

# 开菲尔不同发酵时期微生物群落结构的变化

马龙<sup>1</sup>, 邢军<sup>2</sup>, 李安<sup>1</sup>, 张瑞<sup>1</sup>

(1. 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室, 新疆师范大学生命科学学院, 新疆乌鲁木齐 830054)

(2. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830046)

**摘要:** 为探究不同发酵时期开菲尔中的微生物菌群结构的变化情况。本实验采用高通量测序技术对实验室制备的不同发酵时间获得的开菲尔样品进行测序, 并分析开菲尔在整个发酵过程中微生物群落结构的动态演变, 结果显示, 开菲尔在发酵过程中共鉴定出了12个门的细菌和4个门的真菌, 明确了厚壁菌门(Firmicutes)为丰度占比最大菌门。研究表明在发酵过程中共有117个属的细菌参与发酵, 其中乳杆菌属(*Lactobacillus*)在整个发酵过程中呈现先增后减再增加的变化趋势, 链球菌属(*Streptococcus*)在整个发酵过程中呈现先增后减的变化趋势, 芽胞杆菌属(*Bacillus*)在整个发酵过程中逐渐减少。还有一些未被分类的细菌新物种资源有待深入挖掘。本实验中酵母菌未能发现, 真菌中丰度占比较大的菌门为子囊菌门(Ascomycota), 发现在发酵前期主要有链格孢属、孢霉属、枝孢霉属、曲霉属等, 但是在发酵过程中真菌菌属丰度占比呈逐渐减少的趋势。

**关键词:** 开菲尔; 不同发酵时期; 微生物群落; 演变

文章编号: 1673-9078(2019)08-27-34

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.005

## Evolution of Microbial Community Structure in Different Fermentation Periods in Kefir

MA Long<sup>1</sup>, XING Jun<sup>2</sup>, LI An<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>

(1. Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, College of Life Science, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China)

(2. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

**Abstract:** To investigate the changes in microbial flora structure in Kefir during different fermentation periods. In this work, high-throughput sequencing technology was used to sequence the Kefir samples obtained in different fermentation time in the laboratory, and the dynamic evolution of microbial community structure during the whole fermentation process was analyzed. The results showed that a total of 12 door bacteria and 4 door fungi were identified during the Kefir fermentation process., and it was confirmed that the Firmicutes accounted for the abundance of the largest bacteria. A total of 117 genera of bacteria participate in the fermentation process, in which *Lactobacillus* increased firstly, and then decreased, and increased during the final phase of process. *Streptococcus* increased first and then decreased during the fermentation process. *Bacillus* gradually decreased throughout the fermentation process. Some unclassified fungi needed to be further investigated. In this wok, the yeast was not found. The abundance of fungi in the fungus is Ascomycota. It was found that there were mainly *Alternaria*, *Mortierella*, *Cladosporium*, *Aspergillus*.etc. However, the proportion of fungi in the fermentation process gradually decreased.

**Key words:** kefir; different fermentation periods; microbial community; evolution

开菲尔(Kefir)是一种味酸、粘稠的乳酒饮料,由包裹于“开菲尔粒”(Kefir Grain)中的细菌和酵母菌发酵羊乳或牛乳而来。因其独特的风味、爽滑的质感和对人体的保健作用而受到越来越多人的欢迎<sup>[1-3]</sup>。新疆地区传统的乳制品制作方法有着明显的地域差

收稿日期: 2018-12-06

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点实验室“新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室”(XJD1414-2018-01); 国家自然科学基金项目(31560440)

作者简介: 马龙(1995-), 男, 硕士, 研究方向: 应用微生物

通讯作者: 张瑞(1974-), 女, 副教授, 研究方向: 食品科学

异, 乳制品有着浓厚的地区特色和风味。不同地区的牧民甚至同一地区不同家庭的牧民在制作发酵乳制品时, 制作工艺会有不同且其风味也会显著不同。经过几千年的驯化, 这些传统乳制品中保留了许多具有传代性好, 抗逆性强, 风味浓郁独特的微生物菌群<sup>[4]</sup>, 为发酵乳制品微生物多样性的研究开发提供了宝贵的资源。开菲尔中风味物质的来源主要有3种途径: 原料乳中的成分、加工过程中产生的风味物质及开菲尔中微生物代谢产生的风味物质<sup>[5-7]</sup>。因此, 研究风味物质的特征、来源、成分以及其形成途径和检测手段等

都需要了解开菲尔中微生物的组成和其在发酵过程中存在的动态群落结构动态变化。

目前采用传统可培养方法从开菲尔中已分离鉴定出的微生物主要有酵母菌、乳酸菌和醋酸菌等<sup>[8-17]</sup>。由于涉及到的微生物种类繁多,而且发酵过程中菌种间变化较为复杂,因此运用传统可培养方法很难了解到参与开菲尔发酵过程的微生物组成及变化规律。本论文通过高通量测序技术,系统全面地研究开菲尔自然发酵过程中的微生物群落组成及其动态变化规律,在明确发酵过程中丰度占比较大菌的同时,分析发现构成开菲尔粒微生物群落的动态变化规律,不仅能全面地揭示参与开菲尔发酵过程中的微生物群落及其动态变化规律,为研究微生物对开菲尔风味形成的影响提供理论依据,而且为后续丰度占比较大功能菌的分离筛选以及人工接种风味菌以提高开菲尔质量奠定了一定的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

MinElute® PCR Purification Kit、Phusion HF MM 等测序用试剂, QIAGEN 公司; 微型离心机, TIANGEN179; 卧式冷藏冷冻转换柜, 海尔 BC/BD-629HK; 4 °C 冰箱, 海尔; HYC-360 振荡器, SI G560E; 96well PCR 仪, AB9902; 24 孔离心机, EPPENDORF 5424EQ766751;

实验材料: 取自新疆阿勒泰地区牧民家中传统手工制作的开菲尔乳酪, 冰盒冷冻保藏运至实验室 -80 °C 冰箱保存备用。

### 1.2 样品前期处理

#### 1.2.1 开菲尔活化与开菲尔粒的制备

开菲尔乳酪→碾碎→过40目筛→温水30 °C泡洗3次→按质量比1:5加入30 °C水打浆→均质→按1:10比例接种在25 °C已消毒牛乳中→25 °C培养24 h→过滤获得开菲尔粒→重复上述活化培养次数3~5次→过滤获得发酵用开菲尔粒

#### 1.2.2 发酵开菲尔样品

将活化完成的开菲尔粒加入到三个装有已消毒牛乳的发酵瓶中25 °C发酵, 取刚接种开菲尔粒的牛乳为发酵0 h样品, 依次取发酵24 h、48 h、72 h、96 h、120 h等各时间点发酵样品-80 °C冷冻备用, 每一个时间点取三个平行样详细标记, 进行后续实验。

#### 1.2.3 总DNA的提取与扩增

使用微生物DNA强力提取试剂盒(MO BIO Laboratories)从样品中提取微生物总DNA, 通过260

nm/280 nm和260 nm/230 nm的比率评估DNA质量和数量。然后将DNA储存在-80 °C至进一步处理。细菌16S rDNA (V3+V4) 区域引物: 上游引物为带有GC夹子的338F, 下游引物是806R。338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 真菌ITS1区域引物: (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 引物进行PCR扩增。PCR条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s; 50 °C 30 s; 72 °C 30 s; 细菌共30个循环, 真菌共35个循环; 72 °C 7 min, 采用凝胶回收试剂盒回收PCR产物, 用Tris-HCl洗脱, PCR产物通过Quant-iT™ dsDNA HS试剂定量, 将所有PCR产物并合并在一起。

使用Illumina HiSeq 2500平台(2×250对末端)对纯化的合并样品进行细菌16S rRNA, 真菌ITS1基因高通量测序分析。对原始数据进行拼接(FLASH, version 1.2.11), 将拼接得到的序列进行质量过滤(Trimmomatic, version 0.33), 并去除嵌合体(UCHIME, version 8.1), 得到高质量的Tags序列。

#### 1.2.4 生物信息学分析

测定结果采用Uparse软件对有效数据在97%水平上进行操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)聚类。在QIIME中调用BLAST的方法与序列数据库Greengene进行比对, 获得每个OUT代表序列的分类学信息。计算Chao1指数、Shannon指数和Simpson指数对样品菌群的多样性进行评价。对各样品菌群之间进行基于UniFrac距离的加权(Weighted)和非加权(Unweighted)的主坐标分析(PCoA), Alpha指数分析采用北京百迈克生物技术公司提供云平台进行分析。数据库选择细菌16S:Silva, 真菌ITS:Unite。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同发酵时期细菌群落结构动态演变

分析细菌群落结构, 对不同发酵时期的18个样品测序共获得1,355,356对Reads, 过滤后共产生1,136,326条Clean tags, 每个样品至少产生19,889条Clean tags, 平均产生63,129条Clean tags。统计得到所有样品在不同OTU中的丰度信息。

由表1可知, Coverage测序深度指数均大于99.99%, 表明测序深度已覆盖到测试样品中的大部分物种, 可以真实展示发酵样品中的绝大多数细菌。Chao1指数在生态学中常用来估计物种总数。Simpson指数是用来估算样本中微生物多样性的指数之一, 在

生态学中常用定量描述一个区域的生物多样性，Simpson 指数越小说明群落多样性越高。分析不同发酵时期的 18 个样本，在发酵 0 h，开菲尔发酵样品的 Chao1 指数较大，三个 0 h 样品的 Chao1 平均数为 133.95。在发酵 24 h 降低至 98.29，说明在此发酵阶段细菌的物种总数不断减少。样品中细菌的 Chao1 指数逐步上升，72 h 达到最大值 127.12，在随后的 96~120 h 的发酵样本中有起伏，96 h 样本的细菌的 Chao1 指

数降低至 77.4，120 h 时达到 105.58。在整个发酵时期，细菌样本的 Simpson 指数波动较大，变化趋势比 Chao1 指数明显但是变化趋势相同。24 h 样品的 Simpson 指数从发酵 0 h 的 0.48 降低到 0.28，表明发酵开始时样本细菌群落组成较为简单。72 h 样本的 Simpson 指数达最小值 0.28，说明发酵 72 h 样本中细菌群落组成最为复杂。表中所列 ACE 指数、香农指数也反映了上述细菌群落结构的变化趋势。

表 1 发酵样品细菌多样性指数

Table 1 Bacterial diversity index of fermentation samples

样品序号	序列有效长度	Ace 指数	Chao1 指数	辛普森指数	香农指数	覆盖率/%
AX0001	68978	161.43	163.80	0.59	0.97	99.96
AX0002	66710	87.89	77.67	0.40	1.13	99.97
AX0003	69038	154.29	160.40	0.47	1.11	99.96
AX0241	69083	114.29	107.24	0.28	1.40	99.96
AX0242	69874	111.54	105.00	0.28	1.40	99.97
AX0243	69773	92.34	82.64	0.28	1.37	99.97
AX0481	68251	155.07	80.00	0.68	0.67	99.96
AX0482	68061	156.21	77.00	0.69	0.67	99.96
AX0483	54925	124.44	140.00	0.71	0.62	99.93
AX0721	64254	148.93	141.96	0.28	1.46	99.93
AX0722	19889	222.90	116.13	0.29	1.38	99.82
AX0723	68293	126.95	123.29	0.27	1.52	99.96
AX0961	51458	80.28	55.00	0.47	1.05	99.97
AX0962	66112	95.11	79.20	0.49	1.03	99.97
AX0963	63982	121.72	98.00	0.50	1.02	99.96
AX1201	67268	106.66	107.63	0.41	1.15	99.96
AX1202	65295	154.22	84.14	0.46	1.08	99.96
AX1203	65082	154.67	125.00	0.46	1.14	99.96

注：AX000x 为发酵 0 h 细菌样品、AX024x 为发酵 24 h 细菌样品、AX048x 为发酵 48 h 细菌样品、AX072x 为发酵 72 h 细菌样品、AX096x 为发酵 96 h 细菌样品、AX0120x 为发酵 120 h 细菌样品。

### 2.1.1 不同发酵时期细菌 Beta 多样性分析

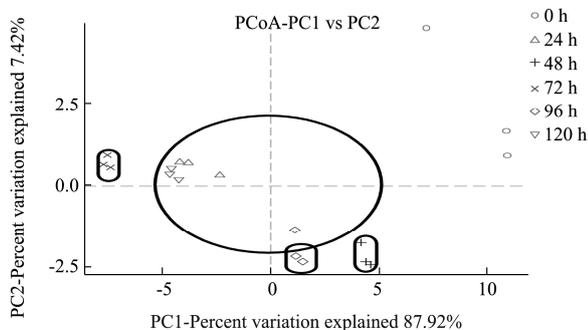


图 1 发酵样品间细菌 PCoA 分析图

Fig.1 Analysis chart of bacteria PCoA between fermentation samples

PCoA (Principal Co-ordinates Analysis) 分析即主

坐标分析，可呈现研究数据相似性或差异性的可视化坐标，是一种非约束性的数据降维分析方法，可用于研究样本群落组成的相似性或相异性。

基于非加权主坐标分析，其第一主成分和第二主成分的贡献率分别为 87.92%和 7.42%。0 h 时三组平行样品的细菌群落结构是有较大差异的，表现为 PCoA 图中第一象限 0 h 时样品点比较分散。随着发酵的不断进行 24 h 的样品呈现出一定的聚类趋势，在 PCoA 图中出现在第二象限，说明 24 h 样品的细菌群落结构呈现出一定的相似性。而 48 h 的样品在 PCoA 图中的第四象限呈现出一定的聚类趋势，说明 48 h 样品相对于 0 h 和 24 h 样品来讲具有自己特殊的细菌群落结构。72 h、96 h、120 h 样品也呈现出一定的聚类趋势，说明不同发酵时间段，样品间各自时间段微生

物群落结构具有相似性。但是 24 h、72 h、120 h 样品均处于 PCoA 图中第二象限与 PCoA 图中第四象限中 48 h 和 96 h 样品之间存在差异性。结果表明开菲尔在发酵过程中,不同发酵时间阶段开菲尔细菌群落结构存在动态变化。

### 2.1.2 不同发酵时期细菌群落结构分析

对各样品中的 OTU 依次进行门、纲、目、科、属的分类信息分析,一共获得 16 个门的细菌,剔除占比小于 0.01%的门共获得 12 个门(详见表 2)。

表 2 发酵样品细菌门水平物种变化表 (%)

Table 2 Changes in bacterial gate level species of fermented samples (%)

Phylum 门水平	AX000x 0 h 平均	AX024x 24 h 平均	AX048x 48 h 平均	AX072x 72 h 平均	AX096x 96 h 平均	AX120x 120 h 平均
Firmicutes	94.75	99.14	99.88	99.19	99.89	99.73
Proteobacteria	4.64	0.63	0.06	0.41	0.07	0.11
Cyanobacteria	0.27	0.08	0.01	0.10	0.01	0.11
Bacteroidetes	0.19	0.06	0.03	0.12	0.03	0.02
Actinobacteria	0.09	0.05	0.01	0.15	0.01	0.02
Fusobacteria	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Chloroflexi	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Verrucomicrobia	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Gemmatimonadetes	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Saccharibacteria	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fibrobacteres	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Chlamydiae	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00

注: AX000x 表示细菌发酵样品 0 h 三个样品数据平均值, AX024x 表示细菌发酵 24 h 三个样品数据平均值, AX048x 表示细菌发酵 48 h 样品数据平均值, AX072x 表示细菌发酵 72 h 样品数据平均值, AX096x 表示细菌发酵 96 h 样品数据平均值, AX120x 表示细菌发酵 120 h 样品数据平均值。表 3、5、6 同。

表 3 发酵样品细菌属水平物种变化表 (%)

Table 3 Bacterial species levels in fermented samples (%)

Genus 属水平	AX000x 0 h 平均	AX024x 24 h 平均	AX048x 48 h 平均	AX072x 72 h 平均	AX096x 96 h 平均	AX120x 120 h 平均
<i>Lactobacillus</i>	0.15	21.87	82.48	37.77	66.62	61.62
<i>Streptococcus</i>	64.03	63.95	15.44	51.60	28.54	31.87
<i>Bacillus</i>	30.10	13.13	1.43	6.69	3.15	3.39
<i>Lactococcus</i>	0.00	0.00	0.43	2.18	0.63	1.50
<i>Haemophilus</i>	2.78	0.24	0.02	0.11	0.02	0.03
<i>Staphylococcus</i>	0.10	0.01	0.01	0.57	0.86	1.24
<i>Neisseria</i>	0.99	0.01	0.00	0.02	0.01	0.00
<i>Gemella</i>	0.15	0.11	0.06	0.25	0.06	0.06
<i>Others</i>	1.35	0.59	0.10	0.68	0.10	0.19
<i>Unclassified</i>	0.35	0.09	0.02	0.13	0.02	0.09

在开菲尔的整个发酵时期厚壁菌门(Firmicutes)是丰度占比最大菌群,占到各时期细菌菌群的 94.75%、99.14%、99.88%、99.19%、99.89%、99.73%。在发酵过程中没有太大的变化,是一个稳定菌群。丰度占比第二菌群为变形菌门(Proteobacteria),在发酵的初期,0 h 占比较大(4.64%)、在随后的发酵过程中急剧减少,在 24 h 之后丰度占比为 0.63%,48 h 丰

度占比为 0.06%,72 h 丰度占比为 0.43%,96 h 丰度占比为 0.07%,在 120 h 有所增加达到 0.11%。

开菲尔发酵过程中在属水平上共检出 117 个细菌菌属,主要有乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和奈瑟氏菌属(*Neisseria*)等。由表 3 可见,乳杆菌属

(*Lactobacillus*)在整个发酵阶段一直是丰度占比较大较稳定菌属。发酵样品中丰度占比较大的另一个细菌属为链球菌属 (*Streptococcus*)，在发酵初期起到关键作用，在发酵中期随着乳杆菌属的增加而逐渐减少，在发酵后期占样本的比例基本不变。芽胞杆菌属在发酵前期存在较多，但是随着发酵进行，不断减少，在发酵后期占样本的比例基本不变。乳球菌属在发酵初期基本不存在，但是从发酵中期 48 h 开始出现到 72 h 达到最大，一直存在于发酵后期，其所占丰度不大。在 0 h 的样本中检测到少量的葡萄球菌属，随着发酵

的进行，葡萄球菌属所含比例又逐步增大，其所占丰度低于乳球菌属。其他菌属在发酵进行中所占丰度逐渐减少，丰度占比低于 1%。

## 2.2 不同发酵时期真菌群落结构动态演变

分析真菌群落结构，对不同发酵时期的 18 个样品测序共获得 1,440,062 对 Reads，双端 Reads 拼接、过滤后共产生 1,259,185 条 Clean tags，每个样品至少产生 48,385 条 Clean tags，平均产生 69,955 条 Clean tags。

表 4 发酵样品真菌多样性指数

Table 4 Fungi diversity index of fermentation samples

样品编号	序列有效长度	ACE 指数	Chao1 指数	辛普森指数	香农指数	覆盖率/%
AJ0001	49015	662.19	689.33	0.07	4.46	99.97
AJ0002	50483	560.17	562.88	0.04	4.62	99.98
AJ0003	48385	561.48	572.09	0.07	4.28	99.96
AJ0241	73578	58.82	54.46	0.99	0.06	99.99
AJ0242	74121	106.39	104.00	0.99	0.06	99.96
AJ0243	73609	83.76	81.75	0.87	0.37	99.98
AJ0481	73928	66.26	55.20	0.99	0.03	99.98
AJ0482	73660	49.83	44.80	0.99	0.04	99.98
AJ0483	74212	119.53	127.30	0.96	0.18	99.98
AJ0721	74504	57.04	50.88	0.99	0.04	99.98
AJ0722	74058	68.99	68.00	0.99	0.05	99.98
AJ0723	73944	71.82	73.33	0.99	0.05	99.98
AJ0961	74239	93.62	55.91	0.99	0.03	99.98
AJ0962	74206	62.94	68.43	0.99	0.04	99.97
AJ0963	74343	56.06	52.23	0.99	0.04	99.99
AJ1201	74143	77.85	81.00	0.99	0.05	99.97
AJ1202	74144	73.56	74.60	0.97	0.10	99.98
AJ1203	74613	66.41	62.00	0.98	0.07	99.98

注：AJ000x 为发酵 0 h 真菌样品、AJ024x 为发酵 24 h 真菌样品、AJ048x 为发酵 48 h 真菌样品、AJ072x 为发酵 72 h 真菌样品、AJ096x 为发酵 96 h 真菌样品、AJ120x 为发酵 120 h 真菌样品。

由表 4 可知，在发酵 0 h，开菲尔发酵样品的 Chao1 指数较大，三个 0 h 样品的 Chao1 指数平均值为 608.09。说明发酵初期真菌物种总数较大。在发酵 24 h 三个样品 Chao1 指数平均值降低至 80.07，说明发酵开始阶段真菌的物种总数急剧减少。进入发酵阶段后，样品中真菌的 Chao1 指数逐步下降，96 h 三个样品平均值达到最小值 58.85，在发酵过程中真菌样本的 Simpson 指数急剧下降并保持稳定。在 0 h，Simpson 指数平均值最小为 0.05，与 Chao1 指数相对应，在随后的发酵阶段基本无变化，24 h 时 Simpson 指数为 0.94、120 h 时 Simpson 指数为 0.98。总体来讲，样本细菌的 Simpson 指数远小于真菌的 Simpson 指数，说

明在开菲尔自然发酵过程中细菌物种丰富度远高于真菌。

### 2.2.1 不同发酵时期真菌 Beta 多样性分析

基于非加权主坐标分析，真菌群落结构分析如图所示，第一主成分和第二主成分的贡献率分别为 94.69% 和 2.22%。0 h 时三组平行样品的真菌群落结构在 PCoA 图中比较分散，出现在第一和第四象限中，随着发酵的不断进行 24 h 及以后的时间段的样品呈现出较为集中的聚类趋势，24 h 及以后时间段的样品之间真菌群落结构高度集中在一个点上，说明 24~120 h 样品之间存在相似性。推测在整个的发酵过程中真菌的作用主要为其他发酵细菌提供支撑骨架，整个真菌

菌落结构变化不大, 初步推断真菌菌落与细菌菌落之间存在互生关系, 开菲尔粒结构的稳定性原因有可能是真菌的作用。

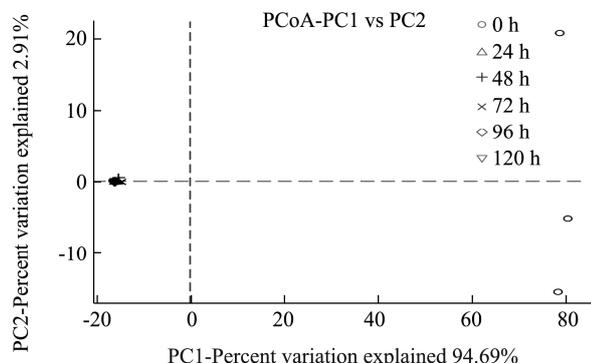


图2 发酵样品间真菌 PCoA 分析图

Fig 2 Analysis chart of fungi PCoA between fermented samples

### 2.2.2 不同发酵时期真菌群落结构分析

开菲尔发酵时期真菌菌门子囊菌门

(Ascomycota), 占到各时期真菌种群的 69.38%、99.14%、99.78%、99.90%、99.95%、99.91%, 是发酵过程中丰度占比最大的门。未分类(Unclassified)的菌门占比 14.03%、担子菌门(Basidiomycota)和球囊菌门(Glomeromycota)的真菌存在于发酵初期, 在发酵后期急剧减少几乎为零。

开菲尔发酵过程中在属水平上共检出 10 个真菌菌属, 主要有链格孢属(*Alternaria*)、孢霉属(*Mortierella*)、枝孢霉属(*Cladosporium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、霉菌属(*Mycosphaerella*)、念珠菌属(*Candida*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)和一些无法归类的真菌。由表 6 所示, 在发酵的前期有链格孢属(20.77%)、孢霉属(6.86%)、枝孢霉属(2.69%)、曲霉属(1.71%), 但是在发酵过程中真菌菌属占比逐渐减少, 同时检测中发现样品中含有大量未分类的真菌。

表 5 发酵样品真菌门水平物种变化表 (%)

Table 5 Fungi gate level species change table for fermentation samples (%)

Phylum 门水平	AJ000x 0 h 平均	AJ024x 24 h 平均	AJ048x 48 h 平均	AJ072x 72 h 平均	AJ096x 96 h 平均	AJ120x 120 h 平均
Ascomycota	69.38	99.14	99.78	99.90	99.95	99.91
Unclassified	14.03	0.81	0.12	0.06	0.03	0.05
Mortierellomycota	6.91	0.02	0.06	0.02	0.00	0.01
Basidiomycota	6.55	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01
Glomeromycota	0.74	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
Others	1.45	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
Unknown	0.94	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01

表 6 发酵样品真菌属水平物种变化表 (%)

Table 6 Species change table of fungi in fermented samples (%)

Genus 属水平	AJ000x 0 h 平均	AJ024x 24 h 平均	AJ048x 48 h 平均	AJ072x 72 h 平均	AJ096x 96 h 平均	AJ120x 120 h 平均
<i>Unclassified</i>	44.15	99.73	99.54	99.83	99.87	99.47
<i>Alternaria</i>	20.77	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>Mortierella</i>	6.86	0.02	0.06	0.02	0.00	0.01
<i>Cladosporium</i>	2.69	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01
<i>Aspergillus</i>	1.71	0.01	0.18	0.03	0.02	0.02
<i>Plectosphaerella</i>	1.70	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
<i>Mycosphaerella</i>	1.37	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
<i>Candida</i>	0.86	0.07	0.03	0.02	0.04	0.35
<i>Fusarium</i>	0.98	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
<i>Chaetomium</i>	0.91	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01
<i>Guehomyces</i>	0.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Others	16.13	0.12	0.10	0.08	0.04	0.10
Unknown	0.94	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01

真菌多样性结果分析显示,在不同发酵时期有多种霉菌的存在,未见酵母菌,与其他研究表明的开菲尔主要常见丰度占比较大菌为乳酸菌、酵母菌和醋酸菌有所不同<sup>[7,8,9,16]</sup>,分析可能的原因有:本论文开菲尔发酵乳制品采集自阿勒泰地区牧民家庭手工制作“酸乳疙瘩”,其制作基本为牧民手工原始加工,几乎都是使用皮囊盛装牛乳或马乳,皮囊中蕴含着丰富的微生物种群,制作中往往会根据经验或口味添加一定的食盐,不同地区的牧民甚至同一地区不同家庭的牧民在制作发酵乳制品时,使用的食盐浓度、发酵时间等控制因素会有不同且其风味也会显著不同。从而使传统的乳制品制作方法有着明显的地域性,在发酵过程中会形成具有浓郁地方特色的开菲尔粒与开菲尔制品。加工技术简陋、储藏环境主要暴露在空气中从而使新疆传统开菲尔制品加工质量不均一,易受杂菌污染,而发酵乳酪中的杂菌大多为耐渗性好的真菌。为了对开菲尔制品品质进行标准化处理,本论文中在研究开菲尔粒微生物时,对采集的原料“酸乳疙瘩”进行了活化及开菲尔粒的再制备工艺研究,从而使再制备的开菲尔粒微生物菌落结构发生了变化,可能导致了酵母菌数量急剧减少,多次制备后使得酵母菌未能检测出来。

### 3 结论

3.1 本文采用高通量测序技术对实验室制备的开菲尔样品进行了微生物多样性分析研究,从开菲尔发酵过程中共鉴定了16个门的细菌4个门的真菌,通过其发酵过程丰度占比确定丰度占比较大微生物菌门后,进一步对其菌属进行了多样性分析研究,共鉴定得到117个细菌菌属和10个真菌菌属。对比Chao1和Shannon指数以及样品间Beta多样性分析发现,从发酵时间角度,在发酵0h开菲尔样品中真菌的多样性最高,而细菌的多样性是在发酵72h时最高,96h真菌和细菌的多样性最小,结合感官评价可以判断开菲尔发酵过程可以分为发酵初期(0~24h)、发酵中期(48h)、发酵后期(72h)、发酵末期(96~120h)等控制阶段。发酵时间120h时随着细菌多样性的提高,发酵样品品质及风味有变劣趋势,因此120h应该是发酵过程控制的极限时间节点。

3.2 从整个发酵过程中微生物的种群结构与丰度的变化情况来看,乳杆菌属(*Lactobacillus*)在整个发酵阶段一直是最主要的丰度占比较大细菌(其在发酵48h时占82.48%)。开菲尔中的丰度占比较大细菌菌属还有链球菌属(*Streptococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等,作为丰度占比较大菌属在传统开菲尔自然发酵的

过程中此消彼长、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)在0h的样本中丰度占比较少,随着发酵的进行,葡萄球菌属所含比例又逐步增大,虽然到发酵中后期其所占丰度低于乳球菌属,但是其为产醇类、酯类物质的重要菌属,对发酵产物中的风味物质形成有一定的影响<sup>[7]</sup>。奈瑟氏菌属(*Neisseria*)和其他菌属在发酵进行中所占丰度逐渐减少,到发酵中后期丰度占比低于0.1%。可鉴定的真菌菌属在发酵的前期主要有链格孢属(20.77%)、孢霉属(6.86%)、枝孢霉属(2.69%)、曲霉属(1.71%),但是在发酵过程中真菌菌属占比逐渐减少,到发酵中后期丰度占比低于0.1%,然而整个发酵过程中,开菲尔中检测出大量未分类的真菌,所占丰度从发酵前期(44.15%)到发酵中后期达到99%以上,发酵样品间真菌PCoA分析图中表明随着发酵的不断进行24h及以后的时间段的样品呈现出较为集中的聚类趋势,24h及以后时间段的样品之间真菌群落结构高度集中在一个点上,说明24~120h样品之间存在较高的相似性。这一结果为开菲尔粒微生物互生关系的进一步研究提供了良好的理论支持。这部分真菌种类的研究可能与开菲尔粒结构及其稳定性有关,同时也为开菲尔粒的研究指出了可能的研究方向。

3.3 李伟程等<sup>[17]</sup>采用高通量454焦磷酸测序技术,对从新疆奇勒乌泽克乡同一牧区采集的三份传统发酵酸牛奶、酸马奶和酸驼奶样品中的微生物多样性进行分析。结果发现,酸牛奶、酸马奶和酸驼奶样品中的丰度占比较大细菌属分别为乳球菌属(*Lactococcus*)和乳酸杆菌属(*Lactobacillus*),丰度占比较大真菌属为耐碱酵母属(*Galactomyces*)。同为新疆地区的发酵乳制品,本论文中开菲尔粒微生物与李伟程等的研究在细菌属水平上有相同的菌属,但是在真菌属水平上存在差异。可以推测地理区域临近的样品微生物群落结构有趋同进化的趋势。Ercolini等<sup>[18]</sup>采用PCR-DGGE技术描述斯提尔顿发酵乳(Stilton Cheese,世界三大蓝纹发酵乳之一)中微生物群体的结构和多样性。结果显示,其中的丰度占比较大菌群有乳酸乳球菌乳亚种(*Lactococcus lactis*),粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*),植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),肠系膜膜串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*),马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*),与本研究发酵过程中,微生物多样性存在差异与不同。本研究中,样品发酵过程中细菌丰度高于真菌丰度,从香农指数和辛普森指数可看出,真菌的多样性也低于细菌,与KoiChi等<sup>[19]</sup>对一种蒙古国传统发酵乳制品Tarag中微生物的多样性研究结果一致。本研究在18份开菲尔发酵乳制品样品中,硬壁菌门、变形菌门的相对丰度最多,其

中硬壁菌门为丰度占比最大菌门这一结果与 Dobson 等<sup>[20]</sup>对开菲尔粒及可可豆中的细菌多样性进行研究的结果相似。

### 参考文献

- [1] 刘慧,李平兰,张永春,等.开菲尔的生理功能、特性及其产品开发研究进展[J].食品科学,2005,5:252-255  
LIU Hui, LI Ping-lan, ZHANG Yong-chun, et al. Progress in research on physiological function, characteristics and product development of Kefir [J]. Food Science, 2005, 5: 252-255
- [2] Gao J, Gu F, He J, et al. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains [J]. European Food Research & Technology, 2013, 236(3): 549-556
- [3] He G, Liu T, Sadiq F A, et al. Insights into the microbial diversity and community dynamics of Chinese traditional fermented foods from using high throughput sequencing approaches [J]. Journal of Zhejiang University Science, 2017, 18(4): 289
- [4] 彭斌,王志琴,张晓红,等.新疆传统奶疙瘩中乳酸菌的分离及筛选[J].草食家畜,2010,2:21-23.  
PENG Bin, WANG Zhi-qin, ZHANG Xiao-hong, et al. Separation and screening of lactic acid bacteria from traditional milk thistle in Xinjiang [J]. Grass-Feeding Livestock, 2010, 2: 21-23
- [5] 缪璐欢,白凤翎,励建荣.传统发酵食品中乳酸菌生态演替研究进展[J].食品与发酵工业,2015,41(1):175-180.  
ZHAI Huan, BAI Feng-qi, LI Jian-rong. Research progress on ecological succession of lactic acid bacteria in traditional fermented foods [J]. Food and Fermentation Industry, 2015, 41(1): 175-180
- [6] 陈妍,陆利霞,熊晓辉.微生物发酵法生产食品风味物质[J].中国调味品,2011,36(7):13-17  
CHEN Wei, LU Li-xia, XIONG Xiao-hui. Production of food flavor substances by microbial fermentation [J]. Chinese Condiment, 2011, 36(7): 13-17
- [7] 张栋,冯丽莉,郝宏伟,等.新疆阿勒泰地区传统酸乳中乳酸菌的分离鉴定及菌相分析[J].食品科技,2017,3:22-25  
ZHANG Dong, FENG Li-li, HAO Hong-wei, et al. Isolation, identification and bacterial analysis of lactic acid bacteria in traditional yogurt in altay region, Xinjiang [J]. Food Science and Technology, 2017, 3: 22-25
- [8] 刘俊峰,尹雪,郭雪峰.新疆阿勒泰地区酸奶疙瘩中乳酸菌的分离和鉴定[J].中国酿造,2017,9:116-119  
LIU Jun-feng, YIN Xue, GUO Xue-feng. Isolation and identification of lactic acid bacteria from yogurt in altay region, Xinjiang [J]. China Brew, 2017, 9: 116-119
- [9] 王豪,徐致远,章慧.传统地域性发酵乳-开菲尔的研究进展[J].食品与发酵工业,2015,41(10):204-214  
WANG Hao, XU Zhi-yuan, ZHANG Hui. Research progress of traditional regional fermented milk-Kefir [J]. Food and Fermentation Industry, 2015, 41(10): 204-214
- [10] Marsh A J, Orla O'Sullivan, Hill C, et al. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources [J] Plos One, 2013, 8(7): e69371
- [11] Bourrie B C T, Willing B P, Cotter P D. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage Kefir [J] Frontiers in Microbiology, 2016, 7(15): 647-663
- [12] 高洁,俞丹,陈頔,等.传统发酵乳开菲尔的研究进展[J].中国食品学报,2016,16(4):204-211  
GAO Jie, YU Dan, CHEN Wei, et al. Research progress of traditional fermented milk Kefir [J]. Chinese Journal of Food Science, 2016, 16(4): 204-211
- [13] 钟浩.开菲尔(Kefir)粒中菌种的分离鉴定及优良菌株的复合发酵乳研究[D].南京:江苏大学,2016  
ZHONG Hao. Isolation and identification of strains in Kefir granules and composite fermented milk of excellent strains [D]. Nanjing: Jiangsu University, 2016
- [14] Zdemir N, Kkta T, Guzelseydim Z. Effect of *Gluconacetobacter* spp. on kefir grains and kefir quality [J]. Food Science & Biotechnology, 2015, 24(1): 99-106
- [15] Simova E, Beshkova D, Angelov A, et al. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002, 28(1): 1-6
- [16] Leite A M O, Mayo B, Rachid C T C C, et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian Kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis [J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 0-0.
- [17] 李伟程,侯强川,于洁,等.传统发酵乳制品中微生物多样性研究[J].食品工业科技,2018,39(1):131-136  
LI Wei-cheng, HOU Qiang-chuan, YU Jie, et al. Microbial diversity in traditional fermented dairy products [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(1): 131-136
- [18] Ercolini D, Hill P J, Dodd C E R. Bacterial community structure and location in stilton cheese [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3540-3548

(下转第 26 页)