

基于三代测序技术分析新疆鲜马奶和酸马奶中乳酸菌菌群结构

蔡宏宇, 刘文俊, 沈玲玲, 王 佼, 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业部奶制品加工重点实验室
内蒙古乳品生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要 传统酸马奶受制作环境和工艺的影响,其菌群结构有所不同。本文运用 Pacbio SMRT 测序技术,基于乳酸菌特异性引物对新疆部分地区酸马奶和鲜马奶的乳酸菌菌群进行研究,结果表明:鲜马奶中乳酸菌丰富,以瑞士乳杆菌(35.52%)、唾液链球菌(10.11%)、乳酸乳球菌(9.49%)、嗜热链球菌(5.96%)以及德氏乳杆菌(5.37%)为主要乳酸菌菌种。酸马奶以瑞士乳杆菌(61.77%)、马乳酒样乳杆菌(14.91%)、乳酸乳球菌(9.76%)为主要乳酸菌菌种。鲜马奶中腐生葡萄球菌(4.45%)、金黄色葡萄球菌(2.62%)含量显著($P<0.05$)高于酸马奶且具有致病性。此外,一些条件致病的链球菌属菌种在鲜马奶中被检出,具有潜在的安全风险,不建议直接饮用。酸马奶中含量较高的瑞士乳杆菌和桥乳杆菌显著正相关($r=0.582, P<0.01$)。鲜马奶和酸马奶具有不同的乳酸菌菌群特征,自然发酵的酸马奶品质参差不齐。本文应用的乳酸菌特异性引物为低丰度乳酸菌菌种的挖掘提供参考,为酸马奶的工业化生产提供理论依据。

关键词 马奶; Pacbio SMRT 测序; 乳酸菌特异性引物; 乳酸菌多样性

文章编号 1009-7848(2022)02-0291-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.02.031

新疆地区草原面积广阔,畜牧业发达,生活着一些游牧民族,如哈萨克族等,古老的游牧民族孕育了悠久的乳制品制作和食用历史,一些传统发酵乳制品的制作方式传承至今,仍是人们生活中不可或缺的一部分^[1]。酸马奶,也叫马奶酒,就是其中的一种,是以鲜马奶为原料,经乳酸菌等微生物发酵后产生的一种低酒精酸味乳饮料。鲜马奶的营养成分接近人乳,容易被消化吸收,发酵过程中乳糖被代谢产生有机酸和乙醇,其它成分基本保持不变^[2]。酸马奶凭借营养价值高,能有效抑制有害菌等优点改善了人们的身体状况,对心血管疾病、消化道感染、糖尿病以及精神性疾病等均能产生一定的辅助治疗作用^[3]。

乳酸菌是一类能将可利用的碳水化合物代谢生成乳酸的无芽孢、革兰氏阳性细菌,广泛存在于发酵制品中,且很多乳酸菌具有一定的益生作用^[4-6]。

目前关于发酵制品的乳酸菌菌群结构的研究十分广泛^[7-8]。本研究团队前期基于 7 个属的 443 个乳酸菌菌种的 16S rRNA 设计乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 特异性引物,经论证其对于挖掘低丰度的乳酸菌菌种具有优势^[9]。Pacific Biosciences 公司研发的单分子实时测序系统 (Pacbio SMRT 测序技术) 是一种具有长读长、高通量、快速以及免 PCR 等优点的第 3 代测序技术,现被广泛应用于菌种检测^[10-11]。结合纠错软件,其准确率可达 99.9%^[12]。

本文运用 Pacbio SMRT 测序技术,基于 LAB 特异性引物对鲜马奶和酸马奶中的乳酸菌菌群结构进行探究,以期阐明自然发酵状态下乳酸菌在鲜马奶和酸马奶中的菌群特征,丰富酸马奶乳酸菌菌群研究基础数据,为乳酸菌的质量控制和品质改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验试剂及仪器

RNA/DNA 保护液,大连宝生物工程有限公司;OMEGA DNA isolation kit,美国 OMEGA 公司;5×TBE 电泳缓冲液(Tris 碱 54 g、硼酸 27.5 g、 $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.72 g,定容 1 L,pH 8.0)、1.0%琼脂糖凝胶(1.0 g 琼脂糖溶于 100 mL 0.5×TBE 缓

收稿日期: 2021-02-26

基金项目: 现代农业(奶牛)产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-36);内蒙古自治区自然科学基金项目(2019ZD06);国家自然科学基金项目(31972095);内蒙古自治区科技计划项目(201802097)

作者简介: 蔡宏宇(1996—),女,硕士生

通信作者: 张和平 E-mail: hepingdd@vip.sina.com

冲液),天津基准化学试剂公司;DL2000 DNA Marker,宝日医生物技术有限公司;KAPA HiFi HotStartReadyMix PCR Kit,KAPA公司;PacBio SMRTbell™ Template Prep Kit 1.0、DNA/Polymerase Binding Kit P6 V2、DNA Sequencing Kit 4.0 V2,Life Technologies公司。

Eppendorf 5810R 台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;DYY-12 电泳仪,北京六一仪器厂;UPV 凝胶成像分析系统,北京赛智创业科技有限公司;微量紫外分光光度计,NanoDrop 公司;ProFlex™ PCR 仪,美国 Applied Biosystems 公司;Pacifico SMRT RS II 测序平台,美国 Pacific Bioseiences 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集 样品采自新疆伊犁哈萨克地区的昭苏县(东经 80°08'~81°30',北纬 43°09'~43°15')和阿克陶县(东经 73°26'~76°43',北纬 37°41'~39°29'),共 19 份样品,其中酸马奶 11 份,鲜马奶 8 份。同一采样点既采集鲜马奶也采集酸马奶,具体信息见表 1。吸取搅拌均匀的 30 mL 鲜马奶或酸马奶至 50 mL 无酶无菌采样管中,加入 10 mL DNA 保护液,混匀后用液氮极速冷冻 1 min,置于低温(2~8 °C)采样箱中运回实验室,-80 °C 冷藏备用。

1.2.2 宏基因组提取 使用 OMEGA DNA isolation kit 试剂盒提取鲜马奶和酸马奶样品中微生物的宏基因组,具体操作参照试剂盒中的说明书。用微量紫外分光光度计检验 DNA 的浓度和纯度,保留 OD_{260nm}/OD_{280nm} 值在 1.8~2.0、质量浓度大于 20 ng/μL 的 DNA,于-20 °C 低温保存。

1.2.3 乳酸菌基因组扩增 使用 KAPA HiFi HotStartReadyMix PCR Kit,以本实验室设计并评估过的 LAB 特异性引物(正向引物 15F GCTCAGGAYGAACGCYGG,反向引物 687R CACCGCTACACATGRADTTC)为扩增引物,对乳酸菌 DNA 进行 PCR 扩增。反应体系:正向引物(10 μmol/L)1.5 μL,反向引物(10 μmol/L)1.5 μL,模板 DNA (<100 ng)1.5 μL,KAPA Mix 25 μL,ddH₂O 补足至 50 μL。反应程序:95 °C 预变性 3 min,98 °C 变性 20 s,60 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 30 s,26 个循环;72 °C 末端延伸 2 min。用 1.0% 琼脂糖

凝胶电泳结合 2 000 bp 的 DNA Mark 预估 PCR 产物的扩增情况及其完整度,用磁珠法对电泳目标条带清晰的 PCR 产物进行纯化,纯化产物于-20 °C 冷藏备用。

1.2.4 Pacbio SMRT 测序 使用 Pacific Bio-seiences SMRTbell™ Template Prep Kit 1.0,对纯化后满足测序量(2 μg)的 PCR 产物构建文库,使用 DNA/Polymerase Binding Kit P6 V2、DNA Sequencing Kit 4.0 V2 等试剂上机测序。建库上机的具体操作参照厂家提供的操作流程。

1.2.5 数据下机及分析 通过 Pacific Bio-seiences 公司提供的服务平台(smrtanalysis_2.3.0.140936.p5.167094),运用 RS_ReadsOfInsert.1 对完成测序的序列进行质控,质控条件:最小循环次数为 5 次,最小预测精确度为 90,最小插入序列长度为 550 bp,最大序列长度为 950 bp^[9]。将 19 份样品的测序结果(原始数据)上传至 MG-RAST(项目编号:mgp96186)。

借助 QIIME(v1.9.1)平台对质控后的序列进行生物信息学分析。运用 PyNAST 对序列进行比对校准后,以 97% 的相似性阈值划分操作分类单元(Operational taxonomic units, OTU),选取一条序列作为该 OTU 的代表性序列进行同源性比对,确定其分类学地位。用于序列同源性比对的数据库有 RDP (Ribosomal database project)、Green-genes(V13.8)和 Silva V128。整合 3 个数据库的比对结果,挑选属于目标菌属的 OTU。整合目标 OTU 的序列后重新进行比对校准、OTU 划分,分类学地位确定,得到最终注释结果。

结合 PyNAST,使用 FastTree 构建 OTU 代表性序列的系统发育树,计算各样品的 Chao1 指数、辛普森指数(Simpson index)、香农指数(Shannon index)、发现物种数(Observed_species),结合物种含量评估样品的生物多样性。

1.2.6 数据处理 试验数据的统计分析和可视化基于 R 语言(v4.0.2)和 Origin(v9.7.5.184)。

2 结果与讨论

2.1 鲜马奶和酸马奶中乳酸菌的 α 多样性

对 19 份样品的乳酸菌基因组的测序结果进行质控后,运用 QIIME 平台进行生物信息学分

析。其中, QIIME 平台计算的辛普森指数越大, 说明样品的多样性越高。本文测序结果的辛普森指数随序列数目的增加逐渐升高, 最终趋于稳定, 到达平台期(见图 1), 说明测序量满足后续分析要求。

以样品类别为分组依据, 对 α 多样性指数进行 mann-whitney 显著性检验, 结果显示: 鲜马奶样品的物种丰度和丰富度显著 ($P < 0.005$) 高于酸马奶样品, 与张猛等^[13]对鲜马奶和酸马奶细菌多样性的分析结果一致。

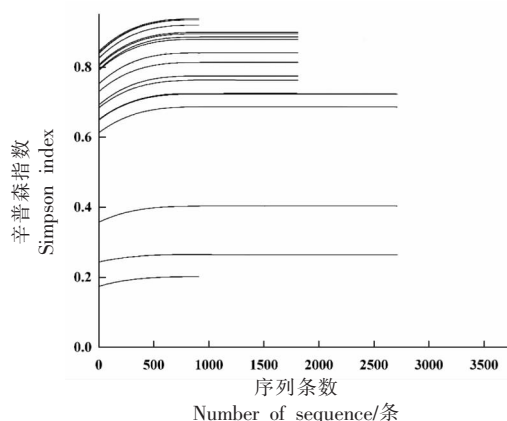


图 1 乳酸菌基因测序结果的辛普森指数

Fig.1 Simpson index of lactic acid bacteria gene sequencing results

表 1 鲜马奶和酸马奶样品信息及乳酸菌的 α 多样性

Table 1 The information and alpha diversity of lactic acid bacteria of fresh mare milk and Koumiss

样品	类别	采样点	发现物种数	香农指数	Chao 1 指数	辛普森指数
S1	酸马奶	新疆尼勒克阿尔斯朗沟第 5 家	85.87	3.16	164.20	0.76
S2	酸马奶	新疆尼勒克阿尔斯朗沟第 4 家	84.95	2.65	184.12	0.69
S3	酸马奶	新疆尼勒克阿尔斯朗沟第 1 家	63.30	2.85	104.79	0.72
S4	酸马奶	新疆尼勒克巴尔盖提沟冬季牧场	81.19	2.67	153.43	0.72
S5	酸马奶	新疆昭苏县伊犁乡种马场第 4 家	83.04	3.14	156.37	0.77
S6	酸马奶	新疆昭苏县伊犁乡种马场第 2 家	116.49	4.20	194.58	0.90
S7	酸马奶	新疆昭苏县伊犁乡种马场第 2 家	24.48	0.76	51.68	0.77
S8	酸马奶	新疆昭苏县伊犁乡种马场第 2 家	108.00	4.04	189.67	0.89
S9	酸马奶	新疆昭苏县伊犁乡种马场第 1 家	76.94	2.89	134.29	0.72
S10	酸马奶	新疆昭苏县乌尊布拉克乡布兰家	65.67	1.17	112.35	0.26
S11	酸马奶	新疆昭苏县乌尊布拉克乡布兰家	59.10	1.58	109.48	0.40
X1	鲜马奶	新疆尼勒克阿尔斯朗沟第 5 家	99.85	3.68	211.66	0.84
X2	鲜马奶	新疆尼勒克阿尔斯朗沟第 4 家	129.82	4.34	255.54	0.90
X3	鲜马奶	新疆尼勒克阿尔斯朗沟第 1 家	145.62	4.29	229.38	0.88
X4	鲜马奶	新疆尼勒克巴尔盖提沟冬季牧场	151.05	5.14	326.66	0.94
X5	鲜马奶	新疆昭苏县伊犁乡种马场第 4 家	140.09	5.08	276.34	0.94
X6	鲜马奶	新疆昭苏县伊犁乡种马场第 2 家	99.34	3.71	166.99	0.81
X7	鲜马奶	新疆昭苏县伊犁乡种马场第 1 家	145.83	4.93	237.66	0.92
X8	鲜马奶	新疆昭苏县乌尊布拉克乡布兰家	90.80	4.82	143.26	0.94

2.2 鲜马奶和酸马奶中乳酸菌菌群结构

基于 OTU 注释结果对样品的乳酸菌菌群组成进行统计分析。在属水平上, 19 个样品注释到 7 个含量大于 0.1% 的乳酸菌菌属, 在样品中的分布见图 2。另外, 酸马奶以乳杆菌属 (*Lactobacillus*, 84.87%)、乳球菌属 (*Lactococcus*, 9.81%) 及链球菌

属 (*Streptococcus*, 5.10%) 为优势属; 鲜马奶以乳杆菌属 (*Lactobacillus*, 48.38%)、链球菌属 (*Streptococcus*, 21.07%)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*, 12.77%)、乳球菌属 (*Lactococcus*, 10.04%)、肠球菌属 (*Enterococcus*, 5.35%) 及魏斯氏菌属 (*Weissella*, 1.27%) 为优势属。

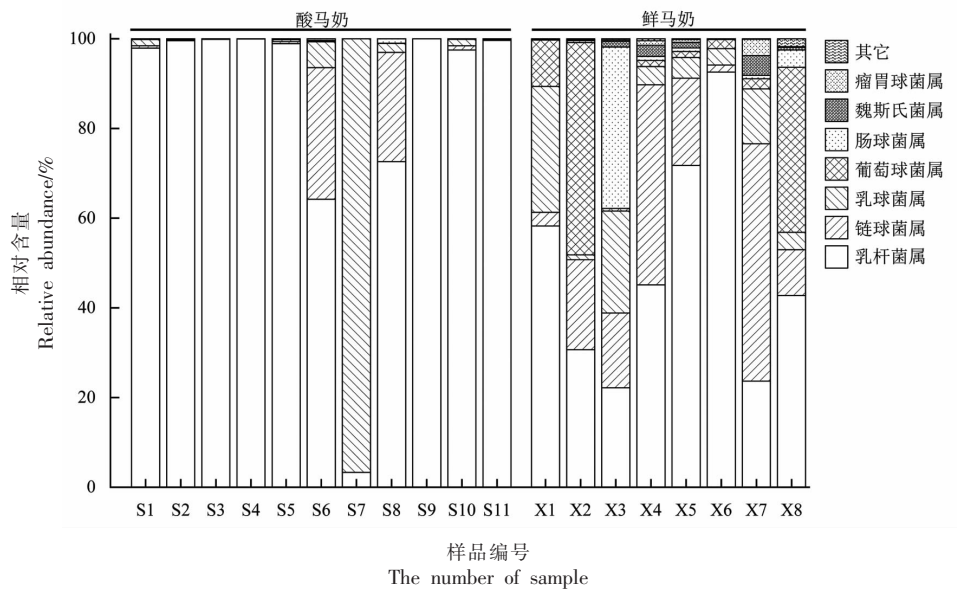


图2 酸马奶和鲜马奶中乳酸菌属水平上的菌群组成

Fig.2 The composition of lactic acid bacteria in Koumiss and fresh mare milk in the genus level

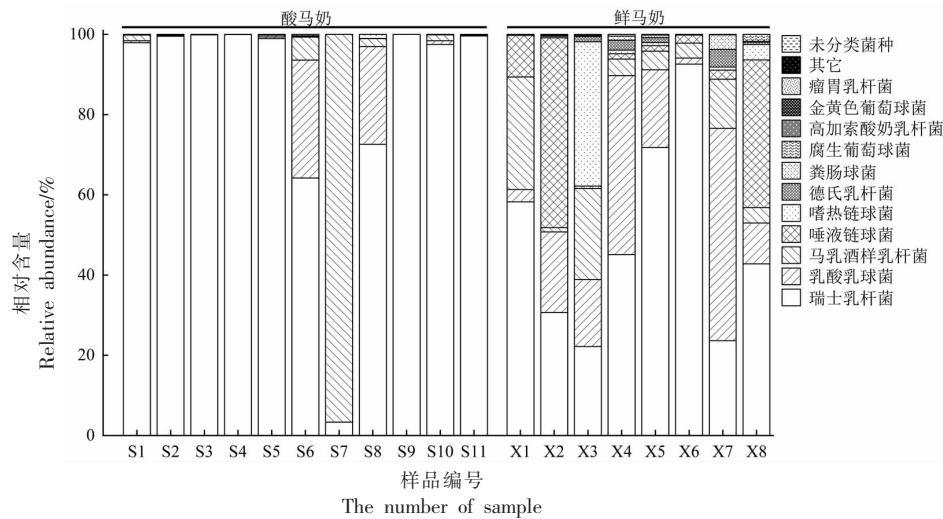


图3 酸马奶和鲜马奶中乳酸菌种水平上的菌群组成

Fig.3 The composition of lactic acid bacteria in Koumiss and fresh mare milk in species level

在种水平上,19个样品共注释到109个乳酸菌菌种,其中,相对含量大于1%的乳酸菌菌种在各样品中的分布如图3所示。在酸马奶中共注释到52个乳酸菌菌种,其中,瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*,61.77%)、马乳酒样乳杆菌(*Lactobacillus kefirianus*,14.91%)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*,9.76%)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*,4.13%)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*,3.76%)、高加索酸奶乳杆菌(*Lactobacillus kefiri*,2.15%)及桥乳杆菌(*Lacto-*

bacillus pontis,1.06%)等7个菌种为酸马奶的优势乳酸菌菌种。在鲜马奶中共注释到103个乳酸菌菌种,其中,瑞士乳杆菌(35.52%)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*,10.11%)、乳酸乳球菌(9.49%)、嗜热链球菌(5.96%)、德氏乳杆菌(5.37%)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*,4.8%)、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*,4.45%)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,2.62%)、瘤胃乳杆菌(*Lactobacillus ruminis*,2.40%)、松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*,2.05%)、琥珀葡萄球

菌 (*Staphylococcus succinus*, 1.8%)、唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*, 1.2%) 及融合魏斯氏菌 (*Weissella confusa*, 1.1%) 等 13 个菌种为鲜马奶的优势乳酸菌菌种。

可以看出,鲜马奶乳酸菌菌群十分丰富,除了一些常见于发酵制品的乳酸菌菌种外,还发现一些具有致病性的菌种,如腐生葡萄球菌、金黄色葡萄球菌等容易引起食物中毒的菌种,以及轻链球菌 (*Streptococcus mitis*)^[14]、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)^[15]、解没食子酸链球菌 (*Streptococcus gallolyticus*)^[16]、肺炎链球菌 (*Streptococcus pasteurianus*)^[17]和巴黎链球菌 (*Streptococcus_lutei*)^[18]等容易引起各类炎症反应的菌种。这可能是由于开放的挤奶环境以及未杀菌处理的传统发酵工艺造成的。然而,随着鲜马奶的持续发酵,

pH 3.8 的酸性环境使大部分致病菌无法生存^[19],提高了酸马奶的饮用安全性。

相比于鲜马奶,酸马奶具有更加简单的乳酸菌菌种组成,这与 α 多样性的检验结果一致。其原因可能是酸马奶低温、微氧且代谢产生乙醇的发酵环境^[20]抑制了部分菌种的生长繁殖;同时为部分乳酸菌菌种提供了生长条件,例如在富氮环境中,酿酒酵母通过分泌代谢产物(尤其是氨基酸)来调节其代谢,从而使 *Lactococcus lactis* 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 得以生存^[21]。

用 Pacbio SMRT 测序技术检测细菌菌种,莫兰馨^[22]发现内蒙古锡林郭勒盟的酸马奶以副乳房链球菌 (*Streptococcus parauberis*, 62.82%)、瑞士乳杆菌 (27.12%) 为优势菌种,马乳酒样乳杆菌、高加索酸奶乳杆菌、德氏乳杆菌等菌种只在个别样品

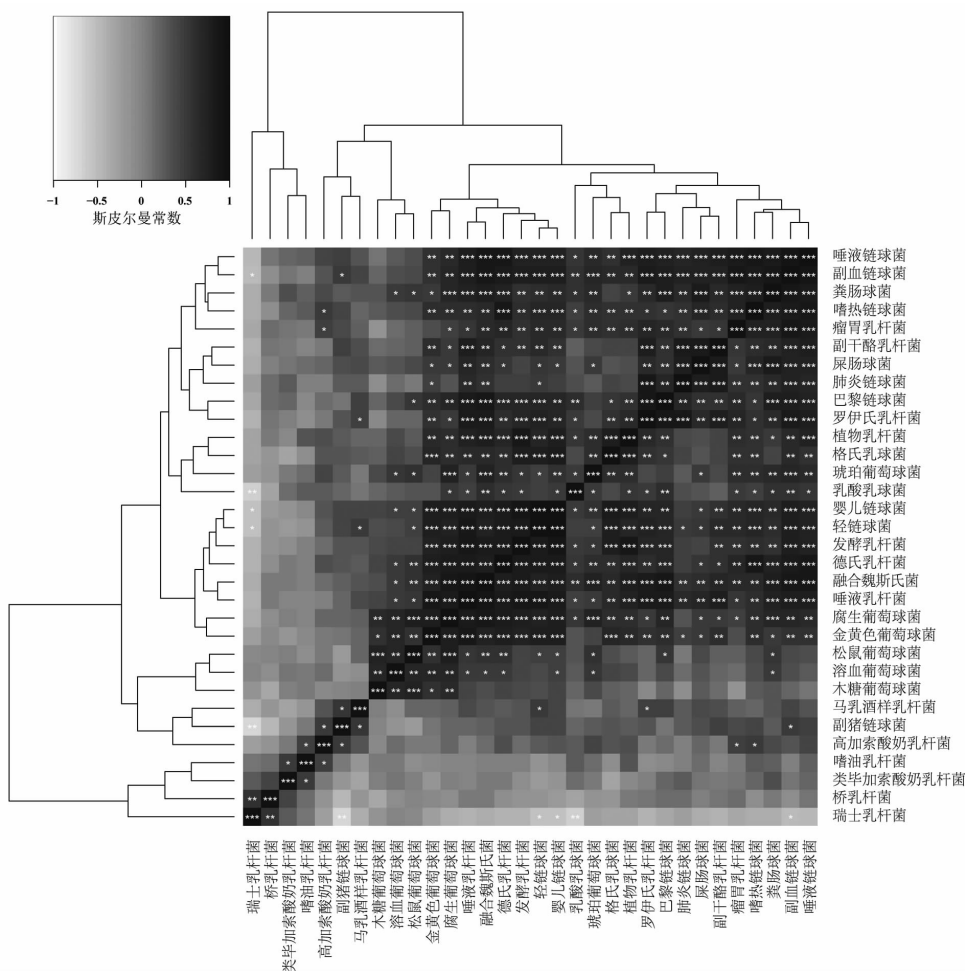


图 4 鲜马奶和酸马奶样品中乳酸菌菌种相关性热图

Fig.4 Heatmap of correlation of lactic acid bacteria species in fresh mare milk and Koumiss

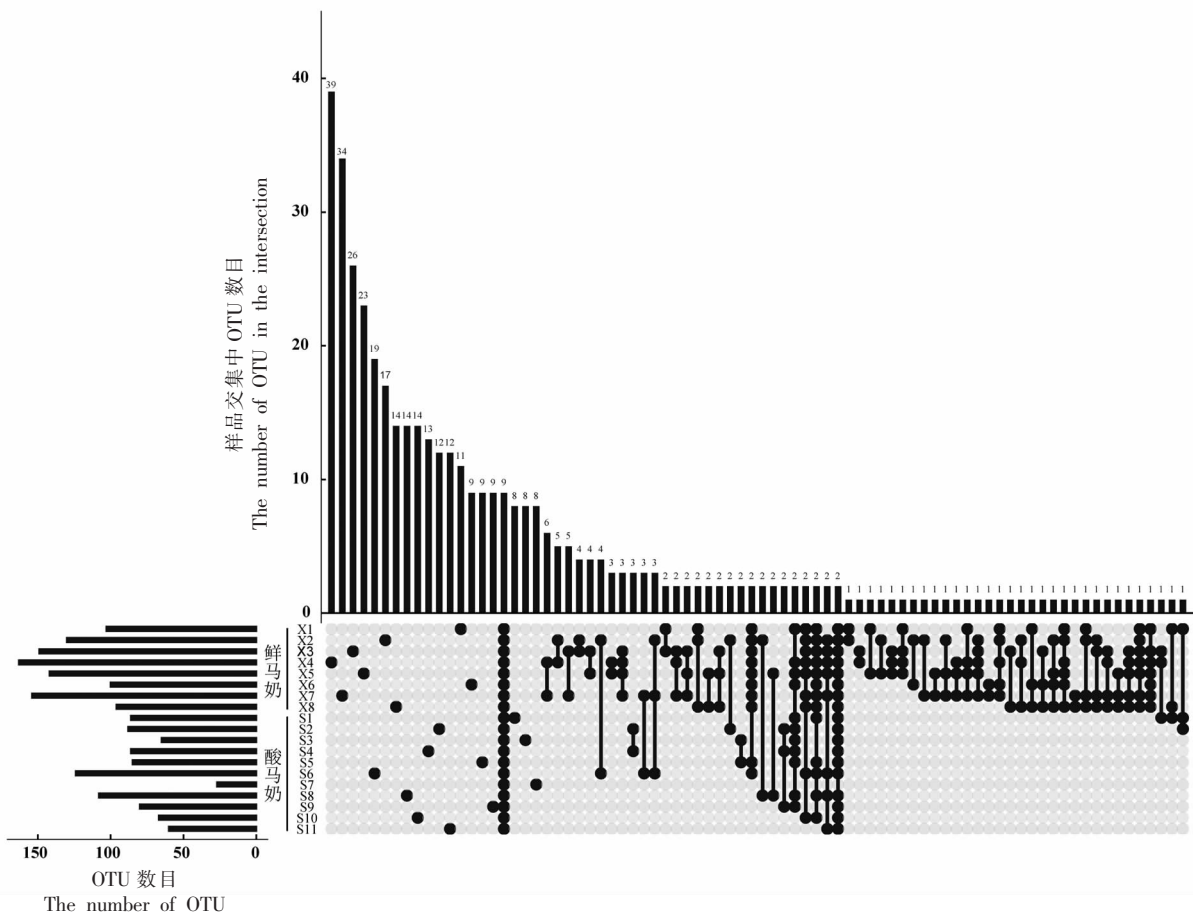
中检出。刘文俊等^[23]发现蒙古国酸马奶以瑞士乳杆菌(94.64%)和乳酸乳球菌(1.70%)为优势菌种,而马乳酒样乳杆菌、高加索酸奶乳杆菌等菌种丰度很低。以上两组结果是基于16S rRNA全长的细菌菌群结构的分析。结合本文酸马奶乳酸菌菌群结构,可以发现酸马奶中的细菌以乳酸菌为主,不同地区的酸马奶中的乳酸菌菌群结构存在差异,而瑞士乳杆菌在不同地区的酸马奶中均具优势,可能是因其适应酵母发酵环境^[24],且大量瑞士乳杆菌菌株被研究证实具有益生特性^[25]。

基于乳酸菌菌种的相对含量做相关性(Spearman 相关系数)分析,部分结果见图4。相对含量大于0.1%的乳酸菌菌种中,瑞士乳杆菌与桥乳杆菌显著正相关($r=0.582, P<0.05$),与副猪链球菌(*Streptococcus parasuis*, $r=-0.503$)、轻链球菌

($r=-0.542$)以及副血链球菌(*Streptococcus parasanguinis*, $r=-0.685$)等显著($P<0.05$)负相关。瑞士乳杆菌与桥乳杆菌在酸马奶中的含量高,且共同出现在其它含有酵母的发酵制品中^[26],两者在含有酵母的发酵环境中能很好地生长。另外,*Lactobacillus helveticus*可产生抑制生物膜形成的生物表面活性物质^[27],这可能是其与副猪链球菌、轻链球菌以及副血链球菌等呈负相关的原因之一。

2.3 鲜马奶和酸马奶中乳酸菌的β多样性

11个酸马奶和8个鲜马奶样品中OTU分布统计结果(图5)显示,只有9个OTU是19个样品共有的,有299个OTU是各样品特有的,然而,共有OTU所包含的序列数目(20284条)是总序列数目的47.1%,其注释结果显示均为瑞士乳杆菌。



注:柱状图中每个柱子代表一个 OTU 集合,以集合中包含的 OTU 数目排序展示。柱子下的黑点表示该集合中的 OTU 所属样品。左侧条形图的长度代表样品中 OTU 数目。

图 5 鲜马奶和酸马奶中 OTU 分布图

Fig.5 Distribution of OTU in fresh mare milk and Koumiss

根据 OTU 在鲜马奶和酸马奶样品中的分布情况,统计仅存于鲜马奶样品中的 OTU 有 244 个,注释到 85 个乳酸菌菌种,其中瑞士乳杆菌、唾液链球菌、瘤胃乳杆菌和嗜热链球菌 4 个乳酸菌菌种的出现频率较高,其余大量存在的乳酸菌菌种出现频率较低。仅存于酸马奶样品中的 OTU 数目比鲜马奶的少,共 126 个,且注释结果基本为发酵乳制品中常见的乳酸菌菌种——瑞士乳杆菌、马乳酒样乳杆菌、高加索酸奶乳杆菌、德氏乳杆菌、桥乳杆菌、乳酸乳球菌以及嗜热链球菌等。

基于以上分析结果,不难看出,鲜马奶中乳酸菌菌种的丰富度、丰度以及物种组成存在明显的差异。基于系统进化关系,计算各样品间的 unifracc 距离,对样品的 β 多样性进行分析,以加权 unifracc 距离进行主坐标分析(图 6),以加权和非加权 unifracc 距离统计鲜马奶组和酸马奶组内样品的离散情况及组间差异(图 7)。

从图 6 可以看出鲜马奶和酸马奶样品被很好地区分。其中,酸马奶样品 S7 与其它样品的距离较远,S6 和 S8 与部分鲜马奶样品较近。鲜马奶样品 X6 与部分酸马奶样品较近。这与乳酸菌菌群组成的分析结果一致,酸马奶样品 S7 中乳酸乳球菌含量极高(96.61%),是 19 个样品平均值的 10 倍;S6 和 S8 的乳酸菌菌群结构更接近鲜马奶样品;

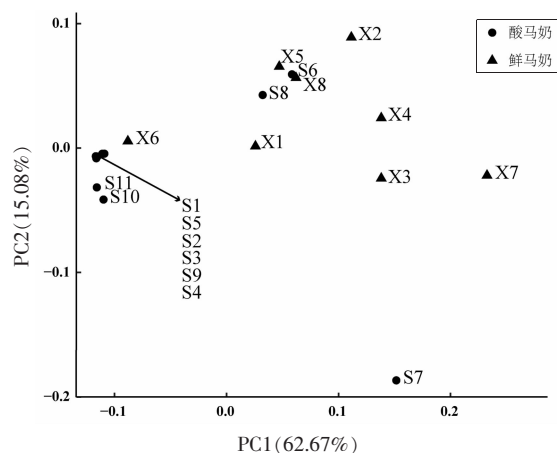


图 6 鲜马奶和酸马奶样品的主坐标分析(PCoA)
Fig.6 Principal coordinate analysis (PCoA)
of fresh mare milk and Koumiss

鲜马奶样品 X6 的乳酸菌菌群结构更接近酸马奶样品。

wilcoxon 秩和检验结果显示,酸马奶样品的组内非加权 unifracc 距离显著($P < 0.005$, 图 7a)高于鲜马奶样品,说明酸马奶中乳酸菌菌种组成差异大。考虑乳酸菌菌种含量后,两组样品间的组内加权 unifracc 距离的 P 值为 0.051(图 7b),鲜马奶具有更复杂的乳酸菌菌群结构,这与上述 α 多样性和菌群结构的分析结果一致。以上结果说明,自然发酵的酸马奶品质参差不齐。

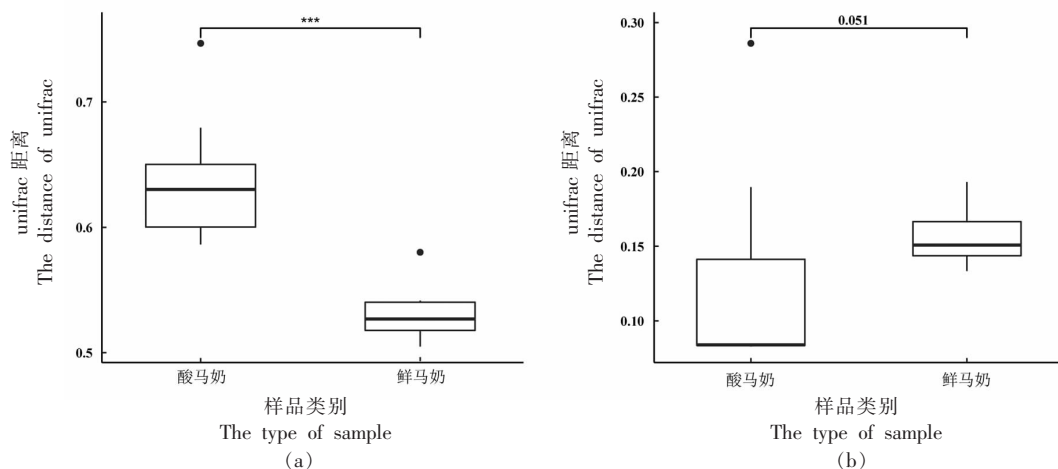


图 7 鲜马奶和酸马奶样品间 unifracc 距离
Fig.7 The unifracc distance of fresh mare milk and Koumiss

3 结论

应用 Pacbio SMRT 测序技术,基于 LAB 特异性引物对新疆伊犁哈萨克地区昭苏县和阿克陶县

的鲜马奶和酸马奶样品中的乳酸菌多样性进行研究,结果显示,鲜马奶样品中乳酸菌的 α 多样性显著高于酸马奶,这是因为开放的挤奶环境和不杀

菌的传统发酵工艺使鲜马奶中的乳酸菌十分丰富,而酸马奶发酵过程中,低温、微氧且代谢产生乙醇的发酵条件抑制了部分乳酸菌菌种的生长繁殖,使其乳酸菌菌群的丰富度降低。鲜马奶中还检测到一些具有致病性的菌种,不适合直接饮用,而酸马奶不存在这种情况。在酸马奶中检测到瑞士乳杆菌等一些具有益生潜力的乳酸菌菌种,这可能也是酸马奶具有强大益生功能的原因之一。酸马奶样品的组内非加权 unifracs 距离显著高于鲜马奶,说明酸马奶品质参差不齐。鲜马奶与酸马奶中乳酸菌多样性的分析研究结果,对酸马奶的品质改良和质量控制以及工业化生产提供参考。

参 考 文 献

- [1] 李星科, 李开雄, 邹圣东. 酸马奶酒[J]. 中国乳业, 2006(7): 58-60.
LI X K, LI K X, ZOU S D. Koumiss[J]. China Dairy, 2006(7): 58-60.
- [2] 孙天松, 孟和毕力格, 王俊国, 等. 新疆维吾尔自治区酸马奶化学组成成分与微生物学分析[J]. 中国乳品工业, 2005(10): 10-14.
SUN T S, MENGHE B L G, WANG J G, et al. Analysis of chemical composition and microorganism flora of traditionally home-made Koumiss in Xinjiang [J]. China Dairy Industry, 2005(10): 10-14.
- [3] 哈斯苏荣, 阿木古楞, 芒来. 酸马奶及其医学价值[J]. 中国中药杂志, 2003(1): 15-18.
HA S S R, A M G L, MANG L. The Koumiss and its medical value[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2003(1): 15-18.
- [4] O'CALLAGHAN J, W. O'TOOLE P. *Lactobacillus*: Host-microbe relationships [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2013, 358(1): 119-154.
- [5] GHOSH T, BENIWAL A, SEMWAL A, et al. Mechanistic insights into probiotic properties of lactic acid bacteria associated with ethnic fermented dairy products[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10(1): 502-502.
- [6] HUANG Y, WANG X J, WANG J F, et al. *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(5): 2746-2753.
- [7] 张哲, 刘小鸣, 陈卫. 内蒙古传统发酵驼乳中乳酸菌和酵母菌的分离鉴定及其生物多样性分析[J]. 中国食品学报, 2018, 18(7): 230-238.
ZGANG Z, LIU X M, CHEN W. Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeast and biodiversity analysis of traditional fermented camel milk in Inner Mongolia[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(7): 230-238.
- [8] 尚雪娇, 代程洋, 王玉荣, 等. 腌菜中细菌多样性研究及乳酸菌分离鉴定[J]. 中国酿造, 2018, 37(11): 40-44.
SHANG X J, DAI C Y, WANG Y R, et al. Bacterial diversity of bacteria and isolation and identification of lactic acid bacteria from pickles[J]. China Brewing, 2018, 37(11): 40-44.
- [9] HOU Q C, BAI X Y, LI W C, et al. Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples[J]. Front Microbiol, 2018, 9(1): 2045-2045.
- [10] 边燕飞, 席晓霞, 郑艺, 等. 基于 PacBio SMRT 技术的婴幼儿配方奶粉微生物安全性评价[J]. 中国食品学报, 2019, 19(10): 212-220.
BIAN Y F, XI X X, ZHENG Y, et al. Evaluation of microbial safety in infant formula based on PacBio SMRT sequencing[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(10): 212-220.
- [11] 舒明月, 付爱思, 张洁, 等. 基于 PacBio SMRT 测序技术评估妊娠期糖尿病人的肠道菌群[J]. 微生物学报, 2019, 59(9): 1823-1839.
SHU M Y, FU A S, ZHANG J, et al. Pacbio SMRT sequencing of intestinal flora in patients with gestational diabetes mellitus [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(9): 1823-1839.
- [12] CHUL S S, HWAN A D, JIN K S, et al. Advantages of single-molecule real-time sequencing in high-GC content genomes[J]. Plos One, 2013, 8(7): e68824.
- [13] 张猛, 党娜, 孟和毕力格, 等. 基于 Pac-Bio 单分子实时测序技术比较酸马奶和生马奶中细菌多样性 [C]//第十五届益生菌与健康国际研讨会摘要集. 南京: 中国食品科学技术学会, 2020.
ZHANG M, DANG N, MENGHE B L G, et al. Comparison of bacterial diversity in yogurt and raw horse milk based on PacBio single molecule real-time sequencing [C]// Proceedings of the Fifteen In-

- ternational Symposium on Probiotics and Health. Nanjing: China Society of Food Science and Technology, 2020.
- [14] MITCHELL J. *Streptococcus mitis*: Walking the line between commensalism and pathogenesis[J]. Molecular Oral Microbiology, 2011, 26(2): 89–98.
- [15] ROSINI R, MARGARIT I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: Influence of environmental conditions and implicated virulence factors[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015, 5(6): 6–6.
- [16] ISENRING J, KOHLER J, NAKATA M, et al. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* endocarditis isolate interferes with coagulation and activates the contact system[J]. Virulence, 2018, 9(1): 248–261.
- [17] KLATTE J M, CLARRIDGE III J E, BRATCHER D, et al. A longitudinal case series description of meningitis due to *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* in infants[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(1): 57–60.
- [18] CHONGPRASERTPON N, CUSACK R, COUGHLAN J J, et al. *Streptococcus Bovis* endocarditis post colonic polypectomy [J]. European Journal of Case Reports in Internal Medicine, 2019, 6(5): 001110.
- [19] QIMU G, ZHENG Y, XI X X, et al. Investigating bacterial population structure and dynamics in traditional Koumiss from Inner Mongolia using single molecule real-time sequencing[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(10): 7852–7863.
- [20] 孙天松. 中国新疆地区传统发酵酸马奶的化学组成及乳酸菌生物多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006.
- SUN T S. Chemical composition and biodiversity of lactic acid bacteria of Koumiss – A traditional fermented mare milk product in Xinjiang of China[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2006.
- [21] PONOMAROVA O, GABRIELLI N, SEVIN D C, et al. Yeast creates a niche for symbiotic lactic acid bacteria through nitrogen overflow[J]. Cell Systems, 2017, 5(4): 345–357.
- [22] 莫蓝馨. 内蒙古锡林郭勒盟和蒙古国巴彦洪格省传统发酵乳制品中细菌多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- MO L X. Investigation of bacterial diversity in traditional fermented dairy products from Xilingol of Inner Mongolia and Bayankhongor of Mongolia[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [23] 刘文俊, 多拉娜, 刘亚华, 等. 基于纯培养方法和PacBio三代测序技术研究蒙古国传统酸马奶中乳酸菌多样性[J]. 中国食品学报, 2019, 19(4): 27–37.
- LIU W J, DUOLANA, LIU Y H, et al. Lactic acid bacteria diversity in Mongolia traditional Koumiss based on culture-dependent and PacBio sequencing technology[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(4): 27–37.
- [24] VIIARD E, MIHHALEVSKI A, RUHKA T, et al. Evaluation of the microbial community in industrial rye sourdough upon continuous back-slopping propagation revealed *Lactobacillus helveticus* as the dominant species [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(2): 404–412.
- [25] TAVERNITI V, GUGLIELMETTI S. Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3(1): 392–392.
- [26] VOGELMANN S A, SEITTER M, SINGER U, et al. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 130(3): 205–212.
- [27] JIANG X, YAN X, GU S, et al. Biosurfactants of *Lactobacillus helveticus* for biodiversity inhibit the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and cell invasion [J]. Future Microbiology, 2019, 14(13): 1133–1146.

Analysis of the Structure of Lactic Acid Bacteria in Xinjiang Fresh Mare Milk and Koumiss Using Three Generation Sequencing Technology

Cai Hongyu, Liu Wenjun, Shen Lingling, Wang Jiao, Zhang Heping*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Hohhot 010018)

Abstract The microbial community structure of traditional Koumiss is bound to be different because of the microenvironment and production process of each family. In this paper, using Pacbio SMRT sequencing technology, based on lactic acid bacteria specific primers, the lactic acid bacteria flora of fresh mare milk and Koumiss in Zhaosu County and Akto County, Ili Kazak Region, Xinjiang were explored. The results showed that the alpha diversity of lactic acid bacteria in fresh mare milk was significantly higher ($P < 0.005$) than Koumiss, and the lactic acid bacteria in fresh mare milk were more abundant. *Lactobacillus helveticus* (35.52%), *Streptococcus salivarius* (10.11%), *Lactococcus lactis* (9.49%), *Streptococcus thermophilus* (5.96%) and *Lactobacillus delbrueckii* (5.37%) were the main species of lactic acid bacteria in fresh mare milk. The main lactic acid bacteria species in Koumiss were *Lactobacillus helveticus* (61.77%), *Lactobacillus kefirifaciens* (14.91%) and *Lactococcus lactis* (9.76%). *Staphylococcus saprophyticus* (4.45%) and *Staphylococcus aureus* (2.62%) whose content in fresh mare milk were significantly higher than Koumiss ($P < 0.05$) were pathogenic. In addition, other pathogenic bacteria were detected in fresh mare milk, such as *Streptococcus mitis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus pasteurianus* and *Streptococcus lutetiensis*, which stated that fresh mare milk should not be drink directly. And compared with fresh mare milk, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus pontis* with higher content in Koumiss were significantly positively correlated ($r = 0.582$, $P < 0.01$). The results of beta diversity stated that fresh mare milk and Koumiss had different lactic acid bacteria flora characteristics, and the dispersion of Koumiss was higher than fresh mare milk, indicating that the quality of traditional Koumiss was uneven. The lactic acid bacteria specific primers used in this article provide better conditions for mining low-abundance lactic acid bacteria, which provides a more adequate theoretical basis for the industrial production of Koumiss.

Keywords mare milk; Pacbio SMRT sequencing; lactic acid bacteria specific primers; lactic acid bacteria diversity