

# 不同冷藏时间牦牛乳中细菌群落结构和理化性质比较

宋雪梅<sup>1,2</sup>, 马安娜<sup>1</sup>, 刘炫妍<sup>1</sup>, 张炎<sup>1,2</sup>, 邱婷<sup>1,2</sup>, 张卫兵<sup>1,2\*</sup>

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070) (2. 甘肃省功能乳品工程实验室, 甘肃兰州 730070)

**摘要:** 低温贮藏有利于确保原料乳质量, 然而也面临原料乳中嗜冷菌增多的风险, 因此, 了解不同冷藏时间原料乳中细菌群落结构变化对乳品工业持续发展具有重要意义。为此, 该试验利用高通量测序技术和乳成分分析仪, 分析和比较了 4 °C 下贮藏 24、72 h 牦牛乳的细菌群落特征和理化特性。结果表明: 冷藏 24、72 h 牦牛乳中第一、二优势菌属为乳球菌属、金黄杆菌属, 该两类菌属的细菌分别占到冷藏 24、72 h 牦牛乳中细菌相对丰度的 59.48% 和 67.51%。冷藏 72 h 牦牛乳中乳球菌属、金黄杆菌属相对丰度比冷藏 24 h 牦牛乳高出 22.74%、3.56%, 但是冷藏 72 h 牦牛乳中链球菌、不动杆菌属呈现降低趋势。冷藏 24、72 h 牦牛乳中假单胞菌属相对丰度较低, 分别为 1.69% 和 1.78%。冷藏 72 h 牦牛乳中酪蛋白、脂肪含量低于冷藏 24 h 牦牛乳, 酸度增加到 14.66 °T。72 h 的低温冷藏有助于控制牦牛乳细菌繁殖, 维持乳品质。该研究为牦牛乳贮藏, 干酪等乳制品加工, 确保其品质和质量安全提供了理论依据。

**关键词:** 牦牛乳; 冷藏; 细菌群落; 理化性质

文章编号: 1673-9078(2022)07-126-132

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.1327

## Comparison of Bacterial Communities and Physicochemical Properties in Yak Milk with Different Cold Storage Durations

SONG Xuemei<sup>1,2</sup>, MA Anna<sup>1</sup>, LIU Xuanyan<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1,2</sup>, QIU Ting<sup>1,2</sup>, ZHANG Weibing<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

(2.Functional Dairy Product Engineering Laboratory of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** Refrigerated storage helps to ensure the quality of raw milk; however, it can also increase the risk of psychrophilic bacteria propagation. Therefore, investigation of bacterial communities of raw milk under different refrigeration durations is crucial to the sustainable development of the dairy industry. This study compared the characteristics of bacterial communities and physicochemical properties of yak milk stored at 4 °C for 24 h and 72 h through high-throughput sequencing and by using a milk composition analyzer. The results revealed that the two dominant bacteria in yak milk for both refrigeration durations were *Lactococcus* and *Chryseobacterium*, which together accounted for 59.5% and 67.51% of the relative abundance of bacteria in yak milk refrigerated for 24 h and 72 h, respectively. The relative abundances of *Lactococcus* and *Chryseobacterium* in yak milk were 22.74% and 3.56% higher, respectively, after 72 h of refrigeration than those in yak milk after 24 h of refrigeration. However, after 72 h of refrigeration, *Streptococcus* and *Acinetobacter* in yak milk showed a decreasing trend. The relative abundance of *Pseudomonas* in yak milk refrigerated for 24 h and 72 h was 1.69% and 1.78%, respectively. Casein and fat levels of yak milk refrigerated for 72 h were lower than those of yak milk refrigerated for 24 hours, and acidity increased to 14.66 °T. Refrigeration for 72 h is helpful in controlling the reproduction of bacteria in yak milk to maintain milk quality. This study provides a theoretical basis for the storage of yak milk and processing of dairy products, such as cheese, to ensure quality and safety.

引文格式:

宋雪梅,马安娜,刘炫妍,等.不同冷藏时间牦牛乳中细菌群落结构和理化性质比较[J].现代食品科技,2022,38(7):126-132,+62

SONG Xuemei, MA Anna, LIU Xuanyan, et al. Comparison of bacterial communities and physicochemical properties in yak milk with different cold storage durations [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 126-132, +62

收稿日期: 2021-11-25

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目 (31860449)

作者简介: 宋雪梅 (1980-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 乳品科学与技术, E-mail: songxm@gsau.edu.cn

通讯作者: 张卫兵 (1974-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: zhangwb@gsau.edu.cn

**Key words:** yak milk; refrigeration; bacterial community; physicochemical properties

原料乳富含蛋白质、脂肪, pH 接近中性, 同时也含有源自健康乳房、挤乳以及运输过程中外界环境所侵入的许多微生物, 生产加工前采用的贮藏条件如不恰当时, 原料乳微生物结构和营养成分将发生变化, 对干酪、酸奶、乳粉等生产、品质、质量安全产生影响<sup>[1]</sup>。牦牛乳年产量达 84.5 万 t, 近 6 年来, 产量复合增长率为 3.07%<sup>[2]</sup>。然而, 我国拥有的 1621 万头牦牛, 主要分布在以青藏高原为中心的青海、西藏、四川、甘肃、新疆和云南等高山、亚高山地带。牦牛日泌乳量为 3.3 kg<sup>[3]</sup>, 只有普通奶牛的 14%。牦牛产奶季节性强, 主要集中在温度较高的暖季<sup>[4]</sup>。因此, 牦牛分布以及产乳等特点易于导致牦牛乳面临较长时间的贮藏。

低温贮藏由于能够抑制嗜温微生物的生长繁殖而被广泛地运用于乳品工业。原料乳低温贮藏效果取决于冷藏条件。一般而言, 低温贮藏温度为 4~6 °C, 冷藏时间的长短与原料乳收集间隔、运送距离等相关。但是研究发现, 随着冷藏时间的延长, 原料乳中嗜冷菌如假单胞菌属、不动杆菌属等大量繁殖<sup>[5]</sup>, 产生了耐热性蛋白酶、脂肪酶等。乳品生产加工前使用的巴氏杀菌虽能杀灭原料乳中绝大多数微生物, 但残留的蛋白酶、脂肪酶依然具有活性, 能够分解乳蛋白质和脂肪, 导致乳产生酸味、苦味, 甚至乳发生腐败变质, 因此, 了解不同冷藏时间原料乳微生物组成变化对于乳品工业发展具有重要意义。

不同学者对冷藏过程中山羊乳、牛乳、绵羊乳等菌群特征以及相关性质进行了研究<sup>[6-8]</sup>。原料乳微生物结构组成不仅受环境差异影响, 还与宿主动物来源直接相关。牦牛生长于高寒、缺氧、枯草期和冰封期长达半年左右的环境中, 牦牛乳含有 3.7%~6.5% 乳蛋白, 高于荷斯坦牛乳、驼乳和山羊乳。脂肪含量为 5.3%~8.8%, 高出荷斯坦牛乳近 1 倍<sup>[9]</sup>, 钙含量达 154~180 mg/g, 营养价值高。马静等<sup>[10]</sup>研究了青海省不同海拔地区牦牛乳的微生物多样性, 但关于不同冷藏时间牦牛乳微生物群落比较的研究鲜有报道。因此, 鉴于原料乳群落的复杂性、重要性, 本研究对不同冷藏时间牦牛乳细菌群落特性和理化性质进行了比较, 为提高牦牛乳及其制品质量安全性提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 样品采集

2020 年 10 月, 选取甘南藏族自治州卓尼县木耳乡自然放牧状态的 10 头牦牛, 凌晨开始挤乳。在挤乳之前, 拴住牦牛的后腿, 清洗双手, 然后用双手快速、有力地上下挤压。最后, 将乳样混合后, 保存于冰袋箱中 (4~6 °C), 6 h 内运送到实验室。

#### 1.1.2 试剂

E.Z.N.A™ Mag-Bind Soil DNA Kit 试剂盒, 美国 OMEGA 公司; Qubit3.0 DNA 检测试剂盒, 美国 Life 公司。

### 1.2 试验仪器

BCD-539WF 电冰箱, 青岛海尔股份有限公司; FOSS MikeScan<sup>FT</sup> 120 乳成分分析仪, 丹麦福斯公司; DYY-6C 电泳仪电源、DYCZ-21 电泳槽, 北京市六一仪器厂; FR-1000 凝胶成像系统, 上海复日科技有限公司; ETC 811PCR 仪, 北京东胜创新生物科技有限公司; Q32866Qubit® 3.0 荧光计, 美国 Invitrogen 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 样品处理

新鲜牦牛乳无菌分装后, 4 °C 下贮藏 24、72 h, 编号为 S1、S2, 每个时间点取样 3 个, 编号为 S11、S12、S13、S21、S22、S23, 冷藏结束后, 提取细菌 DNA 以及测定乳的理化指标。

#### 1.3.2 DNA 提取、PCR 扩增和高通量测定

将一定原料乳样在 13000 r/min、4 °C 下离心 5 min, 除去上清液和脂肪后, 取适量沉淀。按照操作说明, 使用 DNA 试剂盒, 提取样品中 DNA。琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, Qubit 定量检测 DNA 样本浓度。扩增 16S rRNA 基因 V3-V4 高变异区。通用引物分别为 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')。所得 PCR 产物纯化回收后, 构建文库, 利用 Illumina Miseq 测序平台开展高通量测序及后续分析 (生工生物工程(上海)股份有限公司协助完成)。

#### 1.3.3 高通量测序数据处理

cutadapt 去除引物接头序列后, 根据 PE reads 之间的 overlap 关系, 将成对的 reads 拼接成一条序列, 再按照 barcode 标签序列识别并区分样品得到各样本数据, 最后使用 PRINSEQ 切除 reads 尾部质量值 20 以下的碱基, 最终过滤掉低复杂度序列, 得到各样本有效数据。

表1 样品序列基本特征

Table 1 Sample sequencing information

样本名称	标签序列	原始序列数	有效序列数	平均长度	最短序列长度	最长序列长度
S11	GAGATA	91537	90947	428.4	390	473
S12	CTTCAG	65562	65200	428.51	384	441
S13	TGCATC	89308	88725	428.65	375	473
S21	TTCCGG	73630	72546	428.38	369	472
S22	CCGTAA	81931	81476	428.56	372	475
S23	TCAGAG	71302	70782	428.4	370	474

### 1.3.4 OTU 聚类和物种注释

使用 Usearch 软件,按照 97%相似性对非重复序列(不含单序列)进行 OTU 聚类,聚类过程中去除嵌合体,得到 OTU 代表序列,然后使用 RDP classifier 比对 RDP 数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/misc/resources.jsp>),对每个 OTU 对应的物种分类注释,最终分别在门、纲、目、科、属等分类水平上统计样本群落组成。

### 1.3.5 牦牛乳理化指标测定

取 50 mL 原料乳样品于离心管中,预热至 40±1 °C,充分振荡后,测定其蛋白质、脂肪、总固性物、非脂乳固体、乳糖、酸度、酪蛋白等。

## 1.4 数据处理与分析

每个处理重复 3 次,平均值±标准偏差表示结果,利用 SPSS 19.0 软件对数据进行显著性分析,Mothur 软件计算和分析微生物多样性。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品细菌序列特征

提取样品 DNA,通过对 16S rRNA 基因扩增、测序后,产生了 473270 个序列数,经质量过滤后,最终序列数为 469676。样品细菌序列特征如表 1 所示,序列平均长度为 428.43,样品中最少有效序列数达 65200。

### 2.2 牦牛乳中微生物多样性分析

Alpha 多样性指数包含 Chao、Ace、Shannon、Simpson、Shannoneven,常被用来表示样品中微生物群落多样性和分布丰度,不同冷藏时间牦牛乳细菌多样性结果见表 2。

从表 2 可知,S1、S2 样品的 Chao 指数差异不明显。由于 Chao 指数评价样品的物种丰度,因此,说明 S1、S2 中物种总数接近。S2 样品的 Shannon 和 Shannoneven 指数略高于 S1,说明冷藏 72 h 牦牛乳中

细菌多样性呈现增加趋势。

表2 牦牛乳样品中细菌 Alpha 多样性

Table 2 Alpha diversity of bacteria in yak milk samples

样本名称	Chao	Ace	Shannon	Simpson	Shannoneven
S11	166.10	171.25	1.79	0.22	0.36
S12	173.12	175.53	1.86	0.20	0.37
S13	157.11	161.03	1.88	0.21	0.38
S21	171.11	167.28	1.86	0.21	0.37
S22	153.18	154.65	1.92	0.19	0.39
S23	171.27	172.93	1.92	0.19	0.39

## 2.3 牦牛乳门水平细菌群落组成分析

相对丰度 0.01%以上的门类 10 个。现对相对丰度 1%以上的细菌门类进行分析,其结果见图 1。

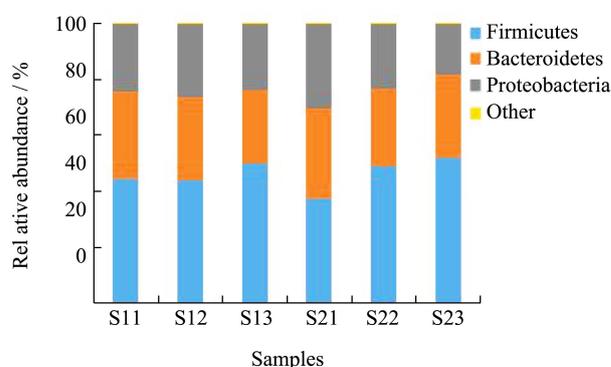


图1 4 °C下贮藏 24 h 和 72 h 牦牛乳样品中门水平细菌相对丰度分析

Fig.1 Relative abundance of bacteria at phylum levels in yak milk samples stored at 4 °C for 24 h and 72 h

从图 1 可知,冷藏 24、72 h 牦牛乳样品中优势菌为厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria),这 3 类微生物占到样品中细菌的 99%以上。其中,厚壁菌门为第一优势菌门,它在 S1、S2 样品中相对丰度分别为 46.23%、46.05%,S1、S2 样品中拟杆菌门相对丰度为 28.91%和 29.9%,为第二优势菌门。变形菌门是 S1、S2 样品中的第三优势菌门。

马静等<sup>[10]</sup>发现不同海拔牦牛乳中微生物主要属

于变形菌门和厚壁菌门。Liu 等<sup>[11]</sup>发现西藏地区自然发酵牦牛酸奶中99%微生物由厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和放线菌门组成。本试验注释的微生物门类与此相同。其它细菌门类还包含相对丰度在0.05%~0.1%的放线菌门(Actinobacteria)和Candidatus\_Saccharibacteria, 相对丰度0.01%~0.03%的酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、浮霉菌门(Planctomycetes)、互养菌门(Synergistetes)和热袍菌门(Thermotogae)。

## 2.4 牦牛乳中属水平细菌群落组成分析

不同冷藏时间牦牛乳中相对丰度0.01%以上细菌属类27个。相对丰度1%以上细菌属类7个,分别为乳球菌属(Lactococcus)、金黄杆菌属(Chryseobacterium)、栖水菌属(Enhydrobacter)、链球菌属(Streptococcus)、不动杆菌属(Acinetobacter)、假单胞菌属(Pseudomonas)和明串珠菌属(Leuconostoc)。

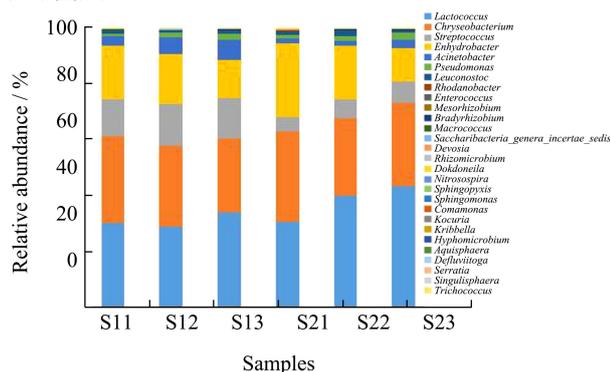


图2 4 °C下贮藏24 h和72 h牦牛乳样品中属水平细菌相对丰度分析

Fig.2 Relative abundance of bacteria at genus levels in yak milk samples stored at 4 °C for 24 h and 72 h

如图2显示,乳球菌属为冷藏牦牛乳中第一优势菌属,S1样品中乳球菌属相对丰度为30.75%,S2样品中乳球菌属相对丰度比S1增加了22.74%。金黄杆菌属是S1、S2样品中第二优势菌属,S1样品中金黄杆菌属相对丰度为28.73%,冷藏72 h后,上升到29.72%。乳球菌属和金黄杆菌属分别占到S1、S2样品中细菌的59.48%和67.51%。链球菌属是S1的第三优势菌属,而栖水菌属是S2的第三优势菌属。S1、S2样品中第四优势菌属为不动杆菌属。

S2样品中金黄杆菌属、栖水菌属相对丰度比S1增加了3.56%、12.19%。说明延长冷藏时间,牦牛乳中金黄杆菌属、栖水菌属呈现增长趋势。S1样品中链球菌属、不动杆菌属相对丰度分别比S2高出52.64%、59.41%,说明随着冷藏时间的延长,其链球菌、不动

杆菌属呈现较快减少趋势。S1和S2样品中假单胞菌属相对丰度较低,分别为1.69%和1.78%,呈现较小增加趋势。

马静等<sup>[10]</sup>发现不同海拔牦牛乳中栖水菌属、金黄杆菌属、乳杆菌属等相对丰度较高。乳球菌属、肠球菌属、乳杆菌属和明串珠菌属也是普通牛乳中的主要菌属<sup>[12]</sup>。本试验也注释到了其它原料乳中存在的乳球菌属、栖水菌属、金黄杆菌属等,但是不同原料乳中微生物优势菌属存在差异。郭小杰等<sup>[13]</sup>从冬春季原料乳中分离的嗜冷菌包含25.5%假单胞菌属、10.5%乳球菌属、9.8%不动杆菌属、8.8%金黄杆菌属以及6.7%葡萄球菌属。王媛媛等<sup>[14]</sup>发现在72 h冷藏过程中,原料乳中优势菌属为不动杆菌属,其相对丰度达50%以上。原料乳中微生物优势菌属受原料乳种类、地理环境、采样季节等因素影响。

原料乳中优势菌属的差异也决定了原料乳贮藏过程中菌落结构的变化。假单胞菌属被普遍认为是原料乳冷藏过程中的优势嗜冷菌<sup>[9]</sup>,它们产生的耐热胞外蛋白酶、脂肪酶对乳品质影响较大。然而冷藏24、72 h牦牛乳中假单胞菌属的相对丰度较低,这主要因为假单胞菌属一般来源于饲料、饮水、挤奶设备以及与牧场环境有关<sup>[15]</sup>,而牦牛主要以自然放牧为主。不动杆菌属也是与乳相关的腐败菌,普遍存在于自然界,但是冷藏24、72 h牦牛乳中相对丰度较低,因此,假单胞菌属、不动杆菌属对牦牛乳品质影响较小。

乳球菌属、金黄杆菌属是牦牛乳冷藏过程中的优势菌属。Ribeiro等<sup>[16]</sup>发现巴西地区原料乳中具有潜在致腐能力的嗜冷菌中革兰氏阳性菌占58.2%,其中大多数为乳酸乳球菌。金黄杆菌属具有一定蛋白质、脂肪分解能力,对原料乳具有致腐能力。不同学者已从原料乳中分离出金黄杆菌属菌种如Chryseobacterium mulctrae sp<sup>[17]</sup>、Chryseobacterium vaccae sp<sup>[18]</sup>等。Charimba等<sup>[19]</sup>认为乳品中由酶分解导致的缺陷不仅是假单胞菌属,还与金黄杆菌属有关。本试验发现冷藏72 h牦牛乳中乳球菌属、金黄杆菌属相对丰度虽高于冷藏24 h牦牛乳,但其相对丰度变化不太明显,因此,低温贮藏延缓了乳球菌属和金黄杆菌属快速繁殖,确保了原料乳质量。然而,这也提醒当牦牛乳冷藏时间进一步延长时,乳球菌属和金黄杆菌属可能对牦牛乳品质产生影响。

其余细菌主要包含相对丰度1%以下的20个菌属,分别为相对丰度为0.01%~0.38%的沙雷氏菌属(Serratia),相对丰度0.06%~0.17%的Saccharibacteria\_genera\_incertae\_sedis、罗河杆菌属(Rhodanobacter)和肠球菌属(Enterococcus)。相对

丰度 0.01%~0.06%的水球菌属 (*Aquisphaera*)、慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、丛毛单胞菌属 (*Comamonas*)、脱氟维托加菌属 (*Deftuviitoga*)、德沃斯氏菌属 (*Devosia*)、独鸟菌属 (*Dokdonella*)、生丝微菌属 (*Hyphomicrobium*)、考古氏菌属 (*Kocuria*)、韩国生工菌属 (*Kribbella*)、亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*)、根微菌属 (*Rhizomicrobium*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、鞘氨醇盒菌属 (*Sphingopyxis*)、发球菌属 (*Trichococcus*)、巨型球菌属 (*Macrococcus*)、中生根瘤菌 (*Mesorhizobium*)。罗河杆菌属曾发现于牧场草地和土壤中<sup>[20]</sup>, 鞘氨醇单胞菌属、慢生根瘤菌属也是土壤根际菌。因此, 不同冷藏牦牛乳样品中罗河杆菌属, 慢生根瘤菌属、考古氏菌属、鞘氨醇单胞菌属、巨型球菌属以及金黄杆菌属

属、链球菌属、不动杆菌属等可能源自环境、乳头表面等<sup>[21]</sup>。冷藏牦牛乳中未发现与乳制品紧密相关的耐热性致病菌梭菌<sup>[22]</sup>和芽孢杆菌属等<sup>[23]</sup>。

### 2.5 牦牛乳理化性质分析

乳的理化性质对乳制品加工和品质具有重要影响, 其理化性质结果见表 3。

从表 3 可知, 牦牛乳 S2 样品中酪蛋白含量比 S1 显著低 4.43% ( $p<0.05$ ), S2 样品中脂肪含量比 S1 显著低了 67.51% ( $p<0.05$ )。申倩等<sup>[24]</sup>也发现生鲜牛乳 4 °C 贮藏 3 d 后乳脂率显著降低。牦牛乳 S2 样品中酸度高于 S1。Mankai 等<sup>[25]</sup>发现牛乳在 4 °C 下贮藏时间从 24 h 延长到 96 h 时, 乳的酸度呈现增加趋势。

表 3 不同冷藏时间牦牛乳的理化性质

Table 3 The physicochemical property of yak milk under different refrigerated storage period

样本名称	蛋白质/%	酪蛋白/%	脂肪/%	乳糖/%	总固形物/%	非脂乳固体/%	酸度/°T
S1	4.08±0.01 <sup>b</sup>	3.61±0.02 <sup>a</sup>	7.94±0.12 <sup>a</sup>	4.70±0.01 <sup>b</sup>	17.92±0.14 <sup>a</sup>	9.71±0.02 <sup>b</sup>	12.56±0.36 <sup>b</sup>
S2	4.24±0.01 <sup>a</sup>	3.45±0.01 <sup>b</sup>	4.74±0.03 <sup>b</sup>	4.71±0.01 <sup>b</sup>	15.00±0.03 <sup>b</sup>	10.06±0.02 <sup>a</sup>	14.66±0.24 <sup>a</sup>

注: 同列不同的小写字母表示样品间指标的显著性差异 ( $p<0.05$ )。

表 4 牦牛乳中细菌菌属之间的 Pearson 相关性分析

Table 4 Pearson correlation coefficients of relative abundance of bacteria in yak milk

项目	明串珠菌属	假单胞菌属	不动杆菌属	链球菌属	栖水菌属	金黄杆菌属	乳球菌属
明串珠菌属	1						
假单胞菌属	-0.383	1					
不动杆菌属	-0.567	0.422	1				
链球菌属	-0.634	0.119	0.880*	1			
栖水菌属	0.367	-0.813*	-0.491	-0.416	1		
金黄杆菌属	-0.094	-0.561	-0.623	-0.418	0.711	1	
乳球菌属	0.339	0.579	-0.344	-0.487	-0.573	-0.374	1

注: \*表示在 0.05 水平 (双侧) 上显著相关。

表 5 牦牛乳中细菌相对丰度与其理化指标的 Pearson 相关性分析

Table 5 Pearson correlation coefficients of relative abundance of bacterial and physicochemical indices in yak milk

项目	蛋白质/%	酪蛋白/%	脂肪/%	总固形物/%	非脂乳固体/%	酸度/°T	乳糖
明串珠菌属	0.572	-0.610	-0.607	-0.606	0.634	0.630	-0.021
假单胞菌属	0.115	0.051	-0.092	-0.099	0.105	0.120	0.781
不动杆菌属	-0.779	0.880*	0.784	0.780	-0.764	-0.685	0.012
链球菌属	-0.970**	0.987**	0.972**	0.971**	-0.961**	-0.945**	-0.386
栖水菌属	0.213	-0.313	-0.222	-0.217	0.200	0.260	-0.355
金黄杆菌属	0.248	-0.356	-0.231	0.226	0.176	0.161	-0.302
乳球菌属	0.642	-0.581	-0.643	-0.647	0.663	0.578	0.599

注: \*\*表示在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关, \*表示在 0.05 水平 (双侧) 上显著相关。

原料乳理化性质的改变与其微生物活动、内源性酶活性等有关。嗜冷菌所分泌的蛋白酶对酪蛋白具有降解作用<sup>[26]</sup>, 金黄杆菌属、假单胞菌属和不动杆菌属

等具有脂肪分解能力<sup>[27]</sup>。本试验发现, 与冷藏 24 h 牦牛乳相比, 冷藏 72 h 牦牛乳中乳球菌属、栖水菌属、金黄杆菌属和明串珠菌属相对丰度呈现增长趋势。另

外, 降解  $\beta$ -酪蛋白的内源性纤维溶酶在低温下具有较强活性<sup>[28]</sup>, 因此, 冷藏时间延长 72 h 后, 牦牛乳中酪蛋白和脂肪含量降低。但是, 冷藏 72 h 牦牛乳的理化指标仍然高于国家标准中对生乳的要求, 酸度也未超过 18 °T<sup>[29]</sup>, 因此, 冷藏 72 h 牦牛乳品质有保障。

## 2.6 牦牛乳中微生物菌属之间以及与理化指标的相关性分析

不同冷藏时间牦牛乳中相对丰度为 1% 的微生物菌属之间以及与理化指标进行了相关性分析, 其结果见表 4、5。

从表 4 可知, 金黄杆菌属除与栖水菌属具有较强正相关性之外, 与其它菌属之间存在负相关性。乳球菌属与明串珠菌属存在较弱正相关性, 与不动杆菌属、链球菌属、栖水菌属存在负相关性。链球菌属与栖水菌属、金黄杆菌属和乳球菌属之间也存在负相关性, 而与不动杆菌属存在较强正相关性 ( $p < 0.05$ )。

从表 5 可知, 乳球菌属与原料酸度、乳糖含量呈现正相关性, 与脂肪含量呈现负相关。原料乳中酸度与链球菌属呈现极显著负相关性 ( $p < 0.01$ ), 与不动杆菌属也存在负相关性, 与金黄杆菌属呈现较弱正相关性, 与明串珠菌属呈现较强正相关性。以上相关性分析表明由于代谢产物或者环境的改变导致不同微生物生长繁殖之间可能存在协同或者拮抗作用。

原料乳中丰富的营养物质有利于微生物的生长繁殖, 但是由于微生物自身代谢产物以及原料乳理化性质的改变, 使得对微生物的生长繁殖产生不同影响。乳酸菌具有产细菌素的能力, 它产生的细菌素对其它微生物具有抑制作用, 已有不同学者从原料奶<sup>[30]</sup>、新疆巴音布鲁克牧区鲜乳和酸奶疙瘩<sup>[31]</sup>中筛选出具有抗乳房炎致病菌、金黄色葡萄球菌等的乳酸乳球菌。Hanu 等<sup>[32]</sup>发现由嗜冷菌作用所产生的脂肪酸具有较强抑菌作用, 而游离脂肪酸的增加对乳酸菌生长具有抑制作用<sup>[33,34]</sup>。乳酸菌耐酸能力较强, 能够忍耐酸度较强的环境。因此, 原料乳在冷藏过程中, 微生物相互之间, 微生物与原料乳理化性质之间相互影响, 最终导致原料乳品质的改变。

## 3 结论

冷藏 24、72 h 牦牛乳中厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门占到微生物相对丰度的 99% 以上。冷藏 24、72 h 牦牛乳中第一、二优势菌属为乳球菌属、金黄杆菌属, 分别占到冷藏 24、72 h 牦牛乳中细菌相对丰度的 59.48% 和 67.51%。冷藏 72 h 牦牛乳中乳球菌属、金

黄杆菌属相对丰度比冷藏 24 h 牦牛乳高出 22.74%、3.56%, 但是冷藏 72 h 牦牛乳中链球菌、不动杆菌属呈现降低趋势。冷藏 24、72 h 牦牛乳中假单胞菌属相对丰度较低, 分别为 1.69% 和 1.78%。冷藏 72 h 牦牛乳中酪蛋白、脂肪含量低于冷藏 24 h 牦牛乳, 酸度增加到 14.66 °T。72 h 的低温冷藏有助于控制牦牛乳细菌繁殖, 维持乳品质。该研究为牦牛乳贮藏, 干酪等乳制品加工, 确保其品质和质量安全提供了理论依据。

## 参考文献

- [1] McInnis E A, Kalanetra K M, Mills D A, et al. Analysis of raw goat milk microbiota: impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity [J]. Food Microbiology, 2015, 46: 121-131
- [2] 2020-2026 年中国牦牛奶行业市场营销模式及投资规划分析报告[R].智研咨询集团,2020  
Analysis report of 2020-2026 on marketing model and investment planning of Chinese yak milk industry [R]. Zhiyan Consulting Group, 2020
- [3] 李亚茹,郝力壮,刘书杰,等.牦牛乳与其他哺乳动物乳常规营养成分的比较分析[J].食品科学,2016,37(2):379-383,388  
LI Yaru, HAO Lizhuang, LIU Shujie, et al. Comparative analysis of functional components of yak milk with other mammalian milk [J]. Food Science, 2016, 37(2): 379-383, 388
- [4] 高宇,汪家琦,戴智勇,等.牦牛乳营养组分及功能特性研究进展[J].乳业科学与技术,2021,44(3):43-49  
GAO Yu, WANG Jiaqi, DAI Zhiyong, et al. Review of research on nutritional components and functional characteristics of yak milk [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2021, 44(3): 43-49
- [5] Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, et al. The complex microbiota of raw milk [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37 (5): 664-698
- [6] Yamazi A K, Moreira T S, Cavicchioli V Q, et al. Long cold storage influences the microbiological quality of raw goat milk [J]. Small Ruminant Research, 2013, 113(1): 205-210
- [7] 苟萌,胡婕,张彤彤,等.Illumina Mi Seq 高通量测序技术研究原料乳冷藏过程中微生物群落演替规律[J].中国食品学报,2021,21(7):313-319  
GOU Meng, HU Jie, ZHANG Tongtong, et al. The succession of microbial community in raw milk during cold storage by Illumina Mi Seq high-throughput sequencing [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(7): 313-319

- [8] Tribst A A, Falcade L T P, Ribeiro L R, et al. Impact of extended refrigerated storage and freezing/thawing storage combination on physicochemical and microstructural characteristics of raw whole and skimmed sheep milk [J]. *International Dairy Journal*, 2019, 94: 29-37
- [9] Li H M, Ma Y, Li Q M, et al. The chemical composition and nitrogen distribution of Chinese yak (Maiwa) milk [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(8): 885-4895
- [10] 马静,王迅,孙璐,等.青海地区不同海拔高度牦牛乳微生物多样性研究[J].*动物营养学报*,2021,33(10):1-11  
MA Jing, WANG Xu, SUN Lu, et al. Study on microbial diversity of yak milk at different altitudes in Qinghai area [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(10): 1-11
- [11] Liu W J, Xi X X, Sudu Q G, et al. High-throughput sequencing reveals microbial community diversity of Tibetan naturally fermented yak milk [J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(3): 1741-1751
- [12] Raats D, Offek M, Minz D, et al. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(3): 465-471
- [13] 郭小杰.原料乳中嗜冷菌多样性及其主要水解酶特性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2020  
GUO Xiaojie. Study on the diversity and main hydrolase properties of psychrotrophic bacteria in raw milk [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2020
- [14] 王媛媛,剧柠,苟萌,等.宏基因组学探究原料乳冷藏过程菌群变化规律[J].*农业工程学报*,2020,36(22):333-339  
WANG Yuanyuan, JU Ning, GOU Meng, et al. Metagenomics approach to explore the changes of bacterial community in raw milk during refrigerated storage [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2020, 36(22): 333-339
- [15] Carloni E, Petruzzelli A, Amagliani G, et al. Effect of farm characteristics and practices on hygienic quality of ovine raw milk used for artisan cheese production in central Italy [J]. *Animal Science Journal*, 2016, 87(4): 591-599
- [16] Ribeiro Jnior J C, de Oliveira A M, Silva F de G, et al. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(1): 75-83
- [17] Yoon S H, Lee J E, Han R H, et al. *Chryseobacterium mulctrae* sp. nov., isolated from raw cows milk [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(11): 3478-3484
- [18] Lee J E, Yoon S H, Lee G Y, et al. *Chryseobacterium vaccae* sp. nov., isolated from raw cow's milk [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(9): 4859-4866
- [19] Charimba G, Jooste P J, Tsoeu L I, et al. Spoilage potential of a novel group of bacteria isolated from dairy products: research article [J]. *South African Journal of Science*, 2016, 112(1): 140-147
- [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*, 2017, 83(2): e02694-16
- [21] Vacheyrou M, Normand A C, Guyot P, et al. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 146(3): 253-262
- [22] Fernandes R. *Microbiology Handbook - Dairy Products* (1st ed) [M]. UK, Epsom: Leatherhead Food International Ltd, 2009
- [23] Claeys W L, Cardoen S, Daube G, et al. Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits [J]. *Food Control*, 2013, 31(1): 251-262
- [24] 申倩,刘永峰,杨泽莎,等.家用冰箱 3 种低温贮藏方式下生鲜牛奶品质变化[J].*食品与发酵工业*,2019,45(16):171-175  
SHEN Qian, LIU Yongfeng, YANG Zesha, et al. Changes in raw milk quality under three cooling conditions using domestic refrigerators [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(16): 171-175
- [25] Mankai M, Boulares M, Moussa O B, et al. The effect of refrigerated storage of raw milk on the physicochemical and microbiological quality of Tunisian semihard Gouda-type cheese during ripening [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2012, 65(2): 250-259
- [26] Kohlmann K L, Nielsen S S, Steenson L R, et al. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms [J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3275-3283
- [27] Bekker A, Jooste P, Steyn L, et al. Lipid breakdown and sensory analysis of milk inoculated with *Chryseobacterium joostei* or *Pseudomonas fluorescens* [J]. *International Dairy Journal*, 2016, 52: 101-106
- [28] Reimerdes E H, Herlitz E. The formation of  $\gamma$ -caseins during cooling of raw milk [J]. *Journal of Dairy Research*, 1979, 46(2): 219-221