科学通报 2024 年 第 69 卷 第 25 期: 3681 ~ 3683
悦读科学
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

探索自然发酵乳中乳酸菌种内微观多样性及其生态驱动因素

尤利军[1,2,3], 靳昊[1,2,3], 郭丽如[1,2,3], 吕瑞瑞[1,2,3], 赵志鑫[1,2,3], 孟和毕力格[1,2,3], 孙志宏[1,2,3], 刘文俊[1,2,3*], 张和平[1,2,3*]

1. 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;
2. 内蒙古农业大学农业农村部奶制品加工重点实验室, 呼和浩特 010018;
3. 内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 呼和浩特 010018
* 联系人, E-mail: wjliu168@163.com; hepingdd@vip.sina.com

Intraspecific microdiversity and ecological drivers of lactic acid bacteria in naturally fermented milk ecosystem

Lijun You[1,2,3], Hao Jin[1,2,3], Lai-Yu Kwok[1,2,3], Ruirui Lv[1,2,3], Zhixin Zhao[1,2,3], Menghe Bilige[1,2,3], Zhihong Sun[1,2,3], Wenjun Liu[1,2,3*] & Heping Zhang[1,2,3*]

[1] *Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;*
[2] *Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;*
[3] *Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China*
* Corresponding authors, E-mail: wjliu168@163.com; hepingdd@vip.sina.com

doi: 10.1360/TB-2024-0642

自然发酵是传统保存鲜乳的重要手段, 时至今日, 自然发酵乳制品依然是世界各地居民日常饮食的重要组成部分, 其具有“发酵状态开放, 制作工艺粗放”的特点, 制作和食用以及独特的风味、质地和营养价值流传千年[1,2]. 自然发酵乳制品在全球分布广泛, 而我国的乳制品资源主要分布在新疆、西藏、内蒙古等地, 以酸牛乳、酸马乳、酸驼乳、奶酪和发酵牦牛乳等发酵乳制品为主, 其中蕴藏了丰富的乳酸菌资源, 包括乳杆菌属、片球菌属、明串珠菌属和乳球菌属等, 自然发酵乳是乳酸菌微生物资源的宝贵载体, 也是研究微生物多样性的典型代表[3,4]. 自然发酵乳中的微生物经历千年的自然选择, 形成了结构复杂, 相对稳定和形式多样的微生物生态系统. 然而, 自然发酵乳中乳酸菌稳定、可遗传微观生态体系的形成原因和驱动因素尚不明确.

本团队前期基于二代和三代16S rRNA测序技术, 完成了中国、蒙古国和俄罗斯等国家不同乳源的自然发酵乳样品的细菌多样性分析, 揭示了自然发酵乳中乳酸菌的生物多样性受地理因素影响的规律[5~8]. 随着全基因组测序技术的发展, 群体遗传学与全基因组分析相结合, 开启了群体遗传学新时代, 主要应用于乳酸菌的分类、进化、生境适应性和遗传多样性等方面. 2015年采用高通量测序技术首次完成乳杆菌属和双歧杆菌属等8个属213个模式菌株基因组测定, 从群体基因组学水平揭示了乳杆菌和双歧杆菌不同物种分化伴随的功能基因进化历程, 发现乳糖代谢和蛋白水解等菌株营养代谢特征与栖息环境适应性密切相关的规律[9]. 随着测序技术的发展和测序成本的降低, 宏基因组测序逐渐进入研究者的视野. 其能够鉴定微生物到种水平甚至菌株水平并且能够反应“生态环境”真实的微生物结构. 越来越多的研究人员利用宏基因组测序来解析微生物之间、微生物与环境之间的相互作用关系. 通过宏基因组学, 研究者能够发现并表征以前未知的微生物物种, 识别和监测自然发酵乳中反应品质、质量和安全性的细菌素、抗菌肽和耐药等基因, 也能够发现更多的环境微生物群落的宏基因组特征, 如宏基因组组装基因组个数, 编码基因个数、质粒个数和水平基因转移频率[10,11].

本研究从菌株、菌种、菌群三个层面系统解析了自然发酵乳中样本内和样本间乳酸菌种内基因组多样性、基因功能多样性和微生物群落组成与遗传多样性特征的关联[12]. 本研究从中国内蒙古自治区、新疆维吾尔自治区、西藏自

© 2024《中国科学》杂志社

治区以及吉尔吉斯斯坦、塔吉克斯坦、摩洛哥和蒙古等国家和地区采集了12份自然发酵乳样本. 将收集的样本采用平板分离划线培养的方法挑取717个单克隆菌株进行全基因组测序. 其中分离得到214株*Lactobacillus helveticus*、97株*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、325株*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 总计636株基因组进行后续分析(图1(a)). 为探究乳酸菌的群体结构和遗传进化关系, 通过系统发育分析, 发现所有物种/亚种均观察到基于样本的清晰聚类模式, 在大多数情况下, 来自同一样本的多个分离株以单一谱系的形式出现, 也存在多谱系并存的现象. 每个物种/亚种的样本内基因组大小均观察到显著的进化支间差异, 并且在平均核苷酸相似性(ANI)和单核苷酸多态性(SNP)遗传距离中观察到显著的进化支间和进化支内差异(图1(b)). 此外, 在健康人类肠道和皮肤毛孔生态环境中微生物菌株适应性进化研究中也观察到类似的结果[13~15]. 总的来说, 每个物种/亚种样本内的分离株种群遗传多样性不同且菌群结构具有明显的地理聚类特征, 同一样本中的乳酸菌菌株具有高度的种内异质性并且由多个谱系演化而来.

发酵乳中的蛋白质和碳水化合物的分解代谢是影响发酵乳制品营养、功能和感官特征的关键因素. 发酵过程中, 主要通过多种酶促反应实现其分解代谢. 为了探究乳酸菌分离株的功能多样性, 对其肽酶(Peptidase)和碳水化合物活性酶(CAZyme)进行了功能注释. 研究发现, Peptidase和CAZyme在不同样本之间存在显著的功能多样性差异(图1(c)), 3个物种/亚种样本内进化分支之间的蛋白水解和碳水化合物功能表现出显著的功能性差异, 并且存在功能富集和缺失现象. 本研究结果表明样品间和样品内Peptidase和CAZyme具有功能多样性和分支特异性的代谢潜力差异. 这与植物根际和人类肠道环境分离菌株的研究结果相似[16,17]. 基于上述菌株进化支中的功能多样性和特异性基因, 进一步探讨了菌株的特异性基因的来源. 研究发现, 样本中分支特异性基因中存在大量的移动遗传元件和潜在的水平基因转移事件. 可移动元件比例在12%~14%, 水平基因转移比例在36%~63%. 水平基因转移溯源分析发现, 3个不同物种的水平基因转移获得性基因大部分来自同属同种, 同种的比例在47%~90%(图1(d)). 与KEGG注释结果发现, 最常见的模块是磷酸盐和氨基酸转运系统、辅因子和维生素代谢和糖类、多元醇和脂质转运系统. 结果表明乳酸菌特异性基因包括内源性和水平基因转移获得, 并参与多种代谢过程. 目前已有报道, 奶酪微生物分离株存在着大量的水平基因转移的现象[18].

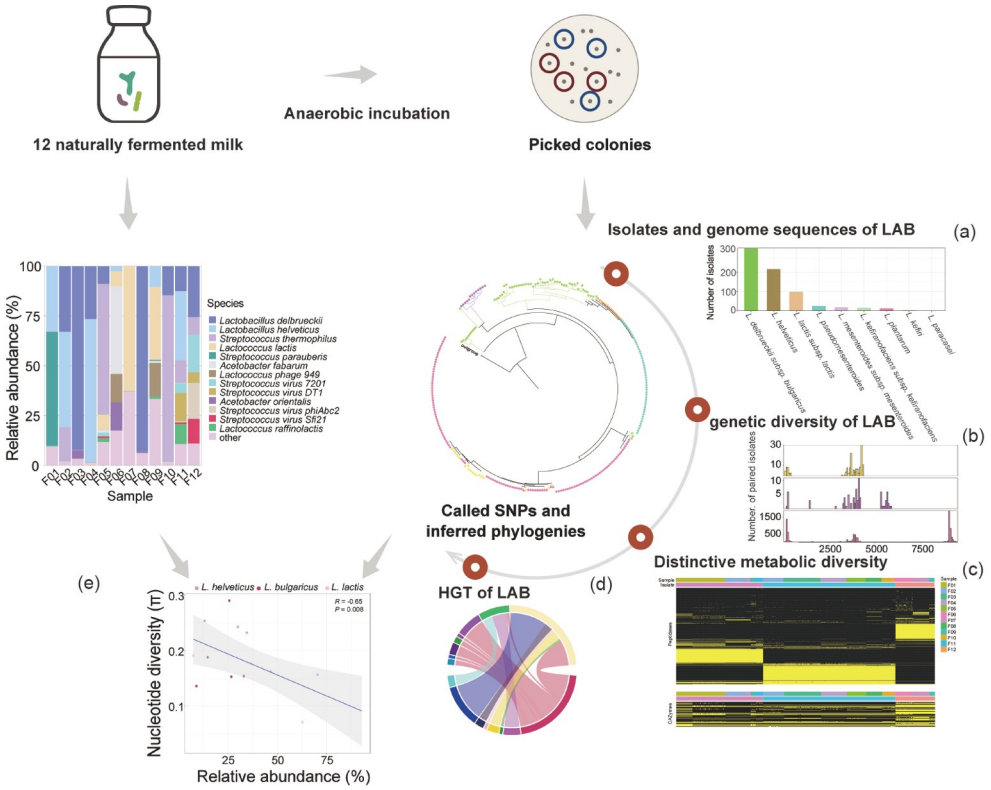


图 1 (网络版彩色)本研究的流程示意图. (a) 乳酸菌菌株的分离和测序; (b) 乳酸菌分离株的遗传多样性分析; (c) 乳酸菌分离株的代谢功能多样性分析; (d) 乳酸菌分离株的水平基因转移分析; (e) 发酵乳微生物群落与乳酸菌菌株遗传多样特征的关联

Figure 1 (Color online) The detailed research flow chart of this study. (a) Isolates and genome sequences of LAB; (b) Analysis of genetic diversity of LAB; (c) Analysis of metabolic functional diversity of LAB; (d) Horizontal gene transfer of LAB; (e) Association between the microbial community of fermented milk and the genetic diversity characteristics of LAB

通过对12份自然发酵乳原始样本宏基因组深度测序发现，不同国家地区的自然发酵乳有其独特的种群组成，优势物种的含量占87%．进一步比较样本中微生物群落与分离菌株的单核苷酸突变位点个数的平均比例(60.99%、85.57%和51.18%)，挑取的大量单克隆菌株能够代表该样本微生物群落．基于多元方差的分析发现，自然发酵乳样本中的微生物组成与分离株的遗传进化特征有关(图1(e))．而自然发酵乳中微生物的群落构成受多种因素驱动，包括生物和非生物环境压力．这些压力包括发酵初始物质的自然微生物群、发酵过程中的环境条件、生产方法以及地理位置等[19]．

这项研究系统地探索了自然发酵乳中的乳酸菌是一个微生物构成相对复杂的生态系统，单个样本种内突变可达2418至4382个突变位点，形成了2~8进化分支，其中的每一个菌株都是一个独立的个体，这些不同的个体组成了一个复杂的群体．通过比较基因组和宏基因组学分析，揭示了自然发酵乳经过数千年传承，形成了具有复杂菌株结构的稳定体系．这不仅与发酵乳的类型以及乳中其他种类微生物的含量相关，还受到微生物之间基因交流的影响．后续研究方向：(1) 生态群落操纵：通过调控发酵过程中的生态群落，优化乳酸菌的种群结构和功能；(2) 生态型乳酸菌制剂：开发符合生态学原理的乳酸菌制剂，用于促进发酵、增强风味或提高营养价值的乳酸菌混合物；(3) 乳酸菌菌株互补代谢依赖性研究：识别和分析菌株之间的互补代谢基因，探讨因基因缺失导致的代谢依赖关系．综上，本文为自然发酵乳制品的微生物研究提供了生态学见解，也为乳酸菌进一步开发利用提供了新的思路．

推荐阅读文献

1 Chilton S, Burton J, Reid G. Inclusion of fermented foods in food guides around the world. Nutrients, 2015, 7: 390–404
2 de Melo Pereira G V, de Carvalho Neto D P, Maske B L, et al. An updated review on bacterial community composition of traditional fermented milk products: What next-generation sequencing has revealed so far? Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62: 1870–1889
3 Liu S, Han Y, Zhou Z. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. Food Res Int, 2011, 44: 643–651
4 Jin H, Ma T, Chen L, et al. The iLABdb: A web-based integrated lactic acid bacteria database. Sci Bull, 2023, 68: 2527–2530
5 Jin H, Mo L, Pan L, et al. Using PacBio sequencing to investigate the bacterial microbiota of traditional Buryatian cottage cheese and comparison with Italian and Kazakhstan artisanal cheeses. J Dairy Sci, 2018, 101: 6885–6896
6 Liu W, Xi X, Sudu Q, et al. High-throughput sequencing reveals microbial community diversity of Xizang naturally fermented yak milk. Ann Microbiol, 2015, 65: 1741–1751
7 Liu W J, Sun Z H, Zhang Y B, et al. A survey of the bacterial composition of kurut from Xizang using a culture-independent approach. J Dairy Sci, 2012, 95: 1064–1072
8 Sun Z, Liu W, Bao Q, et al. Investigation of bacterial and fungal diversity in tarag using high-throughput sequencing. J Dairy Sci, 2014, 97: 6085–6096
9 Sun Z, Harris H M B, McCann A, et al. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. Nat Commun, 2015, 6: 8322
10 Du R, Xiong W, Xu L, et al. Metagenomics reveals the habitat specificity of biosynthetic potential of secondary metabolites in global food fermentations. Microbiome, 2023, 11: 115
11 Walsh A M, Macori G, Kilcawley K N, et al. Meta-analysis of cheese microbiomes highlights contributions to multiple aspects of quality. Nat Food, 2020, 1: 500–510
12 You L, Jin H, Kwok L Y, et al. Intraspecific microdiversity and ecological drivers of lactic acid bacteria in naturally fermented milk ecosystem. Sci Bull, 2023, 68: 2405–2417
13 Conwill A, Kuan A C, Damerla R, et al. Anatomy promotes neutral coexistence of strains in the human skin microbiome. Cell Host Microbe, 2022, 30: 171–182
14 Zhao S, Lieberman T D, Poyet M, et al. Adaptive evolution within gut microbiomes of healthy people. Cell Host Microbe, 2019, 25: 656–667
15 Zhou W, Spoto M, Hardy R, et al. Host-specific evolutionary and transmission dynamics shape the functional diversification of *Staphylococcus epidermidis* in human skin. Cell, 2020, 180: 454–470
16 Tett A, Huang K D, Asnicar F, et al. The *Prevotella copri* complex comprises four distinct clades underrepresented in westernized populations. Cell Host Microbe, 2019, 26: 666–679
17 Xia L, Miao Y, Cao A, et al. Biosynthetic gene cluster profiling predicts the positive association between antagonism and phylogeny in *Bacillus*. Nat Commun, 2022, 13: 1023
18 Bonham K S, Wolfe B E, Dutton R J. Extensive horizontal gene transfer in cheese-associated bacteria. eLife, 2017, 6: e22144
19 Zhong Z, Hou Q, Kwok L, et al. Bacterial microbiota compositions of naturally fermented milk are shaped by both geographic origin and sample type. J Dairy Sci, 2016, 99: 7832–7841

(部分文献由编辑修改)