

基于多组学解析传统奶酪菌群与代谢物特征

姚建霞, 王丹丹, 夏亚男, 陈永福*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室
内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要 微生物是奶酪风味物质产生的驱动者,其群体组成、动态演替关系及产生的代谢产物均影响奶酪的风味和质量。本研究采用宏基因组与代谢组学技术分析内蒙古鄂尔多斯传统奶酪样品的微生物多样性与代谢物组成,解析微生物群落与奶酪代谢物形成的相关性。结果表明:从鄂尔多斯传统奶酪中共发现 8 个门、98 个属、205 个种。通过主成分分析可将奶酪样品分为 2 组,ERDS-1 组奶酪主要优势菌种是瑞士乳杆菌和乳酸乳球菌,ERDS-2 组奶酪主要优势菌种是德氏乳杆菌和嗜热链球菌。ERDS-1 组奶酪微生物多样性高于 ERDS-2 组,且代谢通路糖酵解 IV(PWY-1042)在两组中存在显著差异($P<0.05$)。这可能是由于制作工艺、生产温度及奶源本身微生物的差异导致奶酪菌群结构不同,最终导致代谢物存在差异。在奶酪中共检出 14 类 744 种代谢物,筛选出 26 种具有显著差异的代谢物。相关性分析表明奶酪中德氏乳杆菌、嗜热链球菌等菌种丰度与骨化三醇、UDP 葡萄糖、溶血磷脂酰胆碱等物质含量具有显著相关性。本试验结果为奶酪生产中核心菌种与关键代谢物的挖掘提供理论依据,并为传统奶酪的工业化生产提供参考。

关键词 传统奶酪;宏基因组学;代谢组学;相关性

文章编号 1009-7848(2025)02-0388-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.02.034

内蒙古传统奶酪又称为奶豆腐,其作为内蒙古地区的传统发酵食品之一,因独特的口味和较高的营养价值而备受欢迎^[1]。研究表明不同地区奶酪因自然环境不同,故其发酵产生的代谢产物也不同;而同一地区奶酪因奶源及制作工艺不同,故也会导致奶酪菌群及代谢物的差异,从而影响奶酪的风味和质量^[2-4]。传统奶酪相对开放的制作环境使环境微生物更容易进入发酵系统,这些微生物积极参与发酵过程,通过分解原料中的糖、蛋白质、脂肪和其它底物,产生各种代谢产物,如乳酸、氨基酸、醛和酮等,进而决定传统奶酪的风味及质量^[5-6]。因此,解析传统奶酪中微生物群落结构及代谢产物具有重要意义。

随着高通量测序技术的发展,宏基因组学为传统发酵食品及其相关微生物群的组成和结构分析提供了重要手段。然而,宏基因组测序虽可以全面描述样品的微生物群落以及对其进行功能分析,但该方法并没有提供任何关于微生物代谢的信息,而这对于理解样品基质材料和微生物群落

之间的相互作用同样重要^[7-9]。近年来,代谢组学被广泛应用于各种食品样品的分析^[10]。代谢组学作为研究生物细胞中代谢物及其代谢途径的一种新技术,逐渐被人们所运用。在食品科学研究中,代谢组学技术可以明确或鉴别各种食品中的成分,如葡萄酒、农作物和各种传统发酵制品。目前,代谢组学技术适用于分析各类食品中的 1 000 多种化合物^[11],其凭借高效的分离和检测手段,显示出在食品发酵、食品营养及食品安全等领域的应用潜力。

宏基因组学和代谢组学联合分析可以解释优势菌群与差异代谢物间的关联性,进而帮助研究人员建立微生物、代谢物、表型之间的逻辑关系^[12-13]。如 Zhang 等^[14]利用宏基因组学和代谢组学探索蒙古奶酪生产过程中代谢物变化、细菌演替及其动态相关性,发现乳球菌和不动杆菌对风味物质和有益氨基酸的形成有积极的影响,链球菌和沙雷氏菌与氨基酸分解代谢有关。Yang 等^[15]通过深度宏基因组测序和液相色谱-质谱法分析 4 种中国奶酪和 4 种欧洲奶酪的微生物组和代谢组,发现不同地区的奶酪样品之间微生物与代谢物存在差异;来自同一地区样品的微生物与代谢物具有更高的相似性,且通过深度宏基因组测序鉴定出 4

收稿日期: 2024-02-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32272292)

第一作者: 姚建霞,女,硕士生

通信作者: 陈永福 E-mail: nmgyfchen@126.com

一个新物种,属于盐球菌属、考克氏菌属和谷氨酸杆菌属,对它们的碳水化合物活性酶谱和次级代谢产物簇编码基因进行分析,结果表明这些新物种参与干酪风味的形成。

本研究基于宏基因组学分析鄂尔多斯传统奶酪的微生物群落分布和功能基因,采用代谢组学解析鄂尔多斯地区奶酪的代谢物差异,进而探究微生物群落组成与奶酪代谢物形成的潜在相关性,为奶酪生产中核心菌种与关键代谢物的挖掘提供理论依据,并为传统奶酪的工业化生产提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品收集 奶酪样品 ER1~3,采自内蒙古鄂尔多斯市乌审旗;奶酪样品 ER4~6,采自内蒙古鄂尔多斯杭锦旗;奶酪样品 ER7~9,采自内蒙古鄂尔多斯市伊金霍洛旗。将采集的奶酪样品用于冰运输至内蒙古农业大学乳品生物技术与工程重点实验室-80℃保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 DNeasy Power Food kit 试剂盒,德国 QIAGEN 公司;适用于 Illumina 测序平台的 NEB Next® Ultra™ DNA 文库制备试剂盒,New England Biolabs(NEB);适用于 Qubit®3.0 荧光计的 Qubit® DNA Assay Kit,美国 Invitrogen 公司;Illumina PE Cluster Kit,美国 Illumina 公司;甲醇、乙腈,均为色谱纯级,德国 Merck 公司;甲酸(色谱纯级)、甲酸铵(色谱纯级)、氨水,中国 Aladdin 公司;标准品(色谱纯级),德国 Sigma-Aldrich 公司。

HWS24 型恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;5810R 高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;Qubit™ 3 荧光计,中国赛默飞公司;Illumina Hiseq 6000 高通量测序平台,美国 Illumina 公司。MM400 研磨仪,德国 Retsch 公司;Shim-pack U-FLC CBM30A 超高效液相色谱仪,日本岛津公司;QTRAP 6500 系统串联质谱仪,美国赛默飞世尔公司。

1.2 奶酪中微生物多样性分析

1.2.1 DNA 提取 取 1 g 奶酪样品使用研钵充分研磨成粉末,采用 DNeasy Power Food kit 试剂盒

依据说明书进行奶酪样品宏基因组 DNA 的提取。将提取的 DNA 在 1%的琼脂糖凝胶上监测 DNA 降解和污染,用 Qubit®DNA Assay Kit 在 Qubit® 3.0 荧光计中检测 DNA 浓度。

1.2.2 宏基因组测序及质控 将所提取的奶酪样品 DNA 寄往北京诺禾生物技术有限公司利用 Illumina Hiseq 6000 高通量测序平台完成测序工作。对下机的原始数据进行拆分,质量剪切以及去污染等优化处理。首先使用 KneadData 流程中的 Trimmomatic^[16]工具对宏基因组数据进行质量控制以去除含 N 碱基和低质量 reads,筛选获得高质量 reads,随后使用 KneadData 流程中的 bowtie2^[17]工具将高质量 reads 与宿主 DNA 序列进行比对,将与宿主 DNA 序列相似性高的 reads 去除。

1.2.3 生物信息学分析 通过 Metaphlan2 软件将质控及去宿主获得的高质量序列与标准数据库比对以获得奶酪样品中微生物的注释信息^[18]。利用 HUMAnN2^[19]软件结合 UniRef90 数据库对宏基因组数据进行菌群功能特征和代谢途径的注释。

1.3 奶酪中代谢物分析

1.3.1 样品制备 准确称量 20 mg(±1 mg)奶酪样品转移至对应编号离心管中,用研磨仪研磨至(30 Hz、1 min)粉末状;加入 400 μL 的 70%甲醇水内标提取液,1 500 r/min 振荡 5 min,冰上静置 15 min;在 4℃条件下,12 000 r/min 离心 10 min,移取上清液 300 μL 到另一对应编号离心管中,在-20℃冰箱中静置 30 min;再于 12 000 r/min 离心 3 min,吸取上清液,0.22 μm 微孔滤膜过滤至对应的进样瓶内衬管中,用于上机分析(上述操作均在冰上进行)。

1.3.2 分析条件

1.3.2.1 液相色谱条件 色谱柱:Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 (2.1 mm×100 mm,1.8 μm);流动相:A 相为超纯水(0.1%的甲酸),B 相为乙腈(0.1%的甲酸);洗脱梯度:0~11 min,95%~10% A;11~12 min,10% A;12~12.1 min,10%~95% A;12.1~14 min,95% A;流速 0.4 mL/min;柱温 40℃;进样量 2 μL^[20]。

1.3.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(Electrospray ionization, ESI)温度 500℃,质谱电压 5 500 V(正离子模式下),-4 500 V(负离子模式下),离子源

气体 I (GS I)379.21 kPa, 气体 II (GS II)413.69 kPa, 气帘气 (Curtain gas, CUR)172.37 kPa, 碰撞诱导电离 (Collision-activated dissociation, CAD) 参数设置为高。在三重四极杆 (Qtrap) 中, 每个离子对是根据优化的去簇电压 (Declustering potential, DP) 和碰撞能 (Collision energy, CE) 进行扫描检测^[21]。

1.3.3 代谢物定性与定量分析 基于迈维(武汉)生物技术有限公司自建靶向标品数据库 MWDB (metware database), 根据检测物质的保留时间 RT、子母离子对信息及二级谱数据进行定性分析, 利用三重四极杆质谱的多反应监测模式对代谢物进行定量。获得不同样本的代谢物质谱分析数据后, 再对物质质谱峰进行峰面积积分, 对不同样本中的相同代谢物的质谱出峰进行积分校正, 最后利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据^[22]。

1.4 数据处理

利用 R 软件中的 Vegan 软件包计算微生物 alpha 多样性的变化。采用 Kruskal-Wallis 非参数检验比较组间和组内丰富度和多样性的显著差异。基于 Bray-curtis 距离, 利用 R 软件计算微生物菌群结构, 采用主坐标分析 (PCoA) 来评估群落结构和代谢途径的整体变化, 利用 LEfSe 分析筛选优势菌和差异菌, 再利用 Stamp 分析筛选差异代谢通路。采用多元统计分析, 对鄂尔多斯奶酪代谢物进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA), 根据正交偏最小二乘判别分析 (Orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 法预测模型稳定可靠性。利用多维统计变量重要性投影 (Variable importance in project, VIP) 值、单维统计 *P* 值及差异倍数 FC 值筛选差异代谢物。最后使用 Spearman 相关性计算微生物与代谢物之间的相关性。所有图形均在 R、MetaboAnalyst 5.0 和 AdobeIllustrator (AI) 环境下生成。

2 结果与分析

2.1 奶酪微生物群落结构和功能解析

2.1.1 奶酪中微生物群落结构分析 本研究对鄂尔多斯奶酪样品中的微生物组成进行了分析, 共鉴定到 8 个门、98 个属、205 个种。在门水平, 鄂

尔多斯奶酪样品平均相对含量大于 1.0% 的优势菌门是厚壁菌门和变形菌门, 其平均相对含量分别为 89.73% 和 9.63%, 占据总含量的 99.36% (图 1a)。在属水平, 鄂尔多斯奶酪样品平均相对含量大于 1.0% 的优势菌属包含乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、醋杆菌属 (*Acetobacter*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 其平均相对含量分别为 52.39%, 20.03%, 13.71%, 7.07%, 2.50% 和 1.12%, 占据总含量的 96.82% (图 1b)。在种水平, 鄂尔多斯奶酪样品平均相对含量大于 1.0% 的优势菌种包含德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*)、瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)、巴氏醋杆菌 (*Acetobacter pasteurianus*)、未分类的醋杆菌 (*Acetobacter unclassified*) 和肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*), 其平均相对含量分别为 28.48%, 22.18%, 19.56%, 13.14%, 5.09%, 2.13% 和 1.81%, 占据总含量的 92.39% (图 1c)。有趣的是, 本研究发现样品 ER1~ER5 中主要菌属是乳杆菌属和乳球菌属, 主要菌种是瑞士乳杆菌和乳酸乳球菌; 样品 ER6~ER9 中主要菌属是乳杆菌属和链球菌属, 主要菌种是德氏乳杆菌和嗜热链球菌。由于传统奶酪发酵中不加入商业发酵剂, 而是采用自然发酵的方法, 因此产生这种情况的原因可能是奶源、生产环境及不同家庭制作方式等多种因素导致同一个地区奶酪中微生物菌群结构不同。

王春艳等^[23]采用 Illumina 高通量测序技术对新疆伊犁牧区传统手工奶酪中微生物构成及多样性进行了解析, 检测到乳杆菌属和雷尔氏菌属为优势菌属, 瑞士乳杆菌为优势菌种。吕瑞瑞等^[24]通过乳酸菌特异性引物与 PacBio SMRT 三代测序技术相结合的方法对荷兰、意大利、希腊等不同地区奶酪进行测序, 鉴定到乳杆菌属、乳球菌属、链球菌属为优势菌属, 乳酸乳球菌、嗜热链球菌、马胃葡萄球菌和腐生葡萄球菌为优势菌种。Zhang 等^[14]从蒙古国奶酪中检测到乳球菌属和乳杆菌属为优势菌属。综上, 鄂尔多斯奶酪与其它地区奶酪相比优势菌属基本一致。

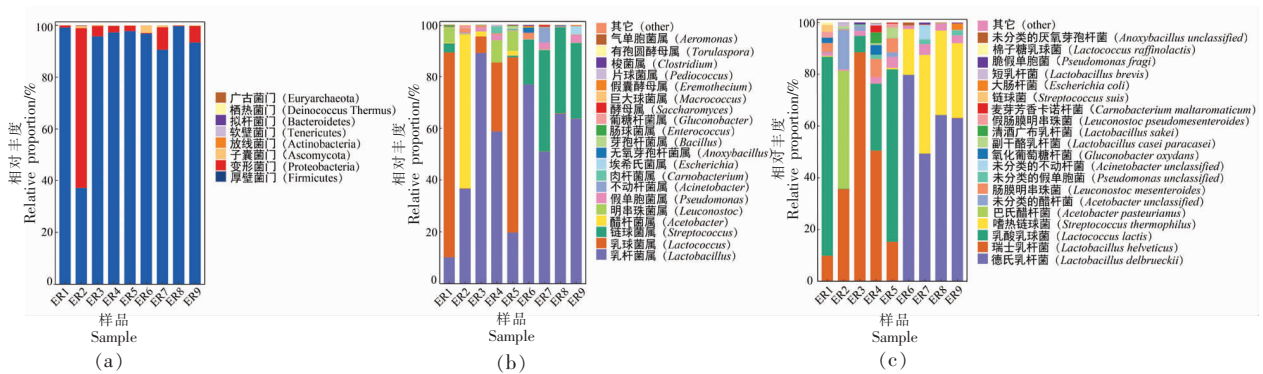


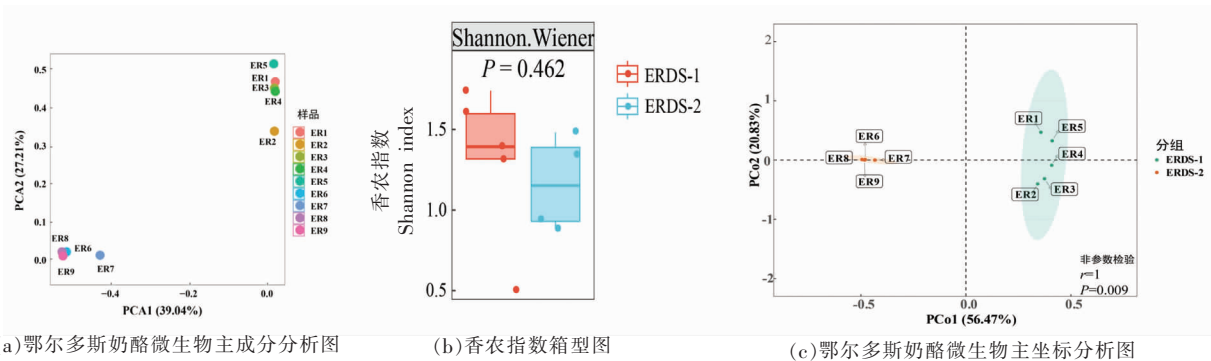
图 1 奶酪中主要微生物门(a)、属(b)和种(c)的相对含量堆砌图

Fig.1 Stacked plot of the relative abundance of main microbial phylum (a), genus (b) and species (c) in cheese

2.1.2 奶酪中微生物多样性分析 为考察样品的分布情况、聚类信息、变化趋势,对鄂尔多斯奶酪整体样品做了主成分分析(图 2a),其第 1 主成分与第 2 主成分的贡献率分别为 39.04%和 27.21%,奶酪样品呈现明显趋势聚为 2 组,样品 ER1~ER5 聚为一簇,而样品 ER6~ER9 聚为一簇,这可能微生物组成差异较大所致。根据微生物群落组成及丰度,将 15 份奶酪分为两组,第 1 组(ERDS-1)包含 ER1~ER5,第 2 组(ERDS-2)包含 ER6~ER9。Shannon 指数常用来评估样本中微生物的多样性,指数越大,多样性程度越高。本研究 Shannon 指数通过 Kruskal-Wallis 非参数检验获得的组间总体差异的 P 值为 0.462 ($P>0.05$),表明 ERDS-1 和 ERDS-2 两组奶酪之间微生物多样性之间无显著差异,而 ERDS-1 组多样性高于 ERDS-2 组(图 2b)。又基于 Bray-Curtis 距离进行了主坐标分析(图 2c),其第 1 主成分与第 2 主成分的贡献率分

别为 56.47%和 20.83%,且经过 Anosim 检验后的 P 值小于 0.05,结果表明奶酪样品基于组别的聚类模式清晰可见,说明两组间菌群结构存在差异,组内样品的菌群结构更为相似,该结果与 PCA 结果一致。

根据分组在属水平和种水平进行 LEfSe 分析(图 2d 和图 2e),发现明串珠菌属和乳球菌属在 ERDS-1 组显著富集,链球菌属和巨大球菌属在 ERDS-2 组丰度更高;假肠膜明串珠菌、肠膜明串珠菌、植物乳杆菌、乳酸乳球菌、瑞士乳杆菌在 ERDS-1 组显著富集,德氏乳杆菌、溶干酪性巨大球菌、嗜热链球菌在 ERDS-2 组中丰度更高。这可能是由于同一地区,不同的原料、生产环境、制作手法及发酵方式也会对奶酪的菌群结构产生影响。赵顺先等^[25]研究发现制作工艺、生产温度及奶源本身微生物的差异,可能导致自然发酵奶酪样品微生物群落组成产生差异。



(a)鄂尔多斯奶酪微生物主成分分析图

(b)香农指数箱型图

(c)鄂尔多斯奶酪微生物主坐标分析图

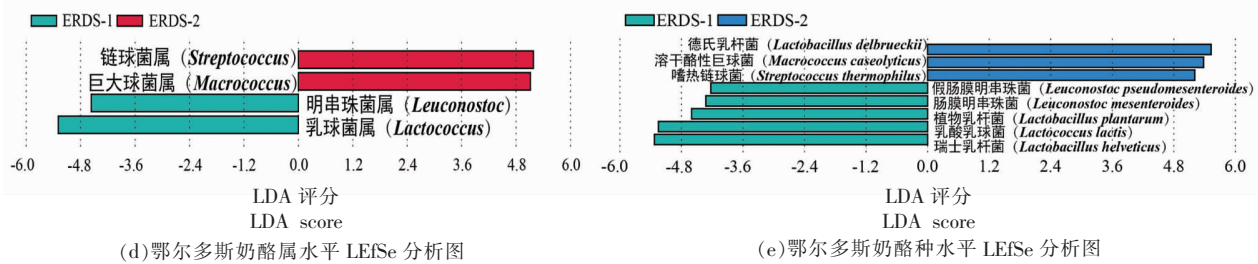
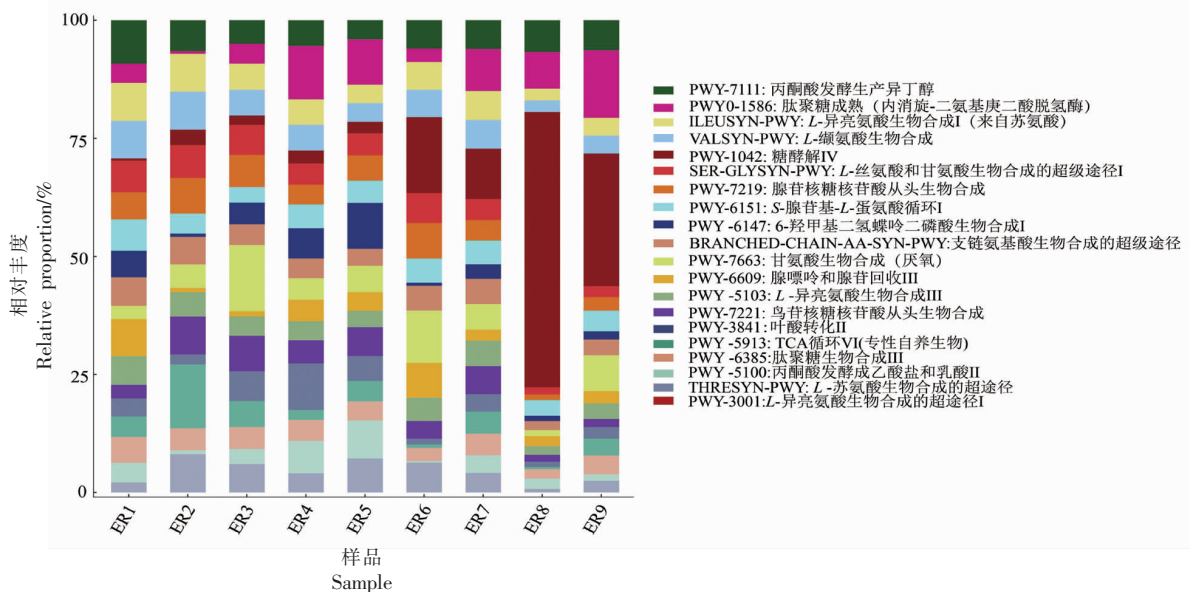


图2 奶酪微生物多样性分析

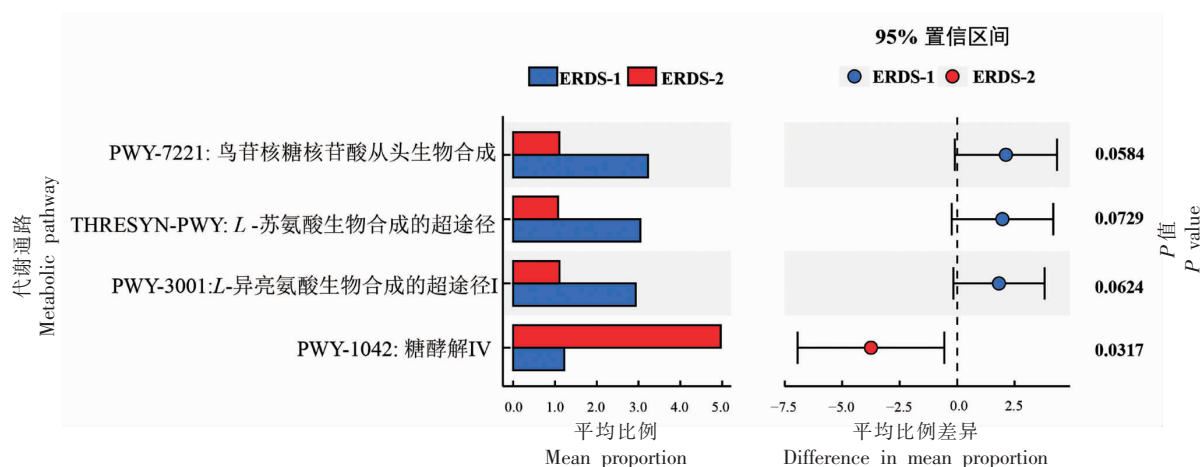
Fig.2 Microbial diversity analysis of cheese

2.1.3 奶酪中微生物功能分析 使用 HUMAnN (V2.0) 软件对奶酪中微生物的功能进行解析,从奶酪样品中共注释到 430 条代谢通路,取相对丰度排名前 20 的代谢通路做堆积柱状图。如图 3a 所示,ERDS-1 组中代谢通路丙酮酸发酵生产异丁醇(PWY-7111)丰度最高,其次是代谢通路 L-缬氨酸生物合成(VALSYN-PWY)和 L-异亮氨酸生物合成 I(ILEUSYN-PWY),且这 2 种代谢通路相对丰度一致。ERDS-2 组中代谢通路糖酵解 IV (PWY-1042)丰度最高,其次是代谢通路肽聚糖成熟(内消旋-二氨基庚二酸脱氢酶)(PWY0-1586)和甘氨酸生物合成(厌氧)(PWY-7663)。对 2 组奶酪进行代谢通路差异分析(图 3b),发现代谢通路糖酵解 IV (PWY-1042)在 2 组中存在显著差异 ($P<0.05$),且主要富集在 ERDS-2 组奶酪中。

糖酵解是一种广泛存在于生物体中的代谢过程,用于将葡萄糖等糖类分解为其它代谢产物以及产生能量,其包含糖原酵解、乳酸发酵和乙醇发酵 3 个产能反应。乳酸发酵是奶酪制作过程中重要的代谢途径之一,乳酸菌通过乳酸发酵将乳糖转化为乳酸,有助于奶酪的酸化和味道的形成。代谢通路糖酵解 IV 在两组奶酪中存在显著差异的原因可能是多方面的,如原料差异、制作温度和环境条件、菌种组成差异等。奶源不同乳糖含量也不同,当乳糖含量较低时,乳酸菌的乳糖利用能力会受到限制,进而影响糖酵解过程^[26];制作过程中温度和环境条件不同可能导致两组奶酪主要菌种不同,而不同的菌种在糖酵解过程中具有不同的代谢能力^[27]。



(a) 鄂尔多斯奶酪微生物代谢通路相对含量堆积图



(b)ERDS-1 和 ERDS-2 组间奶酪微生物代谢通路差异分析图

图 3 奶酪微生物优势代谢通路

Fig.3 Microbial dominant metabolic pathways in cheese

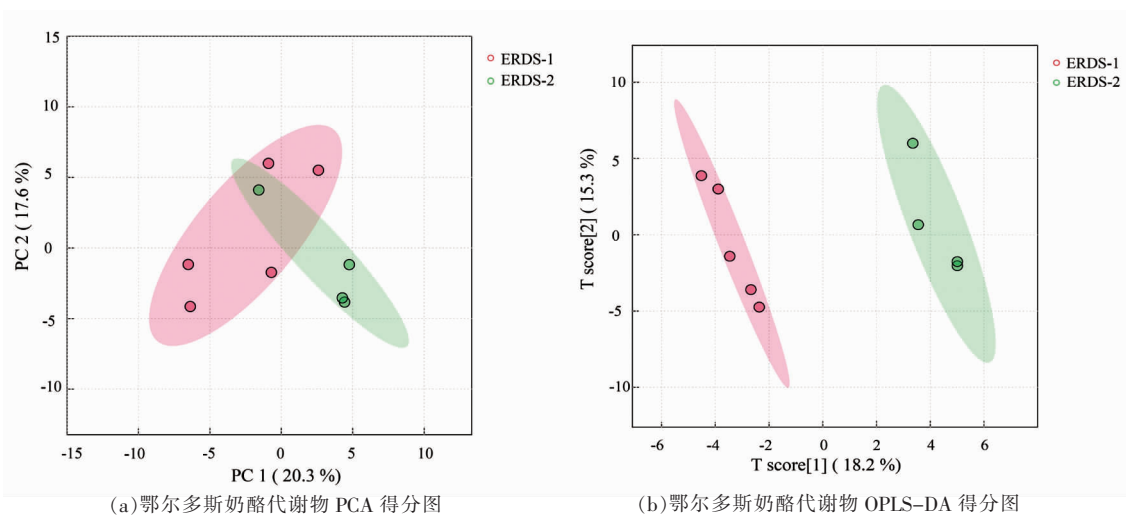
2.2 鄂尔多斯奶酪代谢物分析

2.2.1 鄂尔多斯奶酪代谢物组成总体分析 通过 UPLC-MS/MS 技术检测，在鄂尔多斯奶酪样品中共鉴定出 14 类 744 个代谢物。其中包括醇、胺类 (32 个), 醛、酮、酯类 (12 个), 氨基酸及其代谢物 (184 个), 苯及衍生物 (71 个), 碳水化合物及其代谢物 (49 个), 辅酶和维生素 (10 个), 脂肪酰类 (60 个), 甘油酯类 (10 个), 甘油磷脂类 (82 个), 杂环化合物 (55 个), 激素类化合物 (8 个), 核苷酸及其代谢物 (58 个), 有机酸及其衍生物 (95 个), 其它类 (18 个)。

Yang 等^[15]检测到代谢物辛烷基-4-羟基苯甲

酸辅酶 A 为意大利奶酪特有的物质; Afshari 等^[28]检测到 3-羟基丙酸和 *O*-甲氧基邻苯二酚-*O*-硫酸酯是切达奶酪的特征代谢物，这些化合物以前在任何类型的奶酪中都没有报道过。鄂尔多斯奶酪检测到的代谢物种类与已发表的文献基本一致，而溶血磷脂酰胆碱(LPCs)占比大，且在各样品中含量较高。

对鄂尔多斯奶酪样品中检测到的 744 个代谢物进行 PCA 分析和 OPLS-DA 分析，进而判别鄂尔多斯奶酪各样本间代谢物组成及浓度的差异大小。如图 4a 所示, ERDS-1 和 ERDS-2 两组样本有较为清晰的分离趋势，组内之间 ERDS-1 组样本



(a)鄂尔多斯奶酪代谢物 PCA 得分图

(b)鄂尔多斯奶酪代谢物 OPLS-DA 得分图

图 4 鄂尔多斯奶酪代谢物 PCA 得分图和 OPLS-DA 得分图

Fig.4 PCA and OPLS-DA scores of Ordos cheese metabolites

的分离大于 ERDS-2 组,在 PCA 结果上能够从总体上反映出样品之间的代谢物差异。如图 4b 所示,OPLS-DA 模型可以将 ERDS-1 组奶酪与 ERDS-2 组奶酪进行明显地聚类与分离,且 R^2 、 Q^2 均大于 0.5,表明模型构建良好、可信度较高。

2.2.2 鄂尔多斯奶酪差异代谢物分析 本研究根据单变量分析的 t 检验 ($P < 0.05$)、差异倍数数值 ($FC \geq 2$ 或 $FC \leq 0.5$) 以及多变量分析 OPLS-DA 模型中变量重要性投影数值 ($VIP > 1$) 作为差异代谢物的筛选标准。如图 5 所示,从 744 个代谢物中共鉴定出 26 种具有显著差异的代谢物。提取原始数据中关键差异代谢物的相对含量绘制热图(图 6),其中 ERDS-2 组奶酪中有 18 种代谢物相对含量显著高于 ERDS-1 组,包括赖氨酸-异亮氨酸(Lys-Ile)、糖原(Glycogen)、维生素 D₃(Calcitriol)、UDP 葡萄糖(UDP-glucose)、Sn-甘油-3-磷酸胆碱(Sn-glycero-3-phosphocholine)等;8 种代谢物相对含量显著低于 ERDS-1 组,包括 LPC(C20:2/0:0)、LPC(C18:2/0:0)、LPC(C15:0/0:0)、*N*-棕榈酰甘氨酸(*N*-Palmitoylglycine)等。

基于已发表的文献,对差异代谢物的功能进行研究,发现 LPCs(溶血磷脂酰胆碱)具有一定的抗氧化性,可以保护奶酪中的脂肪免受氧化的损害,有助于延长奶酪的保质期并保持其品质^[29];骨化三醇(Calcitriol)是维生素 D 的一种活性形式,

其在奶酪中的存在可以提供额外的维生素 D,促进人体钙的吸收和利用,有助于维持骨骼健康^[30];UDP-葡萄糖(UDP-glucose)是多种糖供体的重要前体物质,可以参与奶酪中多糖合成过程,影响奶酪质地和口感,与蛋白质和脂肪相互作用,形成复杂的网络结构,增加奶酪的黏性和弹性^[31];2-甲基呋喃(2-Methylfuran)具有独特的香气和风味,作为风味增强剂在奶酪中使用,可以增加奶酪的整体风味强度,使其香味更加浓郁^[32]。

2.3 优势菌种与差异代谢物的相关性分析

微生物与代谢物之间存在互相影响、相互作用的关系。因此,对鄂尔多斯奶酪优势菌种和差异代谢物进行 Spearman 相关性分析,通过相关性网络图展示微生物和代谢物的相关性情况(如图 7)。结果显示德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)与 UDP 葡萄糖(UDP-glucose)、赖氨酸-异亮氨酸(Lys-Ile)等物质含量呈显著正相关关系,而与溶血磷脂酰胆碱含量呈显著负相关关系。有研究表明德氏乳杆菌可以产生 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶,它能够催化葡萄糖和焦磷酸的反应,生成 UDP 葡萄糖,从而导致德氏乳杆菌与 UDP 葡萄糖呈现正相关关系^[33]。溶血磷脂酰胆碱是一种磷脂类物质,它在奶酪中可能是由于一些微生物代谢产生的,德氏乳杆菌、嗜热链球菌是优势菌种,其存在会抑制其它微生物的生长和代谢,因此

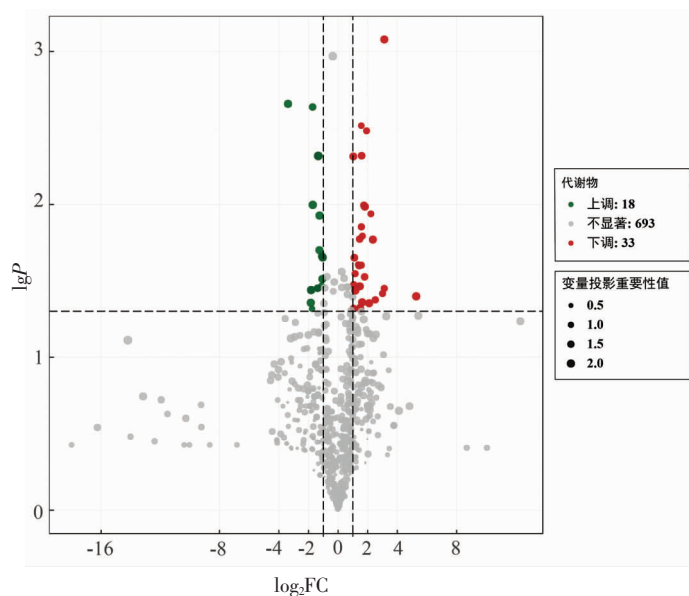


图 5 差异代谢物火山图

Fig.5 Volcano plot of differential metabolites

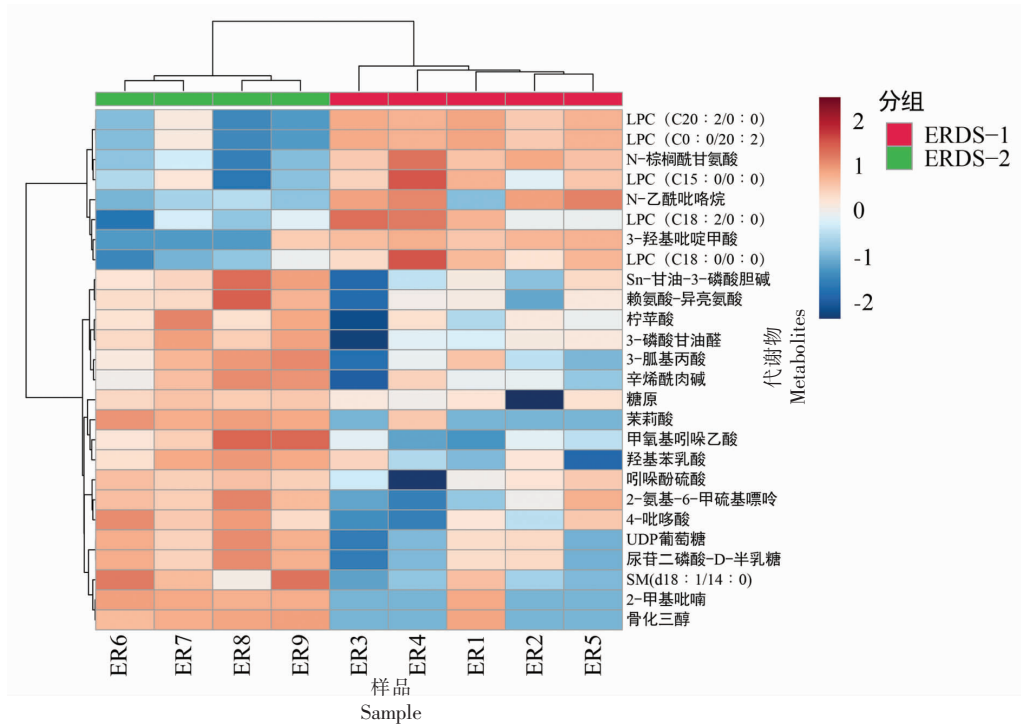
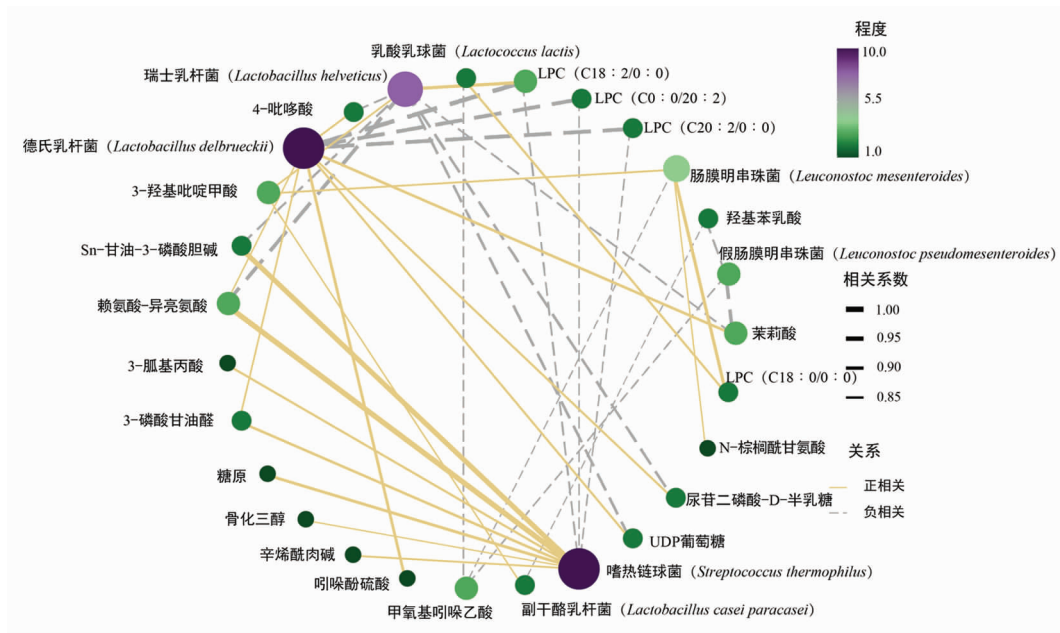


图 6 差异代谢物热图

Fig.6 Heatmap of differential metabolites



注:线型/线颜色代表正、负相关性,线粗、细代表相关关系强、弱,点大小/颜色深、浅代表相关对象个数多、少。

图 7 优势菌种与差异代谢物 Spearman 相关性网络图

Fig.7 Spearman correlation network between dominant strains and differential metabolites

降低了溶血磷脂酰胆碱的含量,从而导致德氏乳杆菌、嗜热链球菌与溶血磷脂酰胆碱含量呈现负相关关系^[34]。嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)与骨化三醇(Calcitriol)、糖原(Glycogen)

等物质含量呈显著正相关关系,与溶血磷脂酰胆碱类物质含量呈显著负相关关系。骨化三醇(Calcitriol)是维生素 D 的活性形式,而嗜热链球菌可能通过酶的作用调节维生素 D 的合成或降

解,影响骨化三醇的水平,从而导致嗜热链球菌与骨化三醇含量呈现正相关关系^[35]。此外,假肠膜明串珠菌(*Leuconostoc pseudomesenteroides*)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)与甲氧基吲哚乙酸(Methoxyindoleacetic acid)含量呈显著负相关关系;瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)与赖氨酸-异亮氨酸(Lys-Ile)、茉莉酸(Jasmonic acid)、4-吡哆酸(4-Pyridoxic acid)等物质含量呈显著负相关关系。奶酪微生物与代谢物的相互作用对奶酪的风味、质地、保鲜性和营养价值都具有重要影响。因此,了解微生物与代谢物的相互作用,可以调控奶酪的品质和特性。

3 结论

奶酪独特的风味、品质及功能特性的形成与其复杂的微生物结构及其代谢特性紧密相关。本研究通过多组学联合分析的方法,对鄂尔多斯传统奶酪样品微生物与代谢物多样性进行解析。鄂尔多斯传统奶酪中共鉴定到微生物8个门、98个属、205个种以及检测出14类744种代谢物。通过主成分分析可将奶酪样品分为2组,ERDS-1组奶酪主要优势菌种是瑞士乳杆菌和乳酸乳球菌,ERDS-2组奶酪主要优势菌种是德氏乳杆菌和嗜热链球菌,ERDS-1组奶酪多样性高于ERDS-2组,代谢通路糖酵解IV(PWY-1042)在两组中存在显著差异($P<0.05$),且主要富集在ERDS-2组奶酪中。由于奶源、生产环境、制作方式、发酵方式等因素影响,同一个地区奶酪中微生物菌群结构存在差异,微生物不同进而导致代谢物也存在差异。具有显著差异的代谢物共26个,主要是甘油磷脂类、氨基酸及其衍生物、有机酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物等物质。通过斯皮尔曼相关性分析发现德氏乳杆菌、嗜热链球菌、肠膜明串珠菌等菌种与赖氨酸-异亮氨酸、骨化三醇、UDP葡萄糖、溶血磷脂酰胆碱、甲氧基吲哚乙酸等物质具有显著相关性。奶酪中微生物与代谢物间相互作用影响也有利于奶酪成熟、贮藏以及风味品质的提升。通过研究传统奶酪中微生物及代谢物可能会发现新的功能菌株和代谢产物,这不仅可以为奶酪工业提供新的菌种资源和技术支持,

还可能会发现具有潜在应用价值的生物活性物质等。本试验结果可为奶酪品质的提升及菌种的挖掘提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] SALAMEH C, BANON S, HOSRI C, et al. An overview of recent studies on the main traditional fermented milks and white cheeses in the Mediterranean region[J]. Food Reviews International, 2016, 32(3): 256-279.
- [2] YANG C C, ZHAO F Y, HOU Q, C et al. PacBio sequencing reveals bacterial community diversity in cheeses collected from different regions[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 103(2): 1238-1249.
- [3] BAVA L, BACENETTI J, GISLON G, et al. Impact assessment of traditional food manufacturing: The case of Grana Padano cheese[J]. Science of the Total Environment, 2018, 626(6): 1200-1209.
- [4] YUNITA D, DODD C E R. Microbial community dynamics of a blue-veined raw milk cheese from the United Kingdom[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(6): 4923-4935.
- [5] PANEBIANCO F, GIARRATANA F, CARIDI A, et al. Lactic acid bacteria isolated from traditional Italian dairy products: Activity against *Listeria monocytogenes* and modelling of microbial competition in soft cheese[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 137(1): 110446.
- [6] 雷炎, 周亚澳, 单春会, 等. 基于高通量测序技术奶豆腐核心细菌类群的研究[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(6): 9-13.
LEI Y, ZHOU Y A, SHAN C H, et al. Study on core bacterial groups of milk curd based on high-throughput sequencing technology[J]. Dairy Industry of China, 2020, 48(6): 9-13.
- [7] BIOLCATTI F, FERROCINO I, BOTTERO M T, et al. Short communication: High-throughput sequencing approach to investigate Italian artisanal cheese production[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(11): 10015-10021.
- [8] DE PASQUALE I, DI CAGNO R, BUCHIN S, et al. Microbial ecology dynamics reveal a succession in the core microbiota involved in the ripening of pasta filata caciocavallo pugliese cheese[J]. Appl En-

- viron Microbiol, 2014, 80(19): 6243–6255.
- [9] AFSHARI R, PILLIDGE C J, DIAS D A, et al. Microbiota and metabolite profiling combined with integrative analysis for differentiating cheeses of varying ripening ages[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11(1): 592060.
- [10] 郑心, 杨番, 夏程程, 等. 代谢组学在发酵食品研究中的应用[J]. *中国酿造*, 2019, 38(7): 10–15.
ZHENG X, YANG F, XIA C C, et al. Application of metabolomics in the study of fermented food[J]. *China Brewing*, 2019, 38(7): 10–15.
- [11] 孙晓东. 东北地区传统发酵豆酱中真菌区系及功能菌株的代谢组学研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2020.
SUN X D. Metabolomics study of fungal flora and functional strains in traditional fermented bean paste in Northeast China[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2020.
- [12] AFSHARI R, PILLIDGE C J, DIAS D A, et al. Biomarkers associated with cheese quality uncovered by integrative multiomic analysis[J]. *Food Control*, 2020, 123: 107752.
- [13] SCANO P, CUSANO E, CABONI P, et al. NMR metabolite profiles of dairy: A review[J]. *International Dairy Journal*, 2019, 90: 56–67.
- [14] 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.
- [15] YANG C, YOU L, KWOK L Y, et al. Strain-level multiomics analysis reveals significant variation in cheeses from different regions[J]. *LWT-Food Science & Technology*, 2021, 151: 112043.
- [16] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics – Oxford Academic*, 2014, 30(15): 2114–2120.
- [17] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(4): 357–359.
- [18] TRUONG D T, FRANZOSA E A, TICKLE T L, et al. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(10): 902–903.
- [19] FRANZOSA E A, MCIVER L J, RAHNAVARD G, et al. Species-level functional profiling of metagenomes and metatranscriptomes[J]. *Nat Methods*, 2018, 15(11): 962–968.
- [20] LI F Q, WANG F, YANG F Q, et al. Analysis of flavonoids in Chuan *Citrus reticulata* Pericarpium and its adulterant using UHPLC-ESI-MS/MS[J]. *Nat Pro Rec Dev*, 2020, 32(8): 1324–1330.
- [21] CHEN W, GONG L, GUO Z L, et al. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: Application in the study of rice metabolomics[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 1769–1780.
- [22] ZHANG A H, SUN H, WANG P, et al. Modern analytical techniques in metabolomics analysis[J]. *Analyst*, 2011, 137(2): 293–300.
- [23] 王春艳, 李宇辉, 李应彪, 等. 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 C Y, LI Y H, LI Y B, et al. Microbial diversity and function analysis in traditional handmade cheese in Yili pastoral area of Xinjiang[J]. *Food Science*, 2019, 40(24): 110–118.
- [24] 吕瑞瑞, 杨成聪, 李伟程, 等. 不同地区奶酪中乳酸菌多样性研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(11): 201–208.
LÜ R R, YANG C C, LI W C, et al. Studies on lactic acid bacterial diversity of cheese from different areas[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(11): 201–208.
- [25] 赵顺先, 关统伟, 向慧平, 等. 基于高通量测序技术的新疆传统干奶酪乳酸菌多样性分析[J]. *四川农业大学学报*, 2018, 36(5): 688–695.
ZHAO S X, GUAN T W, XIANG H P, et al. Diversity analysis of lactic acid bacteria in traditional dry cheese of Xinjiang based on high-throughput sequencing technology[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2018, 36(5): 688–695.
- [26] WANG Y Q, WU J T, LV M X, et al. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 612285.
- [27] KURATSU M, HAMANO Y, DAIRI T. Analysis of the *Lactobacillus* metabolic pathway[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(21): 7299–7301.
- [28] AFSHARI R, PILLIDGE C J, READ E, et al. New

- insights into cheddar cheese microbiota–metabolome relationships revealed by integrative analysis of multi–omics data[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 3164.
- [29] KING M F, BOYD L C, SHELDON B W. Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1992, 69(6): 545–551.
- [30] JANOUŠEK J, PILAŘOVÁ V, MACÁKOVÁ K, et al. Vitamin D: Sources, physiological role, biokinetics, deficiency, therapeutic use, toxicity, and overview of analytical methods for detection of vitamin D and its metabolites[J]. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2022, 59(8): 517–554.
- [31] PRETE R, ALAM M K, PERPETUINI G, et al. Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: A sustainable tool for functional foods[J]. *Foods*, 2021, 10(7): 1653.
- [32] MCGORRIN R J. The significance of volatile sulfur compounds in food flavors[J]. *ACS Symposium Series*, 2011, 1068: 3–31.
- [33] DEGEEST B, DE VUYST L. Correlation of activities of the enzymes α -phosphoglucomutase, UDP–galactose 4–epimerase, and UDP–glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8): 3519–3527.
- [34] GIRAFFA G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28(2): 251–260.
- [35] HOLS P, HANCY F, FONTAINE L, et al. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(3): 435–463.

Analysis of Microbial Community and Metabolite Characteristics of Traditional Cheese Based on Multi–omics

YAO Jianxia, WANG Dandan, XIA Yanan, CHEN Yongfu*

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

Abstract Microorganisms are the drivers of flavor compound production in cheese, and their community composition, dynamic succession, and resulting metabolites all influence the flavor and quality of cheese. In this study, metagenomics and metabolomics techniques were employed to analyze the microbial diversity and metabolite composition of traditional cheese samples from Ordos, Inner Mongolia. The aim was to decipher the correlation between microbial communities and the formation of cheese metabolites. The results revealed the presence of 8 phylum, 98 genus, and 205 species in the traditional cheese from Ordos. The cheese samples could be divided into two groups by principal component analysis. In ERDS–1 group, the dominant bacteria species were *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. The main dominant bacteria species of ERDS–2 group cheese were *Delbrueckii* and *Streptococcus thermophilus*. The microbial diversity of cheese in ERDS–1 group was higher than that in ERDS–2 group, and the metabolic pathway glycolysis IV (PWY–1042) was significantly different between the two groups ($P < 0.05$). This may be due to the differences in the production process, production temperature and microorganisms of the milk source, which lead to the difference in the structure of cheese flora, resulting in differences in metabolites. A total of 744 metabolites belonging to 14 classes were detected in the cheese samples, and 26 metabolites with significant differences were identified. Significant correlations were observed between certain bacterial species, such as *Lactobacillus delbrueckii* and *Streptococcus thermophilus*, and metabolites content such as calcitriol, UDP–glucose, and lyso–phosphatidylcholine in the cheese. The results of this experiment provide a theoretical basis for the mining of core bacteria and key metabolites in cheese, and provide a reference for the industrial production of traditional cheese.

Keywords traditional cheese; metagenomics; metabolomics; correlation