil DNA Isolation Kit, 美国 MOBIO 生物公司。

SIGMA 3K-15 台式高速离心机, Sigma 公司; M220 超声波破碎仪, 美国 Covaris 公司; GenoSens 1800 凝胶成像仪, 上海勤翔科技有限公司; DL-CJ-IN 无菌试验台, 哈尔滨市东联电子技术有限公司; MB-102 金属浴, 杭州博日科技有限公司; SI-0246 涡旋仪, 美国 Scientific Industries 公司; LDZX-50KB 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械有限公司。

1.2 样品采集

从中国河北省某牧场分别随机采取牛舍垫土(P_s)、TMR 饲料(TMR)、头三把奶(F₉₀)、头三把奶之后生鲜乳(B₉₀)、储奶罐中生鲜乳样品(T₉₀)。取样时间为秋季,在 2 h 内完成取样,按每份样品各 500 g 装于无菌塑料瓶及包装袋中。将样品置于装有冰袋的保温箱中运回实验室,在 -80 °C 冰箱进行保存。

1.3 样品宏基因组 DNA 提取

取适量样品于无菌生理盐水中并充分溶解,参考 PowerSoil DNA Isolation Kit 的步骤说明严格操作进行 DNA 提取。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳及 Nano Drop 分光光度计对提取结果进行分析评价。

1.4 宏基因组测序

将评价合格的 DNA 样品进行文库的构建和检测。通过检测的文库利用 Illumina HiSeq 测序平台进行测序,委托北京奥维森基因科技有限公司进行。具体的试验步骤如下:首先,将合格的样品 DNA 利用 Covaris 超声波破碎仪进行随机分割为长度约 350 bp 的片段,再通过末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成整个文库制备。其次,先使用 Qubit 2.0 进行初步定量,稀释文库至 2 ng/μL,在利用 Agilent 2100 对文库的片段大小进行检测,当片段大小符合预期后,使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度 > 3 nmol/L)。最后,库检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求混合后进行 Illumina HiSeq 测序。利用 Bowtie 2 软件对序列数据与宿主的基因组进行比对,用 Megait (v1.0.6) 软件对片段进行组装,去除低质量序列、接头序列和宿主基因组后,对剩余的高质量序列进行物种注释。

1.5 蛋白酶及脂肪酶基因数据提取及物种分析

使用组装软件 Megait (v1.0.6) 对测序数据进行组装,并过滤掉组装结果中 500 bp 以下的片段。采用 Prodigal (V2.6.3) 软件对组装得到的拼接序列的开放阅读框架进行预测,使用 CD_HIT (v4.8.1) 软件对预测的结果去冗余,从而得到非冗余基因集。采用 Bowtie (v1.1.2) 软件将测序数据与构建的非冗余基因集进行比对,并统计单个基因在不同样本的丰度信息。借助 Kobas 软件,将非冗余基因序列与 Kegg 数据库进行比对,获得功能通路结果。筛选产脂肪酶、蛋白酶相关基因,并基于非冗余基因序列借助 Blast 软件与 NR 数据库进行比对,获得功能对应物种信息。

1.6 数据处理与统计分析

数据利用 Excel 2010 及 SPSS 23 软件进行统计处理,使用 Origin 2018 及 GraphPad Prism 6.0

绘图。

2 结果与讨论

2.1 各样品测序数据的质量控制

各样品测序得出的原始结果需要进一步质量控制,主要包括接头和低质量序列的修剪和去除。主要包括过滤有接头的序列、不确定碱基含量大于1%的序列以及低质量碱基含量大于50%的序列。原始数据过滤后得到高质量序列(去除噪音、低质量的序列,从而提取出的高质量可靠数据),并用高质量序列用于后续分析(表1)。结果显示:乳样本高质量序列中G和C 2种碱基占总碱基的百分比大于44%,而环境样本均大于51%,此外高质量序列质量值大于或等于30的碱基所占的百分比均大于91%。

2.2 各样品的组装效率评估

采用宏基因组组装软件对测序样本进行组装,过滤掉组装结果中500 bp以下的片段。将测序数据比对到组装的开放阅读框架序列片段上以评估组装过程中序列利用率。牛舍垫土的比对到组装的可开放阅读框架序列在高质量序列中占的百分比为52.11%,其余样品为87%以上。

2.3 牧场环境和生鲜乳样本中微生物多样性分析

在门水平中(图1a),变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)是生鲜乳样本(头三把

奶、头三把奶之后的生鲜乳、储奶罐中生鲜乳)的两大优势门,总占比在75%以上。储奶罐生鲜乳中的变形菌门占比大于头三把奶及前三把之后的生鲜乳,而厚壁菌门的丰度接近(图1a)。TMR饲料中的变形菌门占比最大,为90%以上,远大于牛舍垫土和其它生鲜乳样本,牛舍垫土中则具有极为丰富的菌群多样性。假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、冷杆菌属(*Psychrobacter*)等革兰氏阴性嗜冷菌^[21]属于变形菌门,其中假单胞菌属、不动杆菌属是主要的蛋白质水解和脂肪水解菌群^[22]。相比较其它污染来源,牛舍垫土中微生物结构更加丰富,是牧场需要防控的重要风险点。

在属水平中(图1b),各样本均检出了丰度前三的嗜冷菌属。头三把奶之后生鲜乳及头三把奶中检出了高丰度的链球菌属(*Streptococcus*, 5.99%, 7.32%)和肠球菌属(*Enterococcus*, 4.74%, 5.52%)。储奶罐生鲜乳中也检出高丰度的链球菌属(2.28%)。TMR饲料中芽孢杆菌属(*Bacillus*, 2.27%)丰度较高。牛舍垫土中检出了海杆菌属(*Marinobacter*, 2.99%)及两面神菌属(*Janibacter*, 5.62%),这2个菌属的细菌多分离自冰山或深海沉积物,表明该菌属适宜在冷环境下生长,而该菌属是否会影响冷藏条件下的原料乳品质还尚不明确。为了更进一步探究储奶罐生鲜乳中潜在嗜冷菌群的来源。在冷藏条件下,假单胞菌属和不动杆

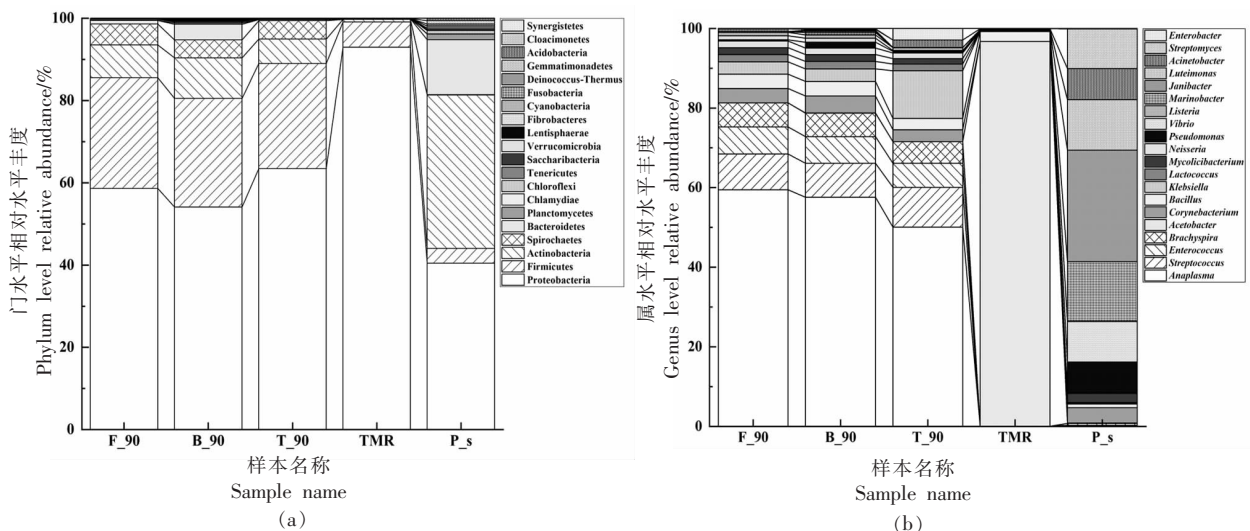


图1 牧场环境和生鲜乳中微生物多样性各水平中相对丰度

Fig.1 Relative abundance of microbial diversity at each level in farm environment and raw milk

菌属是对液态乳品质影响最大的菌群^[23]。在牛舍垫土和 TMR 饲料中,牛舍垫土中的假单胞菌属和不动杆菌属占比最大(分别为 1.57%,1.56%),且远远高于头三把奶(分别为 0.26%,0.54%)。此外,假单胞菌属和不动杆菌属在储奶罐中生鲜乳中丰度(分别为 0.32%,1.54%)明显高于头三把奶(分别为 0.26%,0.54%)。因此,牛舍垫土是导致储奶罐生鲜乳中假单胞菌属和不动杆菌属的重要污染源。然而,在冷藏条件下,嗜冷菌比中温菌、嗜温菌的生长速度更快,成为了储奶罐中生鲜乳的优势菌群。

2.4 牧场环境和生鲜乳样本中产蛋白酶(EC 3.4.24.40)的微生物多样性及基因丰度分析

从表 1 中可以看出不同样本中产蛋白酶的微生物多样性以及基因丰度。门水平上,在头三把奶中筛选出一个门,即变形菌门。牛舍垫土筛选出一个门,也为变形菌门。除此之外,其它样品中均未筛选出产蛋白酶菌株。

属水平上,头三把奶中仅筛选出一个菌属:即脱硫杆菌属(*Desulfobacter*),是一种杆状的硫酸盐

还原细菌,能够以 CO₂、H₂ 和硫酸盐作为唯一的碳源和能源的自养型嗜冷性微生物^[24-25],对生鲜乳不易造成质量破坏。牛舍垫土中筛选出了 6 个种,来源于 6 个属,分别为不动杆菌属、海茎状菌属(*Maricaulis*)、*Gynuella*、脱硫杆菌属、食烃菌属(*Hydrocarboniphaga*)、霍氏菌属(*Hahella*)。在微生物中,蛋白酶的代谢方式可分为 3 类,即胞内蛋白酶、胞壁蛋白酶和胞外蛋白酶。截至目前,胞外蛋白酶被认为是与牛奶腐败有关的单一或主要蛋白酶^[26]。在本研究中,不动杆菌属为生鲜乳中常见的产胞外酶的嗜冷菌属^[27],对乳品储藏造成质量缺陷(如 UHT 乳),而其它菌属的相关报道鲜见。在基因丰度中,牛舍垫土的基因相对丰度为 8.71。头三把奶的基因相对丰度为 0.18,且该基因与牛舍垫土的基因类型完全一致。可见,产蛋白酶的微生物与牛舍垫土具有较强联系,其次为头三把奶。因此,牧场需要对卫生环境进行严格把控,定期进行消毒。此外,在生鲜乳采集时,严格对奶牛的采集部位进行清洗消毒且丢弃头三把奶。

表 1 牧场环境及生鲜乳样本中产蛋白酶微生物来源及基因水平相对丰度

Table 1 Source and relative abundance of protease producing microorganisms at gene level in farm environment and raw milk samples

样品	菌属					
	脱硫杆菌属	霍氏菌属	海茎状菌属	食烃菌属	<i>Gynuella</i>	不动杆菌属
属相对丰度						
头三把奶(F_90)	100	0	0	0	0	0
牛舍垫土(P_s)	10.6742	3.3708	66.2921	3.3708	15.7303	0.5618
基因相对丰度						
头三把奶(F_90)	0.1833	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
牛舍垫土(P_s)	0.9292	0.2934	5.7708	0.2934	1.3694	0.0489

2.5 牧场环境样本和生鲜乳中产脂肪酶(EC 3.1.1.3)的微生物多样性及基因丰度分析

2.5.1 牧场环境和生鲜乳样本中产脂肪酶微生物丰度分析 从研究中发现产脂肪酶微生物主要来自 3 个门(图 2a),第一优势门为变形菌门。在 TMR 饲料及牛舍垫土中变形菌门占比远大于其它生鲜乳样本。变形菌门在头三把奶中的占比最小,从头三把奶到储奶罐中生鲜乳的占比增加约 6.86%。革兰氏阳性嗜冷菌主要含于厚壁菌门中,然而,此次在各样品中均未检出厚壁菌门。

产脂肪酶的微生物主要来自 36 个属,而不同

样本中菌属丰度存在差异,以丰度前十的菌属进行绘图(图 2b)。牛舍垫土中丰度前三的产脂肪酶的优势菌属均为嗜冷菌,包括不动杆菌属(14.58%)、海杆菌属(11.68%)、假单胞菌属(9.85%)。不动杆菌属和假单胞菌属是牛乳中主要的产脂解酶嗜冷菌属^[23]。海杆菌属^[28]适宜在冷环境下生长。在微生物多样性分析(2.3 节)结果中得出,海杆菌属的菌群丰度(2.99%)排在第 2 位,也为优势菌属。TMR 饲料中的产脂肪酶的优势菌属为醋菌属(*Acetobacter*,35.72%)、另外为驹形杆菌属(*Komagataeibacter*,35.18%)、海源杆菌属(*Id-*

iomarina, 24.22%)。头三把奶及头三把奶之后生鲜乳中产脂肪酶的绝对优势菌均为醋菌属(13.46%, 17.07%), 另外为不动杆菌属(7.69%, 2.44%)和假单胞菌属(3.85%, 2.44%)。储奶罐生鲜乳中产脂肪酶的绝对优势菌为醋菌属(18.75%), 另外为白蚁菌属(*Isoptericola*, 10.42%)和假单胞菌属(8.33%)。总而言之, 牛舍垫土中含有更为丰富的产脂肪酶微生物, 而微生物的主要来源为嗜冷菌。此外, 在生鲜乳样本(头三把奶、头三把奶之后生鲜乳、储奶罐中生鲜乳)中, 醋菌属是产脂肪酶的最多的菌

属。醋菌属在头三把奶中的菌属丰富度远远高于头三把奶之后的生鲜乳及储奶罐中生鲜乳。然而, 醋菌属属于嗜温菌, 在冷藏条件下生长较为缓慢, 因此, 使生鲜乳快速降温可有效减少嗜温菌数量, 从而降低脂肪酶含量。除醋菌属外, 在头三把奶和头三把之后生鲜乳中产脂肪酶最多的是嗜冷菌, 即不动杆菌属和假单胞菌属。然而, 与头三把奶和头三把之后生鲜乳不同的是, 储奶罐生鲜乳中产脂肪酶最多的嗜冷菌是假单胞菌属。

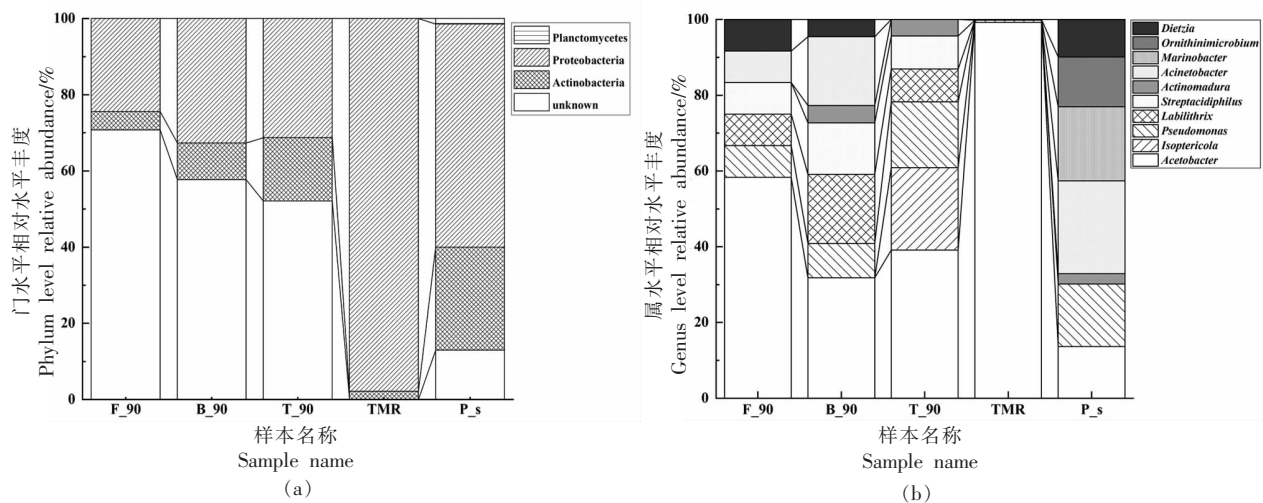


图2 牧场环境和生鲜乳中产脂肪酶微生物来源各水平相对丰度

Fig.2 Relative abundance of different levels of lipase-producing microorganisms in farm environment and raw milk

2.5.2 牧场环境和生鲜乳样本中产脂肪酶微生物基因丰度分析 所有样品中检出脂肪酶基因类别共计 87 类。对各样本中丰度前 10 的产脂肪酶的微生物属基因丰度及其基因类型进行了列表 (表 2), 其中已包括了头三把奶之后的生鲜乳、头三把奶及储奶罐生鲜乳中的所有基因。其中, 头三把奶 (11 类) 的基因种类最多, 其次是头三把奶之后的生鲜乳 (9 类), 储奶罐中生鲜乳 (7 类) 最少。值得注意的是, 储奶罐中生鲜乳的产脂肪酶微生物基因与头三把奶之后的生鲜乳、头三把奶的重复率分别为 85.71%, 57.14%。牛舍垫土及 TMR 饲料的产脂肪酶的基因检出种类和基因相对丰度远高于储奶罐中生鲜乳。然而, 牛舍垫土及 TMR 饲料的产脂肪酶的基因没有与储奶罐中生鲜乳中的重复。因此, 储奶罐生鲜乳中产脂肪酶微生物的直接来源大概率为头三把奶之后的生鲜乳, 其它原因

是储奶罐未清洁彻底而自身携带的微生物, 而来自于牛舍垫土及 TMR 饲料的可能性较小。

虽然各样本产脂肪酶微生物种类均较多, 但假单胞菌属是唯一一种在各样品中均存在的菌属。牛舍垫土中假单胞菌属的基因类型为 8 种, 基因丰度为 4.98。前三把之后生鲜乳及储奶罐中产脂肪酶的假单胞菌属基因均为 1 种, 头三把奶中产脂肪酶的假单胞菌属基因为 3 种, 其中 1 种与储奶罐中生鲜乳的基因一致。其丰度排序为: 头三把奶 (0.33) > 储奶罐中生鲜乳 (0.21) > 头三把奶之后的生鲜乳 (0.06)。综上所述, 牛舍垫土是生鲜乳中产脂肪酶假单胞菌属污染的主要来源。同时, 在冷藏条件下, 假单胞菌属的生长更加活跃, 成为污染储奶罐中生鲜乳的优势菌属。此外, 发现了 2 种产脂肪酶的潜在嗜冷菌属, 即迪茨菌属 (*Dietzia*)^[29-31] 及 *Ornithinimicrobium*^[32], 以及分枝杆菌属 (*My-*

表 2 牧场环境和生鲜乳中产脂肪酶微生物(属 TOP10)基因丰度及基因类型

Table 2 Gene abundance and gene types of lipase-producing microorganisms (genus of TOP10) in farm environment and raw milk

菌属	样品					共计
	头三把奶 (F_90)	头三把奶之 后的生鲜乳 (B_90)	储奶罐中生 鲜乳(T_90)	TMR 饲料 (TMR)	牛舍垫土 (P_s)	
醋菌属	0.43(4)	0.38(2)	0.49(2)	99.02(6)	4.10(3)	11
白蚁菌属	0.00	0.00	0.27(1)	0.00	0.00	1
假单胞菌属	0.33(3)	0.06(1)	0.21(1)	0.28(2)	4.98(8)	10
<i>Labiluhrix</i>	0.06(1)	0.22(1)	0.11(1)	0.00	0.00	1
链嗜酸菌属(<i>Streptacidiphilus</i>)	0.06(1)	0.17(1)	0.11(1)	0.00	0.00	1
马杜拉放线菌属(<i>Actinomadura</i>)	0.00	0.06(1)	0.05(1)	0.00	0.83(1)	2
不动杆菌属	0.06(1)	0.22(2)	0.00	0.00	7.38(12)	13
迪茨菌属	0.06(1)	0.06(1)	0.00	0.00	2.98(5)	6
海杆菌属	0.00	0.00	0.00	0.09(1)	5.19(7)	7
<i>Ornithinimicrobium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	3.96(7)	7

注:括号中的数值表示产脂肪酶的基因类型。

cobacterium)及红球菌属(*Rhodococcus*)等常见嗜冷菌属,而该菌属并未在储奶罐生鲜乳中检出,说明其对储奶罐中生鲜乳的污染并不明显。

3 结论

本研究对牧场境样本(牛舍垫土、TMR 饲料)和生鲜乳样本(头三把奶、头三把奶之后生鲜乳、储奶罐中生鲜乳)进行抽样,利用宏基因组测序平台调查各样本的酶类分布情况及丰度。基于微生物及其嗜冷菌的种类和基因分布明确揭示了胞外蛋白酶(EC 3.4.24.40)及脂肪酶(EC 3.1.1.3)对储奶罐中生鲜乳的污染情况。该研究得出了各样本中蛋白酶和脂肪酶的基因丰度和基因类别的差异,能为储奶罐中生鲜乳的微生物及其嗜冷菌污染来源提供更加清晰的判断标准。

在微生物多样性中,得出储奶罐中生鲜乳的绝对优势门为变形菌门,这是革兰氏阴性嗜冷菌的潜在菌门,同时,得出了储奶罐中生鲜乳的主要污染来源为牛舍垫土和头三把奶,为储奶罐中生鲜乳的污染来源的调查提供一定的参考。产蛋白酶(EC 3.4.24.40)的菌群丰富度较于产脂肪酶(EC 3.1.1.3)的菌群丰度小。牛舍垫土中蛋白酶的基因丰度约为头三把奶的 50 倍,且头三把奶中的全部基因和牛舍垫土中的部分基因一致。在产脂肪

酶(EC 3.1.1.3)的基因筛选中,牛舍垫土的基因丰度远高于其它样品,且丰度前三的优势菌属均为嗜冷菌,即不动杆菌属、海杆菌属、假单胞菌属。头三把奶及头三把奶之后生鲜乳中产脂肪酶的基因优势来源为醋菌属(嗜温菌),其次为嗜冷菌,即不动杆菌属和假单胞菌属,储奶罐中生鲜乳的优势菌为醋菌属(嗜温菌),其次为假单胞菌属。三把奶、头三把奶之后的生鲜乳的产脂肪酶基因与储奶罐中生鲜乳的基因重复率分别为 57.14%、85.71%,优势菌为假单胞菌属,其丰度为:头三把奶(0.33)、储奶罐中生鲜乳(0.21)及头三把奶之后的生鲜乳(0.06)。可见,储奶罐中生鲜乳的产脂肪酶基因大概率来源于头三把奶之后的生鲜乳,且丰度升高。牛舍垫土和 TMR 饲料中产脂肪酶的基因丰度显著高于储奶罐中生鲜乳,优势菌为假单胞菌属和不动杆菌属。然而,其中的产脂肪酶基因未能与储奶罐中生鲜乳的基因重复。除此之外,在储奶罐生鲜乳中还检出较多具有嗜温特性的醋菌属。

本研究结果表明该牧场生鲜乳中耐热酶的污染来源主要为嗜冷菌,为假单胞菌属和不动杆菌属。牛舍垫土通过污染奶牛乳头,在挤奶环节进入生鲜乳收集管路而造成污染。然而,储奶罐中生鲜乳的耐热酶来源主要为前三把之后生鲜乳、储奶

罐本身以及温度控制不当所致。因此,为了防止储奶罐中生鲜乳的微生物污染,除了严格执行丢弃头三把奶的强制性制度外,应对挤奶器械、储奶设备进行严格清洗消毒。同时,对刚采集的生鲜乳进行立即降温处理,能高效防止嗜温菌的生长,从而减少脂解酶的产生。此外,定期对牛舍垫土进行消毒、翻晒和更换,从而合理控制微生物及嗜冷菌数量。

参 考 文 献

- [1] NEW F N, BRITO I L. What is metagenomics teaching us, and what is missed[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2020, 74(1): 117–135.
- [2] MONTEL M C, BUCHIN S, MALLET A, et al. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 177(54): 136–154.
- [3] COLLINS T, MARGESIN R. Psychrophilic lifestyles: Mechanisms of adaptation and biotechnological tools [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(7): 2857–2871.
- [4] BAGLINIÈRE F, TANGUY G, SALGADO R L, et al. Ser2 from *Serratia liquefaciens* L53: A new heat stable protease able to destabilize UHT (AUG.15) milk during its storage[J]. *Food Chemistry*, 2017, 229: 104–110.
- [5] LI N, WANG Y Z, YOU C P, et al. Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1–10.
- [6] BAGLINIÈRE F, SALGADO R L, SALGADO C A, et al. Biochemical characterization of an extracellular heat-stable protease from *Serratia liquefaciens* isolated from raw milk [J]. *Journal of Food Science*, 2017, 82(4): 952–959.
- [7] YUAN L, SADIQ F A, BURMØLLE M, et al. Insights into bacterial milk spoilage with particular emphasis on the roles of heat-stable enzymes, biofilms, and quorum sensing[J]. *Journal of Food Protection*, 2018, 81(10): 1651–1660.
- [8] D'INCECCO P, BRASCA M, ROSI V, et al. Bacterial proteolysis of casein leading to UHT milk gelation: An applicative study[J]. *Food Chemistry*, 2019, 292: 217–226.
- [9] VITHANAGE N R. Mapping the thermo-tolerant proteases in ultra high temperature (UHT) treated milk using molecular approaches [D]. Melbourne: Victoria University, 2017.
- [10] ZHANG C, BIJL E, SVENSSON B, et al. The extracellular protease AprX from *Pseudomonas* and its spoilage potential for UHT milk: A review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(4): 834–852.
- [11] MACHADO S G, BAGLINIÈRE F, MARCHAND S, et al. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 302.
- [12] MARTINS M L, PINTO U M, RIEDEL K, et al. Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015, 46(1): 207–217.
- [13] DU B Y, MENG L, LIU H M, et al. Diversity and proteolytic activity of *Pseudomonas* species isolated from raw cow milk samples across China[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 838(Pt 3): 156382.
- [14] CARRIÈRE F, THIRSTRUP K, HJORTH S, et al. Cloning of the classical guinea pig pancreatic lipase and comparison with the lipase related protein 2[J]. *FEBS Letters*, 1994, 338(1): 63–68.
- [15] ABDEL-HAMIED M R, AKRAM A A, SALHA G, et al. Characterization and optimization of lipase activity produced by *Pseudomonas monteilli* 2403 – KY120354 isolated from ground beef [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2017, 16(2): 96–105.
- [16] REN T J, FRANK J F, CHRISTEN G L. Characterization of lipase of *Pseudomonas fluorescens* 27 based on fatty acid profiles[J]. *Journal of Dairy Science*, 1988, 71(6): 1432–1438.
- [17] PEREIRA F, LUIZ L L, BRUZAROSKI S R, et al. The effect of cold storage, time and the population of *Pseudomonas* species on milk lipolysis [J]. *Grasas y Aceites*, 2019, 70(2): e300.
- [18] BOKULICH N A, MILLS D A. Facility-specific 'house' microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2013, 79(17): 5214–5223.
- [19] BOKULICH N A, BERGSVEINSON J, ZIOLA B,

- et al. Mapping microbial ecosystems and spoilage-gene flow in breweries highlights patterns of contamination and resistance[J]. *ELife*, 2015, 4(4): e04634.
- [20] DOYLE C J, GLEESON D, O'TOOLE P W, et al. Impacts of seasonal housing and teat preparation on raw milk microbiota: A high-throughput sequencing study[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 83(2): e02694.
- [21] ADDIS M, TANCA A, UZZAU S, et al. The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from-omics studies[J]. *Molecular Biosystems*, 2016, 12(8): 2359-2372.
- [22] MCHUGH A J, FEEHILY C, FENELON M A, et al. Tracking the dairy microbiota from farm bulk tank to skimmed milk powder[J]. *Msystems*, 2020, 5(2): e00226-20.
- [23] FUSCO V, CHIEFFI D, FANELLI F, et al. Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(4): 2013-2049.
- [24] MARIETOU A, KJELDSEN KU, GLOMBITZA C, et al. Response to substrate limitation by a marine sulfate-reducing bacterium[J]. *ISME J*, 2022, 16(1): 200-210.
- [25] WIDDEL F. New types of acetate-oxidizing, sulfate-reducing *Desulfobacter* species, *D. hydrogenophilus* sp. nov., *D. latus* sp. nov., and *D. curvatus* sp. nov [J]. *Archives of Microbiology*, 1987, 148(4): 286-291.
- [26] MATÉOS A, GUYARD-NICODÈME M, BAGLIN-IÈRE F, et al. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk[J]. *International Dairy Journal*, 2015, 49: 78-88.
- [27] VON NEUBECK M, BAUR C, KREWINKEL M, et al. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 211: 57-65.
- [28] LAY C Y, MYKYTCZUK N, NIEDERBERGER T D, et al. Microbial diversity and activity in hypersaline high Arctic spring channels[J]. *Extremophiles*, 2012, 16(2): 177-191.
- [29] WANG W P, CAI B B, SHAO Z Z. Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium *Dietzia maris* As-13-3[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 711.
- [30] GHARIBZAHEDI S M T, RAZAVI S H, MOUSAVI S M. Characterization of bacteria of the genus *Dietzia*: An updated review[J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(1): 1-11.
- [31] FANG H, XU J B, NIE Y, et al. Pan-genomic analysis reveals that the evolution of *Dietzia* species depends on their living habitats [J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 23(2): 861-877.
- [32] HUO Y, KANG J P, AHN J C, et al. *Ornithinimicrobium panacihumi* sp. nov., antagonistic bacteria against root rot fungal pathogens, isolated from cultivated ginseng soil[J]. *Current Microbiology*, 2019, 76(1): 22-28.

Analysis of Pollution Source of Thermostable Enzymes in Raw Milk Based on Metagenomic Technology

Dai Liangchao¹, Pang Xiaoyang², Hu Shaozhen⁴, Yu Dongwei³, Lü Jiaping²,
Lu Gang³, Wu Junrui^{1*}, Zhang Shuwen^{2*}

¹College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866

²Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193

³Inner Mongolia Meng Niu Dairy (Group) Co., Ltd., Hohhot 011517

⁴College of Life Sciences and Technology, Tarim University, Alaer 843300, Xinjiang)

Abstract Thermostable enzymes in raw milk can seriously affect the quality stability of the shelf life of products. However, the main sources and contamination pathways of thermostable enzymes have been debated. In this study, metagenomic technology was performed to analyze the microbial community composition and gene abundance of extracellular pro-

tease (EC 3.4.24.40) and lipase (EC 3.1.1.3) in environmental samples (barn bedding soil, TMR feed) and fresh milk samples (the first three milk, after the first three of milk, and raw milk of storage tank) from a farm in China. This study aimed to investigate the source of thermostable enzyme contamination of raw milk in milk storage tanks. The results of diversity analysis showed that the abundance of typical psychrophilic bacteria such as *Pseudomonas* (1.57%) and *Acinetobacter*(1.56%) in the barn bedding soil was much higher than that of the other samples. It was much higher than the first three milk (0.26%, 0.54%). Through gene analysis of microbial enzyme production, the microorganisms that thermostable enzymes in raw milk of storage tank were mainly from psychrophilic bacteria, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. The abundance of extracellular protease-producing genes in each sample was barn bedding soil: 8.71 and the first three milk: 0.18; the abundance of extracellular lipase-producing genes in each was barn bedding soil: 16.19, TMR feed: 0.33, the first three milk: 0.18, after the first three of milk: 0.39 and raw milk of storage tank: 0.22. In addition, the lipase gene of raw milk in storage tanks had the lowest gene duplication of 57.14% during the raw milk collection line. In addition, microorganisms and their psychrophilic bacteria contaminate the teats of cows through barn bedding soil. Then, they enter the raw milk collection line and cause contamination during milking. This study provided a theoretical and data basis for the effective prevention and control of thermostable enzymes contamination in raw milk.

Keywords raw milk; metagenomic; psychrophilic bacteria; thermostable enzyme; pollution source