

# 不同天然奶酪发酵剂和非发酵剂微生物多样性的 高通量测序研究

曾椿淋<sup>1</sup>, 朱琳<sup>1</sup>, 高凤<sup>1</sup>, 俞冰倩<sup>2</sup>, 徐琴<sup>1</sup>, 杨赛<sup>2</sup>, 魏巍<sup>2</sup>

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013) (2. 江苏大学农业装备工程学院, 江苏镇江 212013)

**摘要:** 为探究天然奶酪中发酵剂和非发酵剂微生物群落结构, 应用 Illumina-HiSeq 高通量测序技术, 对江苏省主要销售的 5 组进口天然奶酪表皮和内部的细菌 16S rDNA 序列 V4 区进行测序。所有样品的有效序列均在 50000 条以上, 可操纵分类单元(OTU)数量为 118~646。多样性指数分析和主成分分析结果表明, 天然奶酪表皮比内部具有更高的细菌群落丰富度和不同的群落结构。样品中发酵剂细菌属为乳球菌属(*Lactococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*), 均位于相对丰度前五, 总相对丰度在 51~97%。样品中非发酵剂微生物分布于细菌厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)和软壁菌门(Tenericutes), 相对丰度在 2~16%。具有产耐热乳糖酶功能的非发酵剂微生物栖热菌属(*Thermus*, 相对丰度 0.02%~3.53%) 在奶酪中首次被发现, 为发掘天然奶酪中的微生物资源提供了可能。本研究也为解析天然奶酪中微生物与其风味质构的关系提供了基础数据。

**关键词:** 天然奶酪; 发酵剂微生物; 非发酵剂微生物; 高通量测序

文章编号: 1673-9078(2018)10-117-125

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.017

## Characterization of the Diversity of Starter and Non-starter

## Microorganism from Natural Cheeses by High-throughput Sequencing

ZENG Chun-lin<sup>1</sup>, ZHU Lin<sup>1</sup>, GAO Feng<sup>1</sup>, YU Bing-qian<sup>2</sup>, XU Qin<sup>1</sup>, YANG Sai<sup>2</sup>, WEI Wei<sup>2</sup>

(1.School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China) (2.Jiangsu Provincial Key Laboratory of Modern Agricultural Equipment and Technology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** To reveal the diversity characteristic of starter and non-starter microorganism from natural cheeses, the Illumina-HiSeq high-throughput sequencing technology was used to carry out sequencing of V4 regions of 16S rDNA gene in the microorganism from the rinds and cores of the five groups of natural cheeses. The number of valid sequences obtained from each sample was over 50,000, and these sequences were confirmed as 118 to 646 operational taxonomic units (OTUs) in each sample. Chao 1 index, Shannon's index, and Simpson's index were used to evaluate the diversity of the samples, the results showed the rinds of natural cheese have higher bacterial diversity than the cores. Principal co-ordinates analysis showed there was a great difference in the bacterial community structure between the rind and the core of the natural cheese. The starter microorganism groups were of the genus *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus*, with a total relative abundance between 51% and 97%. The non-starter microorganism groups were of the phylum *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Deinococcus-Thermus* and *Tenericutes*, with a total relative abundance between 2% and 16%. Furthermore, the genus *Thermus*, which can screen thermostable lactase, was firstly reported and was a predominant non-starter microbial group in all the samples. This study contributed to the clarification of the effect of microorganisms on flavor in natural cheeses, as well as the exploration of microbial resources in natural cheeses.

**Key words:** cheese; starter microorganism; non-starter microorganism; high-throughput sequencing

收稿日期: 2018-04-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31600069; 41503068); 江苏省自然科学基金项目(BK20150496; BK20150497); 江苏省高校自然科学基金(15KJB550002; 15KJB180002)

作者简介: 曾椿淋(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 奶酪微生物多样性和功能性研究

通讯作者: 朱琳(1982-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 发酵微生物资源性研究

奶酪又称干酪,是动物乳经发酵产生的有机酸或不同风味的乳制品<sup>[1]</sup>。奶酪中的微生物分为发酵剂微生物和非发酵剂微生物两种,这些微生物在蛋白质凝固和独特风味形成过程中发挥着决定性的作用<sup>[2]</sup>。发酵剂微生物包括标注于商品标签上的人为添加已知微生物和源于原料奶及生产环境的未知微生物,它们将糖类物质转化为有机酸或分泌凝乳酶使蛋白质凝固,也为后续微生物的生长及代谢创造适宜的环境<sup>[3]</sup>。非发酵剂微生物是除发酵剂微生物之外的微生物类群的统称,其可以分泌种类繁多的蛋白酶降解酪蛋白和多肽,产生大量氨基酸,在奶酪成熟期独特风味和质构的形成过程中发挥重要作用<sup>[4-6]</sup>。目前,人们对奶酪中微生物的研究主要集中在占据优势丰度的发酵剂微生物<sup>[7]</sup>,但对相对丰度较低的非发酵剂微生物的认知不足。

因此,全面解析奶酪样品中微生物群落多样性,比较不同种类奶酪样品发酵剂和非发酵剂微生物群落结构差异,对解析奶酪蛋白质凝固和风味质构形成具有重要的参考价值。

我国市场目前销售的主要天然奶酪均为进口原酪,其商品标签上均注明了人为添加的发酵剂微生物种类。由于天然奶酪存在成熟过程,造成奶酪表皮和内部性质不同<sup>[8]</sup>。尽管人们已经明确了乳酸菌(LAB)类发酵剂微生物是天然奶酪中的主要微生物类群,但不同种类、不同部位天然奶酪微生物群落多样性是否存在差异,天然奶酪中人为添加发酵剂微生物类群是否为该奶酪中的优势微生物类群,天然奶酪中是否还存在其它发酵剂微生物类群,以及天然奶酪中非发酵剂微生物类群的多样性特征等问题,由于奶酪微生物研究方法的限制,仍尚未明确。

目前奶酪中微生物群落多样性研究主要依靠的培养法和非培养法(PLFA、PCR-DGGE和16SrRNA克隆文库等)<sup>[9]</sup>,均难以确定奶酪微生物群落全貌,造成对奶酪内微生物群落多样性评价的偏差。近年来迅速发展的高通量测序技术,可以快速且准确获得样品中大多数微生物的多样性信息<sup>[10]</sup>,为深度解析上述奶酪微生物群落的多样性特征提供了可行的方法。

本研究应用高通量测序技术,对不同天然软质奶酪样品进行微生物群落结构特征解析。通过对不同奶酪样品中测序文库的分析和对应微生物物种的注释,解析不同天然奶酪不同部位(表皮和内部)的发酵剂和非发酵剂微生物群落构成和特征差异、探讨天然奶酪样品中发酵剂微生物可能的来源和非发酵剂微生物中发挥成熟作用的潜在类群。为进一步解析微生物与奶酪风味质构之间的关系提供有效的基础数据。同时,

凝乳酶使蛋白质凝固,并经进一步成熟而形成的也具有为发掘和分离奶酪中的微生物菌株资源奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

本研究共采集江苏地区市面主要销售的5种不同进口天然软质成熟奶酪作为供试样品,5种奶酪的生产工艺包括原料乳杀菌、接种发酵、凝乳、排除乳清、盐浸、接种霉菌发酵剂和成熟等工序<sup>[11-13]</sup>,各奶酪成熟的环境根据制作工厂的不同而各不相同。所有样品均购自镇江市欧尚超市,未开封样品购回后置于4℃冰箱保存,以用于后续试验分析。样品具体信息如下:

M牌卡门培尔奶酪,已标注的人为添加发酵剂微生物为:乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus.lactis* subsp.*lactis*)和乳酸乳球菌双乙酰亚种(*Lc.lactis* subsp.*cremoris*)。该奶酪样品设置表皮(MCr)和内部(MC)两个处理;

M牌布里奶酪,已标注的人为添加发酵剂微生物为:乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lc.lactis* subsp.*lactis*)和乳酸乳球菌双乙酰亚种(*Lc.lactis* subsp.*cremoris*)。该奶酪样品设置表皮(MBr)和内部(MB)两个处理;

B牌小布里奶酪,已标注的人为添加发酵剂微生物为:嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、嗜酸乳杆菌(*Lb.acidophilus*)和白青霉菌(*Penicillium candidum*)。该奶酪样品设置表皮(BPr)和内部(BP)两个处理;

B牌布里布兰奶酪,已标注的人为添加发酵剂微生物为:嗜热链球菌(*S.thermophilus*)、嗜酸乳杆菌(*Lb.acidophilus*)、白青霉菌(*P.candidum*)和洛克福青霉(*P.roqueforti*)。该奶酪样品设置表皮(BBr)和内部(BB)两个处理;

P牌卡门培尔奶酪,已标注的人为添加发酵剂微生物为:乳酸乳球菌乳脂亚种(*S.thermophilus*)、乳酸乳球菌双乙酰亚种(*Lc.lactis* subsp.*cremoris*)和白青霉菌(*P.candidum*)。该奶酪样品设置表皮(PCr)和内部(PC)两个处理。研究用的试剂和试剂盒包括:Power Food Microbial DNA Isolation Kit 试剂盒,美国Mobio公司;HS Taq 酶, Takara 试剂公司;KOD SYBR qPCR Mix 试剂盒,东洋纺公司。

### 1.2 仪器与设备

MP\*FastPrep-24 样品处理系统,美国安倍医疗(MP Biomedicals)公司;电子天平,上海精科天平仪器厂;高速冷冻离心机,德国艾本德(Eppendorf)公司;

PCR 仪, 美国 Thermo 公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 奶酪样品微生物总 DNA 提取及 PCR 扩增

奶酪样品总 DNA 提取参考 Power Food Microbial DNA Isolation Kit 试剂盒说明书。取样方式参考郭善广等<sup>[12]</sup>的方法, 以天然奶酪最外缘向内 7 mm 作为表皮, 其余部分作为内部。

以提取到的样品总 DNA 为模板, 对细菌 16S rDNA 的 V4 区对应的 DNA 序列进行 PCR 扩增。以通用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对细菌 16S rDNA 的 V4 区域进行扩增<sup>[14]</sup>。采用 Takara 试剂公司的 HS Taq 酶进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系为: Buffer 2.5  $\mu$ L、Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L) 2  $\mu$ L、dNTP 2  $\mu$ L、Primer F (515F) 0.5  $\mu$ L、Primer R (806R) 0.5  $\mu$ L、BSA (5 mg/mL) 2.5  $\mu$ L、Taq 酶 0.1  $\mu$ L、DNA 模板 1  $\mu$ L、加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L。反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min<sup>[14]</sup>。PCR 扩增反应完成后, 取 5  $\mu$ L 扩增产物用 2% 琼脂糖电泳检测, 若在 300 bp 左右处出现清晰无拖尾无弥散现象的条带, 则说明扩增成功。

#### 1.3.2 高通量测序及数据分析

将 PCR 扩增到的奶酪样品细菌 16S rDNA 委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司在 Illumina-HiSeq 平台上进行高通量测序, 分析奶酪样品细菌群落多样性。对高通量测序初始数据进行质量控制, 以获得更为精准、高质量的 DNA 序列信息, 采用 Mothur 软件将得到的 16S rDNA 基因序列在 RDP (ribosomal database project) 数据库中进行嵌合体检验, 充分去除嵌合体序列。为了得到每个 OTU (Operational Taxonomic Unit) 对应的物种分类信息, 采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 用 Mothur 软件构建稀释性曲线<sup>[15]</sup>。然后基于有效数据进行 OTUs 聚类 and 物种分类分析, 并将 OTU 和物种注释结合, 从而得到每个样品的 OTUs 和分类谱系的基本分析结果。再对 OTUs 进行丰度、多样性指数等分析, 利用 QIIME 软件计算样品 Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数<sup>[15-17]</sup>。在以上分析的基础上, 进行一系列 OTUs、物种组成聚类分析与 PCoA 分析, 挖掘样品之间物种组成差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同奶酪样品细菌群落的高通量测序文库评价

#### 库评价

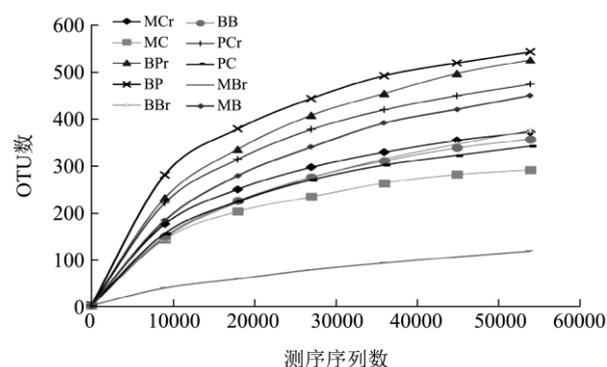


图1 细菌群落高通量测序文库稀释曲线

Fig.1 Rarefaction curve of bacterial high-throughput sequencing library

注: 所有图表中, MCr 和 MC 代表 M 牌卡门培尔奶酪表皮和内部; MBr 和 MB 代表 M 牌布里奶酪表皮和内部; BPr 和 BP 代表 B 牌小布里奶酪表皮和内部; BBr 和 BB 代表 B 牌布里布兰奶酪表皮和内部; PCr 和 PC 代表 P 牌卡门培尔奶酪表皮和内部。

根据细菌 16S rDNA 高通量测序文库的稀释曲线(图 1), 当测序序列超过 50000 条时, 虽然仍然有新的 OTU 被发现, 但是稀释曲线趋于平缓, 达到平台期, 说明测序数据量渐进合理, 更多的数据量只会产生少量新的 OTU 以及新得注释物种, 该文库的测序结果已经基本能够代表样品细菌群落的组成。计算所有 10 个测序文库的覆盖率均超过 99% (表 1)。因此, 10 个样品的测序文库趋于饱和, 测序结果可以用于后续的生物信息学分析。

根据奶酪样品高通量测序文库质量汇总表(表 1), 10 个样品获得有效序列数量均超过 50000 条, 可操纵分类单元(OTU)数量为 118~646 之间。Chao1 指数是群落微生物的丰度指数, 主要反映生态系统中物种的数目, 其值越高表明群落物种的丰度越高; Shannon 指数主要反映群落种数和各种间个体分配的均匀性, 各种之间, 个体分配越均匀, 该指数就越大; Simpson 指数具体表示的是在一个群落中随机取样的两个个体属于不同种的概率, 该指数不会超过 1, 且越大, 表示该群落物种多样性越大。综合比较各个样品 OTU 数量、Chao 1 指数、Simpson 指数和 Shannon 指数, 发现除 M 牌布里奶酪和 B 牌布里布兰奶酪样品外, 其它样品表皮比内部均具有更高的 OTU 数量、Chao 1 指数、Simpson 指数和 Shannon 指数, 说明天然奶酪表皮的细菌种丰富度普遍高于内部。

## 2.2 OTU 水平上天然奶酪不同部位细菌群落

### 特征差异

韦恩图用于表示多个组共有和特有 OTU 的情况。从图 2 可以看出, 5 种奶酪样品表皮的 OTU 总数为 2251, 内部的 OTU 总数为 2289, 对 5 种奶酪的表皮

和内部分别进行基于 OTU 的韦恩分析, 发现 5 种奶酪表皮的具有 51 个共有 OTU, 占表皮 OTU 总数的 2.3%; 内部具有 121 个共有 OTU, 占 OTU 总数的 5.3%。各个样品表皮特有 OTU 数为 21、54、62、142、148, P 牌卡门培尔奶酪表皮的特有 OTU 数最多。各个样品内部特有 OTU 数为 38、45、63、76、137, B 牌小布里奶酪内部的特有 OTU 数最多。

表 1 奶酪样品高通量测序文库信息汇总

Table 1 Summary of the bacterial high-throughput sequencing library of all cheese samples

样品	原始序列数	有效序列数	OTU 数量	文库覆盖度	Chao 1 指数	Simpson 指数	Shannon 指数
MCr	71257	56035	454	0.998	430.722	0.577	2.033
MC	71889	54238	361	0.999	311.012	0.223	1.076
MBr	94659	92754	118	0.999	218.5	0.318	0.949
MB	78712	75503	451	0.997	583.221	0.213	1.129
BPr	79718	75040	646	0.998	614.919	0.638	2.312
BP	80076	72864	612	0.997	613.939	0.464	2.335
BBr	88258	83185	472	0.997	552.182	0.386	1.37
BB	81586	74383	462	0.998	412.059	0.465	1.449
PCr	73473	69692	561	0.998	540.392	0.317	1.433
PC	73117	69204	403	0.998	398.943	0.235	1.103

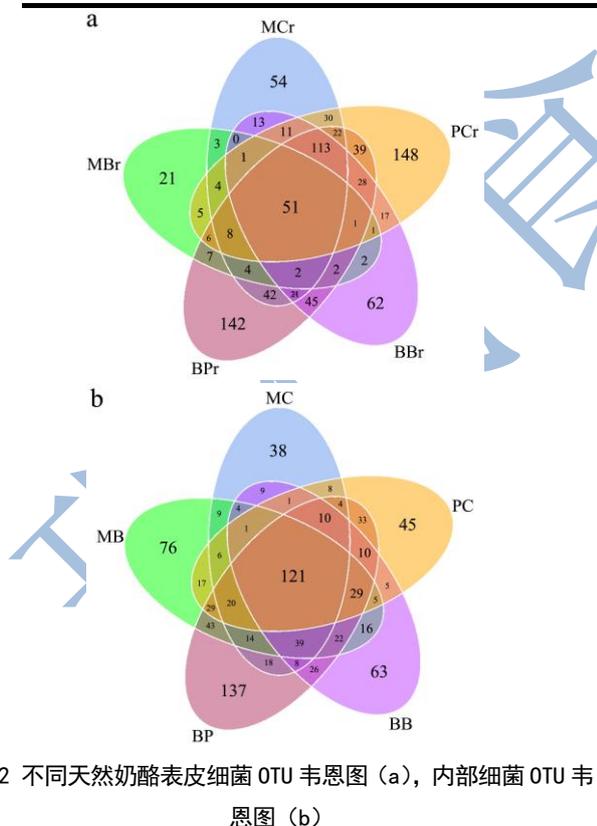


图 2 不同天然奶酪表皮细菌 OTU 韦恩图 (a), 内部细菌 OTU 韦恩图 (b)

Fig.2 Venn figure of bacterial OTU from the rind (a) and core (b) of all cheese samples

为进一步对每个样品的群落结构差异进行分析, 对样品进行基于 UniFrac 的加权的主坐标分析。即应

用 UniFrac 方法将所有处理细菌 OTU 进行加权的聚类分析, 即在考虑 OTU 序列的数量和进化关系的基础上, 计算各个样品间的距离矩阵, 再对上述距离矩阵进行降维分析, 结果如图 3 所示。基于 UniFrac 的加权的主坐标分析其第一主成分和第二主成分的贡献率分别为 52.79% 和 29.18%, 除 PC 样品外, 各个样品表皮和内部之间主成分距离较大, 而所有样品内部聚成一组, 表皮各自分开。该结果说明天然奶酪表皮和内部之间细菌群落构成差异较大。同时, 不同天然奶酪的表皮之间细菌群落结构组成差异较大, 不同天然奶酪内部之间细菌群落结构组成相似。

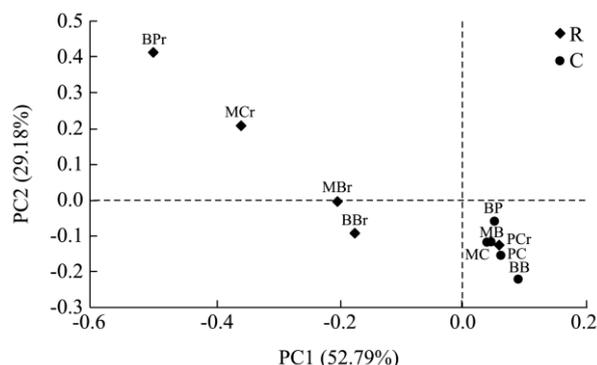


图 3 不同奶酪样品细菌群落结构的主坐标分析

Fig.3 Principal Co-ordinates Analysis of bacterial community of all cheese samples

注: R: 奶酪表皮; C: 奶酪内部。

### 2.3 不同奶酪样品发酵剂细菌和非发酵剂细菌的物种注释及分布特征

对所有 OTU 序列进行物种注释,共得到 414 个不同的细菌属。其中,各个处理中相对丰度所占比例排名前十(TOP10)细菌属的相对丰度总和超过了总数的 90%。对各处理中的 TOP10 的细菌属组成(图 4)进行统计发现,5 种天然奶酪的表皮和内部最优势的细菌属均为发酵剂微生物所在的属,即乳球菌属(*Lactococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*),相对丰度占细菌总丰度的 51~97%之间。M 牌不同种类奶酪的表皮和内部最优势细菌属均为乳球菌属(*Lactococcus*)。其中,MC 奶酪的表皮和内部乳球菌属相对丰度分别为 63.55%和 91.94%,MB 奶酪的表皮和内部乳球菌属相对丰度分别为 84.48%和 91.20%。B 牌不同种类奶酪的最优势细菌属并不相同,BP 奶酪表皮和内部最优势细菌属均为乳球菌属(*Lactococcus*),相对丰度分别为 48.30%和 75.82%;BB 奶酪表皮和内部最优势细菌属均为乳杆菌属(*Lactobacillus*),相对丰度分别为 77.23%和 68.83%。P 牌奶酪的表皮和内部最优势细菌属均为链球菌属(*Streptococcus*),PC 奶酪表皮和内部链球菌属的相对丰度分别为 82.24%和 87.40%。所有样品表皮和内部最优势的菌属均为同一细菌属。

除人为添加发酵剂细菌属之外,所有的样品中均存在的其它发酵剂细菌属。MC 奶酪中人为添加乳球菌属,还存在链球菌属(表皮 1.71%,内部 1.24%)和乳杆菌属(表皮 1.38%,内部 0.97%)。MB 奶酪中人为添加乳球菌属,还存在链球菌属(表皮 0.42%,内部 1.52%)和乳杆菌属(表皮 0.09%,内部 0.74%)。BP 奶酪中人为添加链球菌属和乳杆菌属,还存在乳球菌属(表皮 48.28%,内部 75.74%)。BB 奶酪中人为添加链球菌属和乳杆菌属,还存在乳球菌属(表皮 1.59%,内部 2.75%)。PC 奶酪中人为添加乳球菌属,还存在链球菌属(表皮 82.19%,内部 87.40%)和乳杆菌属(表皮 0.91%,内部 0.54%)。这些发酵剂细菌可能来自原料奶或者制作奶酪的环境。同时,样品中最优势的并不一定是商品标注的人为添加的微生物,例如 BP 处理(B 牌小布里奶酪)中添加了嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌和白青霉菌,但其最优势的细菌属为乳球菌属;PC 处理(P 牌卡门培尔奶酪)中添加了乳酸乳球菌乳脂亚种、乳酸乳球菌双乙酰亚种和白青霉菌,但其最优势的细菌属为链球菌属。

10 个样品中排名前 10 的非发酵剂细菌属有

*Helicobacter* 属、*Actinobacillus* 属、*Sphingomonas* 属、*Thermus* 属、*Acinetobacter* 属、*Campylobacter* 属。MC 奶酪中最优势的非发酵剂细菌属为 *Thermus* 属(表皮 0.30%,内部 0.36%);MB 奶酪中最优势的非发酵剂细菌属为 *Thermus* 属(表皮 0.17%,内部 0.99%);BP 奶酪表皮中最优势的非发酵剂属为 *Thermus* 属(0.46%),内部最优势的非发酵剂属为 *Sphingomonas* 属(4.11%);BB 奶酪中最优势的非发酵剂属为 *Acinetobacter* 属(表皮 0.03%,内部 0.04%);PC 奶酪中最优势的非发酵剂属为 *Thermus* 属(表皮 0.69%,内部 2.22%)。除 BP 奶酪以外,其余奶酪样品表皮和内部最优势的非发酵剂细菌属为同一菌属。

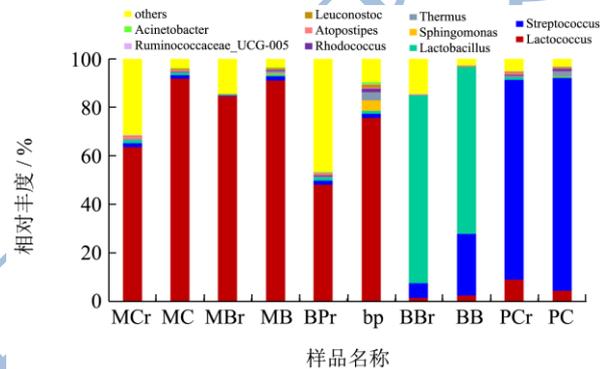


图 4 不同奶酪样品 TOP10 的优势细菌属相对丰度

Fig.4 Relative abundance of bacterial genus at TOP10 level from all cheese samples

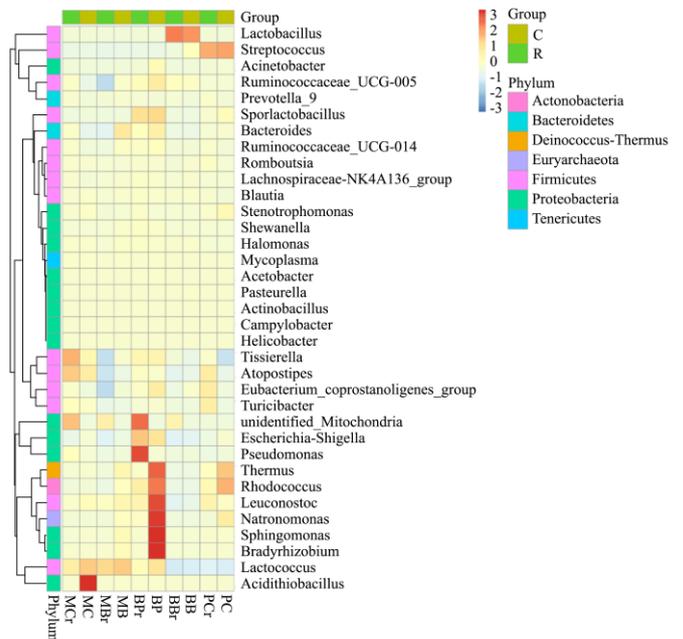


图 5 不同奶酪样品 TOP35 的细菌属相对丰度及聚类分布热图

Fig.5 Heatmap of bacterial genus at TOP35 level from all cheese samples

进一步对各处理的 TOP35 细菌属进行研究,绘制其相对丰度热图(图 5)。结果发现除了少数分布在厚壁菌门(Firmicutes)的几个发酵剂微生物细菌所在属外,其余细菌属均为非发酵剂微生物所在的属,分布于细菌的厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)和软壁菌门(Tenericutes)。热图可以通过颜色梯度及相似程度来反映多个样品在各分类水平上同一门类的相对丰度差异,从而体现各分类水平上群落组成的相似性和差异性。通过比较 10 个奶酪样品各个属相对丰度热图,发现不同进口奶酪之间发酵剂细菌所在的属相对丰度存在差异,如 BBr 和 BB 样品中 *Lactobacillus* 属相对丰度明显高于该属在其他样品中的相对丰度,PCr 和 PC 样品中链球菌 *Streptococcus* 属相对丰度明显高于该属在其他样品中的相对丰度。有一些非发酵剂细菌所在的属相对丰度也存在明显差异,如 MC 样品中的非发酵剂细菌属 *Acidithiobacillus* 属, BPr 样品中 *Pseudomonas* 属, BP 样品中 *Thermus* 属、*Rhodococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Natronomonas* 属、*Sphingomonas* 属、*Bradyrhizobium* 属的相对丰度明显不同于这些属在其他样品中的相对丰度。

### 3 讨论

3.1 本研究较已报道的分离培养的方法获得了更多关于奶酪中细菌群落结构信息。传统的培养法的工作量大耗时长,又因培养基和培养条件的限制,使得检出的奶酪中微生物种类受限且无法获得种群结构,造成对奶酪内生态系统评价的偏差。目前,通过培养法从奶酪中分离出的细菌主要集中在优势性较强的乳杆菌、嗜热链球菌、乳球菌、明串珠菌、肠球菌、片球菌等发酵剂与非发酵剂细菌属<sup>[18-22]</sup>。而本研究利用高通量测序的方法,亦获得了上述已分离到的微生物属,这些属在各个样品中的相对比例为 5.5%~93.3%,同时还获得了分属于厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、异常球菌-栖热菌门和软壁菌门等 6 个门的 60 个纲、112 个目、196 个科的 407 个不同的非发酵剂细菌属,相对丰度为 2.7%~47.5%。这些详细而全面的数据为后期研究微生物与奶酪风味质构的关系提供了有效的基础信息。

3.2 在本研究中,主坐标分析结果显示同一种类天然奶酪的不同部位、不同种类天然奶酪表皮之间细菌群落结构存在明显差异,而不同品牌天然内部之间细菌群落结构相似。影响食品中微生物生长繁殖的因素包括温度、pH、水分、渗透压、氧气等理化因素,以及

原料奶的动物来源、添加的原料、原料奶是否采用巴氏杀菌技术、奶酪中原料奶中自带的微生物和奶酪的酸化过程等加工工艺因素<sup>[23-25]</sup>。同一种奶酪的加工工艺条件相同,但是其不同部位的水分、渗透压等理化因素存在差异,所以同一天然奶酪表皮和内部细菌群落结构不同,很有可能是理化性质不同造成的。此外,奶酪表皮暴露在外部环境中接触到了内部接触不到的菌,也有可能造成表皮和内部的细菌群落结构不一致<sup>[26]</sup>。但是不同品牌天然内部之间细菌群落结构相似,说明了更有可能是外界环境造成了天然奶酪表皮和内部细菌群落结构不一致。这一推测正确与否,还需要后续更深入的研究加以验证。

3.3 物种注释的结果表明,天然奶酪中存在的发酵剂细菌属为乳球菌属(*Lactococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)等,这些细菌属也常常出现在其他奶酪和酸奶等发酵乳制品中<sup>[18,27,28]</sup>。通过分离培养的方法,就可以鉴定这些发酵剂细菌属。但高通量测序技术在鉴定出这些细菌属的同时,还可以对这些属的丰度进行比较,从而获得一些只进行物种注释研究不能得到的发现。通过对发酵剂细菌属的丰度进行比较,我们发现,即使天然奶酪中人工添加了大量发酵剂细菌,但是每个奶酪样品中除了有人工添加发酵剂细菌外,还有来自原料或者奶酪制作环境的发酵剂细菌,且在最后的奶酪商品中人工添加发酵剂细菌不一定是最优势菌属。如 PC 奶酪样品中的最优势细菌属是链球菌属而不是人工加入的乳球菌属, BP 样品中人工加入的细菌属是链球菌属和乳杆菌属,但其最优势细菌属却是乳球菌属。出现这种现象的原因可能是奶酪在制作过程中,pH 值和含水率均下降,理化性质发生了变化,食物环境发生了转变,导致奶酪中存在的微生物群体的选择<sup>[29]</sup>。外界环境因素如温度和相对湿度也影响奶酪生产和成熟期间微生物多样性的演变<sup>[30]</sup>。此外,加入的微生物同原料奶以及奶酪制作环境中的微生物相互影响,也有可能造成奶酪成品中人工加入的细菌不是最后奶酪商品中最优势的细菌。奶酪中微生物的变化是一个动态过程<sup>[31]</sup>,把不同时期奶酪的微生物群落结构与理化性质及环境因素结合起来研究,将更好地揭示奶酪制作过程中微生物群落结构的演替方向。

3.4 除了发酵剂细菌属之外,天然奶酪样品中还存在着大量的其他非发酵剂细菌属。TOP35 属中的 *Halomonas* 属是一类能在绝对盐度(NaCl)为(0~32)%条件下生长的耐盐细菌,该属为亮氨酸氨肽酶阳性且能够利用 DL-乳酸<sup>[32]</sup>; *Rhodococcus* 属中的不透明红球菌可以产谷氨酸氧化酶,能氧化 L-谷氨酸生成  $\alpha$ -

酮戊二酸( $\alpha$ -KG)、 $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[33]</sup>; *Pseudomonas* 属含有 *mgl* 序列, *mgl* 序列编码甲硫氨酸- $\gamma$ -裂合酶(MGL)将甲硫氨酸转化为甲硫醇, 这一反应是奶酪中硫化物形成的关键步骤<sup>[34]</sup>; *Acetobacter* 属可以发酵糖类产生醋酸; *Atopostipes* 属可以产生半胱氨酸蛋白酶; *Turicibacter* 属可以产生 Lon 蛋白酶; *Thermus* 属、*Acidithiobacillus* 属可以产生丝氨酸蛋白酶。这些微生物类群多属于目前尚未被广泛明确认知的微生物类群, 都可能对奶酪的成熟、风味质构形成具有至关重要的作用。通过比较各个属相对丰度, 分析非发酵剂细菌属在不同样品中的存在情况, 结果发现 MC 样品中的非发酵剂细菌属 *Acidithiobacillus* 属, BPr 样品中 *Pseudomonas* 属, BP 样品中 *Thermus* 属、*Rhodococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Natronomonas* 属、*Sphingomonas* 属、*Bradyrhizobium* 属的相对丰度明显高于这些属在其他样品中的相对丰度。猜测上述细菌属可能与 MC、BP 奶酪样品的某种特异性风味的形成有关。在 TOP35 的属中出现了不可分类微生物 *unidentified\_Mitochondria*, 其相对丰度在 0.1%~40.4%, B 牌小布里奶酪中该序列相对丰度最高。由于测序结果与数据库中序列不匹配或相似度不够阈值, 这些序列被归为不可分类的微生物。但 QUIGLEY<sup>[23]</sup> 等人在爱尔兰手工奶酪中亦检测到了 *unidentified\_Mitochondria* 的存在, 经过他们对该序列的进一步检查, 发现这段序列对应于青霉属的线粒体 16S RNA 基因。鉴于 *unidentified\_Mitochondria* 较高的相对丰度以及 B 牌小布里奶酪加工过程中添加了青霉属, 我们推测这段序列很有可能也是来自青霉属的线粒体 16S RNA 基因。

3.5 此外, 利用高通量测序技术也得到了更多的、之前技术不能检测但具有潜在功能的微生物类群。比如, 在 10 个样品中发现了之前未报道过在奶酪中存在的栖热菌属(*Thermus*), 且该属在 10 个样品的相对丰度均超过了 0.02%。栖热菌是耐高温细菌, 主要分布在水热环境如温泉、海底火山口、热水管道以及自热堆肥等地<sup>[35]</sup>, 其最适生长温度为 70 °C~72 °C, 最高生长温度为 79 °C, 最低生长温度为 40 °C<sup>[36]</sup>, 有些奶酪加工时温度能达到 50 °C, 达到该菌生长要求。张敏爱等<sup>[37]</sup> 用 16S rDNA 克隆文库法分析生鲜牛乳中细菌种群的多样性, 在鲜牛乳中也发现了栖热菌属的存在。因此, 可以推测奶酪商品中的栖热菌属可能来自制作奶酪的原料乳。有研究表明栖热菌属可以产生耐热的乳糖酶<sup>[38]</sup>, 该属极有可能是一种可以应用于奶酪加工或者高温条件下发酵乳糖相关工业的微生物资源。由此可见, 拥有庞大的数据量以及测序深度的高

通量测序是分析奶酪中占少数的难以分离检测的非发酵剂微生物多样性, 以及挖掘具有潜在功能微生物的有力工具。

## 4 结论

本研究应用 Illumina-HiSeq 高通量测序技术, 解析了不同进口天然奶酪表皮和内部的发酵剂和非发酵剂细菌的群落结构差异和多样性组成。实验结果表明, 天然奶酪表皮普遍较其内部具有更高的细菌群落丰富度, 且天然奶酪表皮和内部细菌群落具有明显不同的结构组成, 说明外界环境可能对天然奶酪表皮的微生物群落产生了影响。天然奶酪的发酵剂细菌属为乳球菌属、乳杆菌属和链球菌属, 相对丰度在 51%~97%, 且奶酪制作过程中人为大量加入的发酵剂细菌属不一定是奶酪商品中最优势的细菌属; 非发酵剂微生物分布于细菌厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、异常球菌-栖热菌门和软壁菌门, 相对丰度在(2~16)%, 许多非发酵剂细菌具有发酵糖类、利用乳酸以及产蛋白酶等功能, 对奶酪风味质构的形成有重要作用。之前未在奶酪中被报道的 *Thermus* 属的发现, 也为发掘和分离奶酪中的食源性微生物资源奠定了基础。

## 参考文献

- [1] 蔡琳飞, 李健, 陈炼红. 我国奶酪产品研究现状及分析[J]. 中国乳品工业, 2015, 43(7): 42-44  
CAI Lin-fei, LI Jian, CHEN Lian-hong. Research status and analysis of cheese products in China [J]. China Dairy Industry, 2015, 43(7): 42-44
- [2] FITZSIMONS N A, COGAN T M, CONDON S, et al. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1999, 65(8): 3418-3426
- [3] MOREA M, BARUZZI F, COCCONCELLI P S. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing [J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87(4): 574-582
- [4] 黄宜, 刘振民, 莫蓓红, 等. 干酪中微生物的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2016, 45(5): 359-361  
HUANG Yi, LIU Zhen-min, MO Bei-hong, et al. Research progress of microorganisms in cheese [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2016, 45(5): 359-361
- [5] 贾宏信, 吴正钧, 刘振民, 等. 干酪内微生物及其功能的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 135-140  
JIA Hong-xin, WU Zheng-jun, LIU Zhen-min, et al. Research progress of microorganisms and their functions in

- cheese [J]. Food And Fermentation Industries, 2012, 38(2): 135-140
- [6] CASEY M G, H NI J P, GRUSKOVNJAK J, et al. Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of gruyère PDO cheese [J]. Dairy Science & Technology, 2006, 86(6): 407-414
- [7] 李延华,张兰威,王伟君.干酪成熟过程中发酵剂的作用[J].食品科技,2005,8:27-29  
LI Yan-hua, ZHANG Lan-wei, WANG Wei-jun. Effects of starters in the process of cheese ripening [J]. Food Science and Technology, 2005, 8: 27-29
- [8] 孙颜君,孙颜杰,红曲霉在类 Camembert 干酪生产中的应用研究[J].食品工业科技,2016,37(13):167-172  
SUN Yan-jun, SUN Yan-jie. Application of *Monascus* in the production of camembert imitation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(13): 167-172
- [9] 王荣春,徐德昌.干酪中微生物研究方法的比较[J].食品研究与开发,2006,27(5):21-22  
WANG Rong-chun, XU De-chang. Comparing of studying on microbiology from cheese method [J]. Food Research and Development, 2006, 27(5): 21-22
- [10] METZKER M L. Sequencing technologies - the next generation [J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(1): 31-46
- [11] 徐桂花,尤丽琴,张洁.软质奶酪加工工艺研究[J].农业科学研究,2009,30(4):38-40  
XU Gui-hua, YOU Li-qin, ZHANG Jie. Research on the processing technology of soft cheese [J]. Journal of Agricultural Sciences, 2009, 30(4): 38-40
- [12] 郭善广,陈伟,王志江,等.Camembert 奶酪加工过程中主要理化特性研究[J].食品与机械,2009,25(2):26-29  
GUO Shan-guang, CHEN Wei, WANG Zhi-jiang, et al. Physicochemical property changes of Camembert cheese during processing [J]. Food & Machinery, 2009, 25(2): 26-29
- [13] 杨永龙,张杰,宗学醒,等.布里(Brie)奶酪生产工艺研究[J].食品工业,2010,4:16-18  
YANG Yong-long, ZHANG Jie, ZONG Xue-xing, et al. Research of production technology on Brie Cheese [J]. The Food Industry, 2010, 4: 16-18
- [14] DEGNAN P H, OCHMAN H. Illumina-based analysis of microbial community diversity [J]. Isme Journal, 2012, 6(1): 183-194
- [15] BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing [J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59
- [16] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336
- [17] YOUSSEF N, SHEIK C S, KRUMHOLZ L R, et al. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2009, 75(16): 5227-5236
- [18] 杨彦荣,任艳,德亮亮,等.传统奶酪样品中乳酸菌的分离鉴定[J].中国乳品工业,2015,43(9):19-22  
YANG Yan-rong, REN Yan, DE Liang-liang, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional cheese in the republic of Kalmykia in Russian [J]. China Dairy Industry, 2015, 43(9): 19-22
- [19] 崔文,邵怡岚,赵海渊,等.东北地区传统手工奶酪中具有益生特性乳酸菌的分离与筛选[J].黑龙江畜牧兽医,2017,22: 50-52  
CUI Wen, SHAO Yi-lan, ZHAO Hai-yuan, et al. Isolation and screening of lactic acid bacteria with prebiotic characteristics in traditional hand-made cheese in Northeast China [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017, 22: 50-52
- [20] 刘绒梅,田圆圆,耿琦,等.四川稻城传统干酪中乳酸菌的分离鉴定及功能研究[J].中国测试,2017,43(12):58-62  
LIU Rong-mei, TIAN Yuan-yuan, GENG Qi, et al. Isolation, identification and functional properties of lactic acid bacteria derived from traditional cheese in Daocheng, Sichuan [J]. China Measurement & Testing Technology, 2017, 43(12): 58-62
- [21] 周瑶,王颖,安宇,等.奶酪中产杆菌样细菌素乳酸菌的分离与鉴定[J].黑龙江八一农垦大学学报,2012,24(3): 60-63  
ZHOU Yao, WANG Ying, AN Zi, et al. The separation and Identification of lactobacillus of *bacillus bacteriocin* in cheese [J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2012, 24(3): 60-63
- [22] GALA E, LANDI S, SOLIERI L, et al. Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(3): 347-351
- [23] QUIGLEY L, O'SULLIVAN O, BERESFORD T P, et al. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5717-5723

- [24] IRLINGER F, MOUNIER J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(2): 142-148
- [25] PORCELLATO D, SKEIE S B. Bacterial dynamics and functional analysis of microbial metagenomes during ripening of Dutch-type cheese [J]. *International Dairy Journal*, 2016, 61: 182-188
- [26] FEURER C, VALLAEYS T, CORRIEU G, et al. Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a French soft, red-smear cheese? [J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(10): 3189-3197
- [27] SHANGPLIANG H N J, RAI R, KEISAM S, et al. Bacterial community in naturally fermented milk products of *Arunachal Pradesh* and *Sikkim* of India analysed by high-throughput amplicon sequencing [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1532-1541
- [28] 韩墨,王燕,杨志鹏,等.内蒙古传统酸奶乳酸菌的筛选及体外益生效果评价[J].*食品研究与开发*,2018,1:152-156  
HAN Mo, WANG Yan, YANG Zhi-peng, et al. Screening of lactic acid bacteria in traditional yoghurt of inner mongolia and evaluation of its benefit *in vitro* [J]. *Food Research and Development*, 2018, 1: 152-156
- [29] BARANOV S, CISEK A, KLUSEK-GAWENDA M, et al. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese *Caprino d'Aspromonte* produced from raw or thermized goat's milk [J]. *Food Microbiology*, 2003, 20(2): 201-209
- [30] BONETTA S, BONETTA S, CARRARO E, et al. Microbiological characterisation of *Robiola di Roccaverano* cheese using PCR-DGGE [J]. *Food Microbiology*, 2008, 25 (6): 786-792
- [31] SCHORNSTEINER E, MANN E, BEREUTER O, et al. Cultivation-independent analysis of microbial communities on Austrian raw milk hard cheese rinds [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 180(2): 88-97
- [32] 朱凤玲,曲凌云,洪旭光,等.盐单胞菌属一新种的分离与鉴定[J].*海洋科学进展*,2011,29(2):221-228  
ZHU Feng-ling, QU Ling-yun, HONG Xu-guang, et al. Isolation and identification of a new species of *Halomonas* [J]. *Advances In Marine Science*, 2011, 29(2): 221-228
- [33] 刘佳,徐继嗣,罗秋玲,等.不透明红球菌生产谷氨酸氧化酶发酵过程优化[J].*过程工程学报*,2017,17(4):4-820  
LIU Jia, XU Ji-si, LUO Qiu-ling, et al. Optimization of fermentation process for production of glutamic acid oxidase from *Rhodococcus opacus* [J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2017, 17(4): 814-820
- [34] WOLFE B E, BUTTON J E, SANTARELLI M, et al. Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity [J]. *Cell*, 2014, 158(2): 422-433
- [35] 刘涛.云南温泉栖热菌热稳定性普鲁兰酶高产菌株筛选的初步研究[D];昆明理工大学,2005  
LIU Tao. Preliminary study on the screening of high-yield strains of pullulanase with the thermal stability of thermophiles in Yunnan [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2005
- [36] 王浩竹,王正祥.利用针对 16S rDNA 序列的限制性酶切分析鉴定栖热菌属[J].*生物技术*,2009,19(2):13-15  
WANG Hao-zhu, WANG Zheng-xiang. Identification of *thermus* to the species level using 16s rdna gene restriction fragment patterns [J]. *Biotechnology*, 2009, 19(2): 13-15
- [37] 张敏爱,张建军,王子亮,等.16S rDNA 克隆文库法分析生鲜牛乳中细菌种群的多样 [J].*食品安全质量检测学报*,2014, 10:3170-3176  
ZHANG Min-ai, ZHANG Jian-jun, WANG Zi-liang, et al. Study on bacterial population diversity in raw milk with 16S rDNA library analysis method [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2014, 10: 3170-3176
- [38] 蒋燕灵,丁倩,邵靖宇.耐热乳糖酶产生菌株的筛选及产酶条件试验[J].*浙江大学学报(医学版)*,2001,30(3):103-104.  
JIANG Yan-ling, DING Qian, SHAO Jing-yu. Screening *thermostable lactase* producing strain of *thermus* sp and optimization of culture condition [J]. *Journal of Zhejiang University*, 2001, 30(3): 103-104