DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250729005
引用格式: 赵盼君, 张燕, 原瑞绵, 等. 不同地区来源开菲尔粒微生物多样性分析及发酵酸奶品质研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 295–304.
ZHAO PJ, ZHANG Y, YUAN RM, *et al*. Analysis of microbial diversity in Kefir granules from different sources and research of fermented yogurt quality [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 295–304. (in Chinese with English abstract).

不同地区来源开菲尔粒微生物多样性分析及发酵酸奶品质研究

赵盼君, 张　燕, 原瑞绵, 邱　帅, 赵婧琰, 高秀芝*
(北京农学院食品科学与工程学院, 北京　102206)

摘　要: 目的　探究 4 种不同地区来源的开菲尔粒中的微生物多样性。**方法**　使用传统分离纯化、分子生物学技术、高通量测序等方法探究不同来源开菲尔粒中的微生物多样性。以 8%接种量发酵 4 种开菲尔酸奶, 分析比较酸奶的蛋白质含量、总酸、pH 及持水力, 并利用质构仪测定其质构特性。**结果**　种水平上, 4 种地区来源的开菲尔粒共有的优势真菌为单孢哈萨克斯坦酵母(*Kazachstania unispora*)和马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*), 优势细菌为马乳酒乳杆菌(*Lactobacillus kefiranofaciens*)、开菲尔乳杆菌(*Lactobacillus kefir*); 真菌的操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)共 35 个, 其中 4 种开菲尔粒共有 OTUs 数为 3 个; 细菌的 OTUs 共 12 个, 其中 4 种开菲尔粒共有细菌 OTUs 数为 3 个; 德国发酵酸奶胶黏性好但酸度过高; 中国的发酵酸奶咀嚼性高但持水力较差; 俄罗斯的发酵酸奶持水力及大部分质构特性优良, 但咀嚼性较差; 美国的发酵乳蛋白质含量最高但质构特性较差。**结论**　本研究揭示了不同来源开菲尔粒的微生物多样性及其对酸奶品质的显著影响。中国开菲尔粒以马克斯克鲁维酵母为优势菌种, 赋予酸奶独特的风味和较高咀嚼性; 德国样品则表现出优异的胶黏性, 但酸度过高需工艺优化。微生物群落差异直接导致了酸奶理化与质构特性的区域性特征, 为开菲尔菌剂的定向筛选提供了理论依据。

关键词: 开菲尔粒; 微生物多样性; 酸奶; 品质分析

Analysis of microbial diversity in Kefir granules from different sources and research of fermented yogurt quality

ZHAO Pan-Jun, ZHANG Yan, YUAN Rui-Mian, QIU Shuai, ZHAO Jing-Yan, GAO Xiu-Zhi*
(*College of Food Science and Engineering*, *Beijing University of Agriculture*, *Beijing* 102206, *China*)

ABSTRACT: Objective　To explore the microbial diversity among 4 kinds of Kefir granules from different regions. **Methods**　Traditional separation and purification, molecular biology technology, high-throughput sequencing and other methods were used to explore the microbial diversity in Kefir granules from different sources. The 4 kinds of

收稿日期: 2025-07-29
基金项目: 北京农学院本科生科研训练项目
第一作者: 赵盼君(2003—), 女, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 2927581932@qq.com
***通信作者:** 高秀芝(1977—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为食品微生物与生物技术研究。E-mail: gxz@bua.edu.cn

Kefir yogurt were fermented with 8% inoculum. The protein content, total acid, pH and water holding capacity of yogurt were analyzed and compared, and their texture characteristics were determined by texture analyzer. **Results** At the species level, the dominant fungi shared by Kefir granules from 4 kinds of regions were *Kazachstania unispora* and *Kluyveromyces marxianus*, and the dominant bacteria were *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus kefir*. There were a total of 35 operational taxonomic units (OTUs) in fungi, among which 4 kinds of Kefir granules had a total of 3 OTUs. There were 12 bacterial OTUs in total, of which 3 were common to the 4 kinds of Kefir granules. German fermented yogurt had good viscosity but with high acidity, and Chinese fermented yogurt had high chewiness but with poor water holding capacity. Russian fermented yoghurt had good water holding capacity and most texture properties, but its chewiness was poor. Fermented milk in the United States had the highest protein content, but poor texture properties. **Conclusion** This study reveals the microbial diversity of Kefir granules from different sources and its significant impact on the quality of yogurt. Chinese Kefir granules, with *Kluyveromyces maximus* as the dominant strain, endow yogurt with unique flavor and high chewiness. German samples show excellent stickiness, but their too high acidity required process optimization. The differences in microbial communities directly lead to regional characteristics in the physicochemical and textural properties of yogurt, providing a theoretical basis for the targeted screening of Kefir agents.

KEY WORDS: Kefir granules; microbial diversity; yogurt; quality analysis

0 引 言

开菲尔粒起源于高加索地区，在其蛋白质与多糖构成的骨架上栖息着乳酸菌、酵母菌及醋酸菌等多种有益微生物，在牛乳或羊乳培养时，能同时进行乳酸、醋酸和乙醇发酵，得到的一种黏稠且含醇、酸及少量二氧化碳的发酵乳，称之为开菲尔(Kefir)[1–2]。研究表明开菲尔中的细菌主要包括乳杆菌属、醋酸杆菌属、葡糖杆菌属、芽孢杆菌属、双歧杆菌属、乳球菌属以及肠球菌属等[3–4]，酵母菌主要为克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、假丝酵母属、毕赤氏酵母属、酿酒酵母属及哈萨克斯坦酵母属等[5–6]。乳酸菌作为其中占比最高的构成菌种，在开菲尔发酵制品的风味及组织形态形成中发挥了重要作用[7–10]。不同地区气候和环境的差异导致开菲尔粒的微生物多样性有所差别，探究开菲尔粒中微生物多样性差异有利于掌握其菌群结构组成、发酵过程、产物及代谢机制等。

作为传统发酵剂，开菲尔粒的微生物多样性受地域环境影响显著，不同地区的开菲尔粒在菌群组成上呈现一定差异。目前对于开菲尔菌种的研究结果大多来源于中国和土耳其等不同地区。WANG 等[11]对来自西藏的两种不同开菲尔粒 K1 和 K2 及其发酵乳分别进行高通量测序，发现乳杆菌是两种开菲尔粒中常见的优势菌种(98%)；两种开菲尔均出现了马乳酒乳杆菌(*Lactobacillus kefiranofaciens*)，且均占到了微生物种类的一半以上，这表明马乳酒乳杆菌是这两种开菲尔中的优势菌种。ZENG 等[12]也研究了 3 种西藏开菲尔的微生物区系结构，得到在 50 种最丰富的菌株中，45 种是 3 种开菲尔粒共有的，可以认为三者的优势微生物区系组成相近。土耳其研究者 ILIKKAN 等[13]对当地两种开菲尔细菌和真菌的多样性进行了研究，16S rDNA 和 26S rDNA 测序结果表示，其中一种优势菌为马乳酒乳杆菌，另一种为长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)，此外两者均包含的菌株包括乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)和瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)等，而 NALBANTOGLU 等[14]和 YUSUF 等[15]的研究均证明其所研究的土耳其地区开菲尔优势细菌为马乳酒乳杆菌。BICER 等[16]对土耳其当地 5 种开菲尔进行了微生物区系研究，发现在属水平上主要为乳杆菌、乳球菌、链球菌、肠球菌、明串珠菌、乳杆菌、漫游球菌、不动杆菌、假单胞菌、梭菌、四球菌、果杆菌、肠球菌等。DERTLI 等[17]从土耳其不同地区收集 4 种开菲尔粒，进行了微生物多样性分析并研究其对开菲尔香气的作用。结果表明，所有样品中均存在开菲尔乳杆菌、醋酸杆菌、肠杆菌、不动杆菌、肠球菌和假单胞菌，其中开菲尔乳杆菌以重要水平存在。同时还在样品中检测到了其他属于哈萨克斯坦酵母菌、念珠菌、伊萨森基亚酵母菌和杜鹃花属的酵母物种。开菲尔样品的挥发性化合物也与开菲尔粒的微生物多样性有关，揭示了土耳其开菲尔粒的丰富菌群及其与开菲尔芳香特性的相互作用。

开菲尔发酵酸奶拥有复杂的微生物区系，其中包含多种具有良好益生性的细菌与真菌，这些微生物可进入肠道并对人体肠道菌群产生影响[18–19]，进而表现出抗病原菌活性[20–21]和抗氧化活性[22]，同时还能调节机体免疫系统，为抵抗病原体和癌变提供基础；发酵乳的风味物质主要来源于乳本身的成分、微生物代谢产物以及加工过程中产生的物质等[23–24]，而开菲尔的风味差异主要由其中的微生物差异所致，不同乳酸菌在发酵过程中产生的风味物质存在

较大差异, 且微生物之间的相互作用也会改变发酵乳的风味成分, 因此可通过调控微生物的种类和数量来达到改变风味成分的目的[3]。

因此, 本研究选用来自中国、德国、俄罗斯及美国 4 个国家某一地区的 4 种开菲尔粒, 通过传统的分离纯化、分子生物学鉴定以及高通量测序技术, 分析比较不同来源开菲尔粒的微生物多样性, 揭示不同地区来源的开菲尔粒中的优势菌群; 通过理化指标分析比较其发酵酸奶品质差异, 以期定向筛选出品质优良的开菲尔酸奶菌剂, 为开发新型开菲尔酸奶产品奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

来自中国西藏、德国柏林、俄罗斯高加索地区及美国加利福尼亚州的开菲尔粒购自网络购物平台; 纯牛奶购自网络购物平台。

MRS 肉汤培养基、MRS 培养基、MC 培养基、马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、平板计数琼脂(plate cout agar, PCA)培养基、孟加拉红琼脂培养基、胰蛋白胨(生化试剂)、革兰氏染色试剂盒(分析纯)(北京陆桥技术股份有限公司); 通用细菌基因组 DNA 提取试剂盒[生化试剂, 天根生化科技(北京)有限公司]; 酚酞指示剂、亚甲基蓝、溴甲酚绿(分析纯, 上海易恩化学技术有限公司); 氢氧化钠(分析纯, 天津市致远化学试剂有限公司); 凯氏定氮消化片[赛诺利康生物技术(北京)有限公司]; 甲基红、硫酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 硼酸(分析纯, 北京北化精细化学品有限责任公司); 无水乙醇(分析纯, 北京北化亿源科技有限公司); 氯化钠(分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 0.1%吕氏碱性美兰染色液(分析纯)、马铃薯葡萄糖水(生化试剂)[青岛高科技工业园海博生物技术有限公司]; 香柏油(生化试剂, 上海懿洋仪器有限公司); FastDNA™ Spin Kit for Soil 试剂盒[生化试剂, 批号: 116560200-CF, 安倍医疗器械贸易(上海)有限公司]; TransStart Fastpfu DNA 聚合酶(生化试剂, 批号: AP221-01, 北京全式金生物技术股份有限公司); AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒[生化试剂, 批号: AP GX-250, 爱思进生物技术(杭州)有限公司], TruSeqTM DNA Sample Prep Kit [生化试剂, 批号: FC-121-3001, 因美纳(中国)科学器材有限公司]。

1.2　仪器与设备

MLS-3780 高压蒸汽灭菌锅(日本三洋电机株式会社); DL-CJ-IN 超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司); CR2800 涡旋振荡器(上海丛融仪器有限公司); ws-01 恒温培养箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司); SCIENTZ-11 无菌均质器(宁波新芝生物科技股份有限公司); BSA2202S 分析天平[精度 0.0001 g, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; LEICA DM500 普通光学显微镜(徕卡仪器有限公司); DL-101 电热恒温鼓风干燥箱(天津市中环实验电炉有限公司); K1100 自动凯氏定氮仪(济南海能仪器有限公司); HC-3518 离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); CTX 质构仪(美国博勒飞公司); PHSJ-6L pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　开菲尔粒中微生物的分离纯化及分子生物学鉴定

(1)酵母菌的分离纯化

将开菲尔粒按 33.33%的接种量接种到 120 mL 牛奶中发酵(37 ℃, 24 h), 连续活化 3 代后, 参照 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母菌计数》中的平板计数法测定酵母菌总数。挑取培养基上每个地区菌落形态明显不同的单菌落在 PDA 固体培养基上划线分离培养(28 ℃, 48 h)。划线分离培养 3 代后, 利用显微镜对其进行显微形态观察。纯种保存, 不纯的菌种继续划线培养, 直到镜检被确定为纯种为止, 由此得到 4 个地区开菲尔粒中的优势酵母菌[25]。

(2)细菌的分离纯化

参照 GB 4789.35—2023《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》中的方法测定乳酸菌总数。采用 MRS 培养基从样品酸奶中分离出了 4 个地区开菲尔粒中的乳酸菌及其他细菌。将单菌落挑入到 MRS 肉汤中培养, 后再在 MRS 固体培养基上划线分离培养(37 ℃, 48 h)。在划线分离培养 3 代后, 利用显微镜对细菌进行显微形态观察。纯种保存, 不纯的菌种继续划线培养直至镜检为纯种, 由此得到 4 个地区开菲尔粒中的优势细菌。

(3)分子生物学鉴定

利用试剂盒提取分离的细菌及酵母菌的 DNA。将样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司, 对细菌进行 16S rRNA 并对真菌进行 26S rRNA 基因序列测定, 根据测序结果, 查询美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库 BLAST 进行同源性分析和相关信息检索, 分析亲缘关系和相似性, 并通过 MEGA 11 构建系统发育树, 置信度检测采用自举数据集 1000 次。通过 NCBI 网站申请经分离纯化得到的细菌、酵母菌的登录号。

1.3.2　基于高通量测序技术分析开菲尔粒中微生物多样性

以质量比为 8%的接种量, 将 4 个地区来源的开菲尔粒接种到纯牛奶中, 于 37 ℃发酵开菲尔酸奶, 酸奶凝固后, 置于离心管, 4 ℃, 8000 r/min, 离心 10 min, 弃去上清液(乳清等), 取沉淀物(酸奶固体)于–80 ℃下保存备用。实验样品的总 DNA 提取按照 DNA 提取试剂盒给定的步骤进行, 于–80 ℃下保存。将提取的总 DNA 送上海美吉生物公司, 使用 NEXTFLEX Rapid DNA-SeqKit 进行建库, 利用

Illumina 公司的 NovaSeqPE300 平台进行测序, 参考文献[26–27]的分析方法对测序结果进行统计分析。

1.3.3 开菲尔酸奶的品质特性研究

(1)蛋白质含量测定

采用凯氏定氮法对 4 个地区的开菲尔酸奶进行蛋白质含量的测定, 每组实验做 3 个平行。

(2)持水力测定

分别称取 30 g 4 个地区开菲尔酸奶样品, 置于 50 mL 离心管, 室温下 4000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 称量沉淀物质量, 利用公式(1)计算结果[28], 每组实验做 3 个平行。

$$Y/\%=M/N\times100\% \quad (1)$$

式中: Y 为持水力, %; M 为沉淀物质量, g; N 为酸奶样品质量, g。

(3)总酸与 pH 测定

采用中酚酞指示剂法测定 4 个地区开菲尔酸奶的总酸含量。采用 pH 计对 4 个地区的开菲尔酸奶进行 pH 测定[29], 每组实验做 3 个平行。

(4)质构特性测定

利用 TA10 探头以及 CTX 质构仪对 4 个地区的开菲尔酸奶进行硬度、黏聚性、胶黏性和咀嚼性的测定。

1.4 数据处理

每组实验均重复 3 次, 实验结果以平均值±标准偏差表示; 采用 WPS Office Excel (12.1.0.24034)软件进行数据统计并制表制图; 采用 MEGA 11 软件绘制系统发育树; 参考谭斯尹等[26]和燕平梅等[27]的相关研究方法对高通量测序结果进行统计分析。所有统计学分析运用 IBM SPSS Statistics 27.0 计算, 显著性水平阈值为 $P<0.05$。

2 结果与分析

2.1 开菲尔粒中微生物的分离纯化及分子生物学鉴定结果

4 个地区来源的开菲尔粒样品中的微生物菌落总数如表 1 所示, 4 个样品的乳酸菌菌落总数均具有显著性差异($P<0.05$); 俄罗斯和德国来源的开菲尔粒中细菌菌落总数较多, 与美国、中国来源的开菲尔粒相比具有显著性差异($P<0.05$); 中国来源的开菲尔粒中酵母菌总数最多, 且与其他 3 个地区具有显著性差异($P<0.05$), 在酸奶发酵过程中中国的开菲尔粒发酵酸奶中产气情况明显多于其他酸奶。

表 1 4 个地区来源开菲尔粒中微生物菌落总数

Table 1 Total number of microbial colonies in Kefir granules from 4 regions

地区来源	细菌菌落总数/[lg(CFU/g)]	酵母菌落总数/[lg(CFU/g)]	乳酸菌总数/[lg(CFU/g)]
美国	8.85±0.50^{b}	6.42±0.09^{b}	8.48±0.03^{b}
俄罗斯	9.10±0.07^{a}	6.51±0.10^{b}	8.40±0.03^{c}
中国	7.80±0.03^{c}	7.04±0.14^{a}	8.32±0.01^{d}
德国	9.05±0.02^{a}	6.50±0.11^{b}	8.65±0.07^{a}

注: 同列数据不同字母表示差异显著($P<0.05$), 相同字母表示差异不显著($P>0.05$), 表 4 同。

经过分离纯化以及分子生物学鉴定, 俄罗斯开菲尔粒中分离得到 2 株马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)和 1 株发酵毕赤酵母(*Pichia fermentans*), 德国开菲尔粒中分离到 1 株马克斯克鲁维酵母、1 株发酵毕赤酵母、2 株克鲁维酵母, 美国开菲尔粒中分离到 2 株马克斯克鲁维酵母、1 株克鲁维酵母, 中国开菲尔粒分离出了 2 株马克斯克鲁维酵母及 1 株单孢哈萨克斯坦酵母(*Kazachstania unispora*)。4 种开菲尔粒中共分离纯化到 13 株酵母菌, 通过对比菌株显微形态及比对序列, 筛除重复菌株, 共分离纯化到 4 种、6 株酵母菌, 形态特征及 26S rRNA 序列比对结果如表 2 所示。

对于开菲尔粒中乳酸菌及其他细菌的分离, 美国开菲尔粒中分离到了 3 株开菲尔乳杆菌(*Lentilactobacillus kefir*)、1 株沃氏葡萄球菌(*Staphylococcus warneri*), 中国开菲尔粒分离到了 1 株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*), 德国开菲尔粒中分别分离到了 3 株蚕豆醋酸杆菌(*Acetobacter*), 俄罗斯开菲尔粒中分离出 2 株醋酸杆菌。4 种开菲尔粒中共分离纯化到 4 株乳杆菌、5 株醋酸杆菌和 1 株葡萄球菌, 通过对比显微形态及比对序列, 筛除重复菌株, 得到 5 种细菌, 形态特征及 16S rRNA 序列测序比对结果如表 3 所示。

表 2 分离酵母菌形态特征及 26S rRNA 序列测序结果

Table 2 Morphological characteristics of isolated yeast and sequencing results of 26S rRNA sequence

菌种名称	菌落及菌体形态特征	NCBI 登录号	来源
发酵毕赤酵母 BR41	圆形、有隆起、表面光滑、边缘光滑、蜡状、有光泽	PV902799	俄罗斯
克鲁维酵母 KF4(11)	圆形、扁平、边缘锯齿状、表面不光滑、干燥、粗糙	PV902800	德国
克鲁维酵母 Y.LIII25	圆形、表面光滑、有隆起、有光泽、蜡状、边缘光滑	PV902801	德国
马克斯克鲁维酵母 DMKU3-1042	圆形、表面扁平、表面光滑、干燥、不透明、蜡状	PV902802	美国
马克斯克鲁维酵母 BR10	圆形、表面光滑、湿润、表面微隆起、无褶皱、边缘规则、不透明	PV902803	美国
单孢哈萨克斯坦酵母 CZNJM-8	圆形、表面有凸起、边缘光滑、无褶皱、湿润、 乳白色不透明	PV902804	中国

表 3　分离细菌形态特征及 16S rRNA 测序结果

Table 3　Morphological characteristics of isolated bacteria and sequencing results of 16S rRNA

菌种名称	菌落及菌体形态特征	NCBI 登录号	来源
开菲尔乳杆菌 JK5	边缘不整齐锯齿状、不透明、圆形、有光泽、湿润	PV902479	美国
沃氏葡萄球菌 2279	边缘光滑整齐、不透明、圆形、有光泽、表面光滑、湿润	PV902480	美国
植物乳杆菌 KLDS 株 1.0607	边缘光滑整齐、透明、圆形、有光泽、湿润	PV902481	中国
蚕豆醋酸杆菌 G2-5	边缘光滑整齐、不透明、圆形、有光泽、湿润	PV902482	德国
马氏醋酸杆菌 NM156-4 (*Acetobacter malorum*)	边缘光滑整齐、不透明、圆形、有光泽、湿润	PV902483	俄罗斯

将分离得到的酵母菌进行序列比对得到系统发育树如图 1 所示, 克鲁维酵母 KF4(11)、克鲁维酵母 Y.LIII25、马克斯克鲁维酵母 DMKU3-1042 和马克斯克鲁维酵母 BR10 属于一个类群, 其每两个相邻的菌亲缘关系较近且自展值为 100, 可信度高; 单孢哈萨克斯坦酵母 CZNJM-8 与 4 株克鲁维酵母的亲缘关系较远, 发酵毕赤酵母 BR41 与其他 5 株酵母菌的亲缘关系较远, 属于单独的两个类群。整体上系统发育树的自展值较高, 可信度高。

将分离得到的细菌进行序列比对得到系统发育树如图 2 所示, 开菲尔乳杆菌 JK5 与植物乳杆菌 KLDS 株 1.0607 的亲缘关系较近且自展值较高, 均属于乳杆菌属; 其与沃氏葡萄球菌 2279、蚕豆醋酸杆菌 G2-5 以及马氏醋酸杆菌 NM156-4 的亲缘关系依次递减, 整体上系统发育树的自展值较高, 可信度高。

2.2　基于高通量测序技术对开菲尔粒中微生物多样性分析

2.2.1　开菲尔粒中真菌群落结构多样性分析

不同来源开菲尔酸奶样品中真菌稀释曲线图如图 3 所示, 稀释曲线逐渐趋于平缓, 测序数据达到饱和, 能够覆盖本次测序中绝大部分物种, 说明本次测序深度能够反映出样品中的真菌含量。

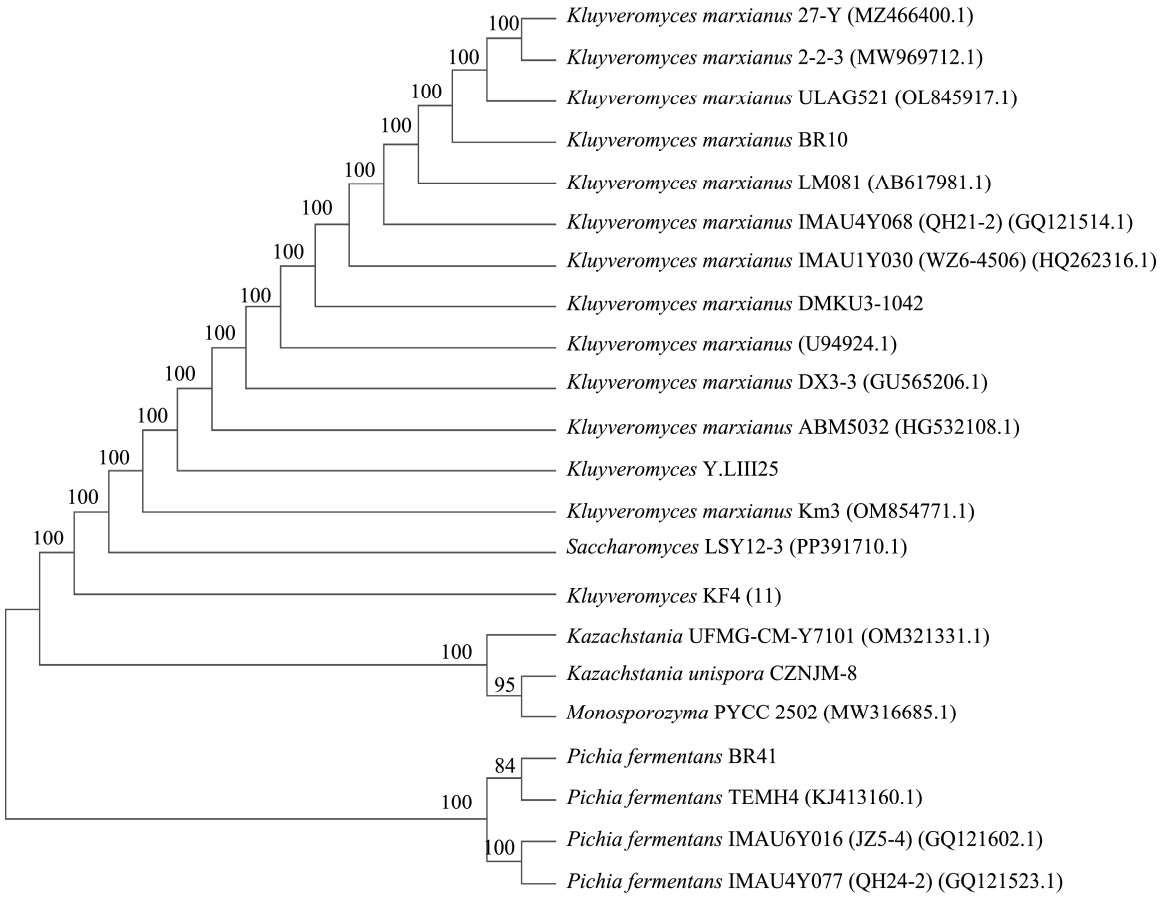


图 1　开菲尔粒中分离的酵母菌系统发育树

Fig.1　Phylogenetic tree of yeast isolated from Kefir granules

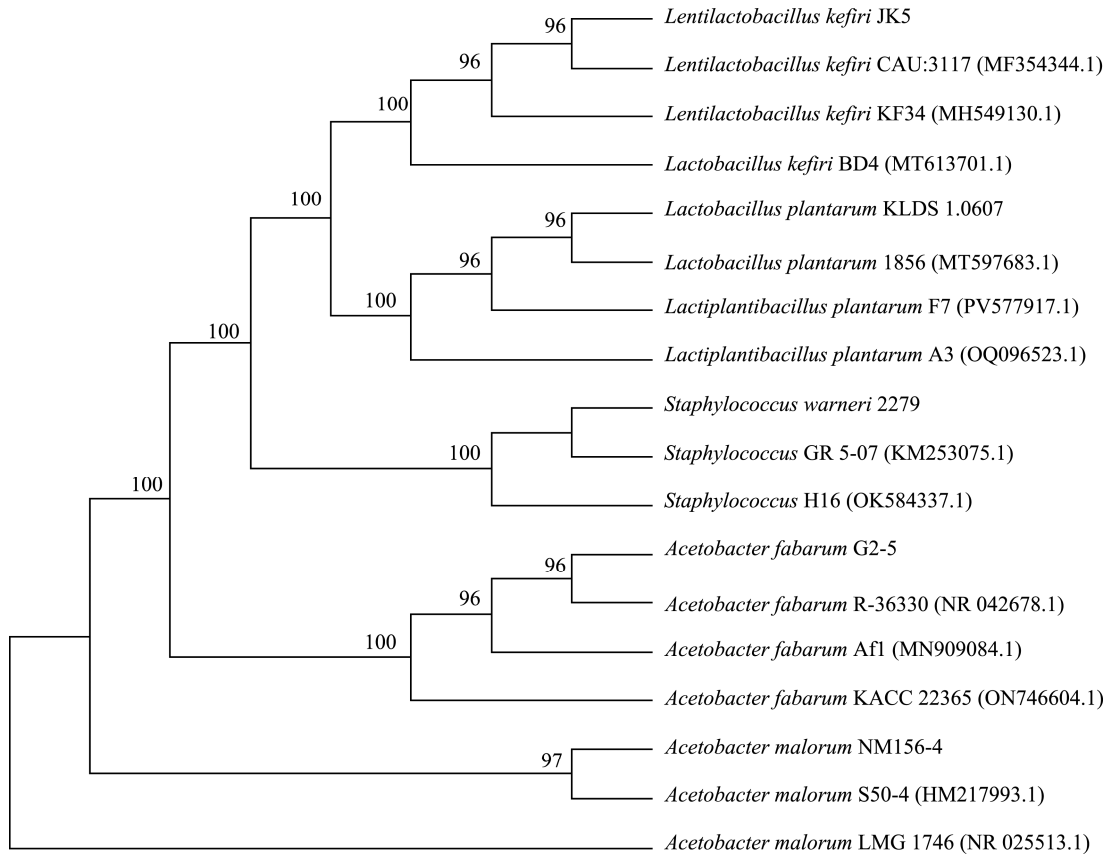
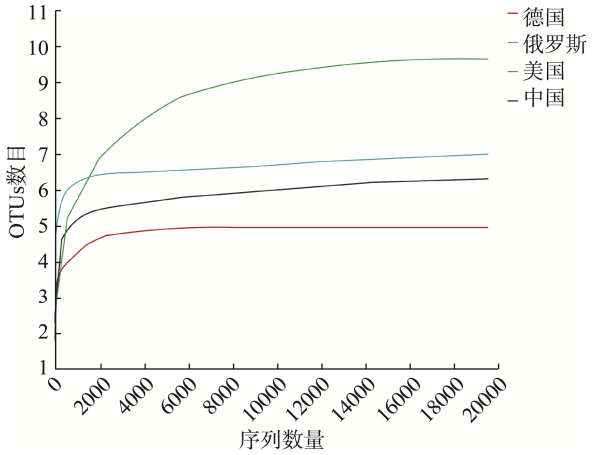


图 2 开菲尔粒中分离的细菌系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of bacteria isolated from Kefir granules



注：操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)。

图 3 不同来源开菲尔酸奶的真菌稀释曲线图

Fig.3 Fungal dilution curves of Kefir yogurt from different sources

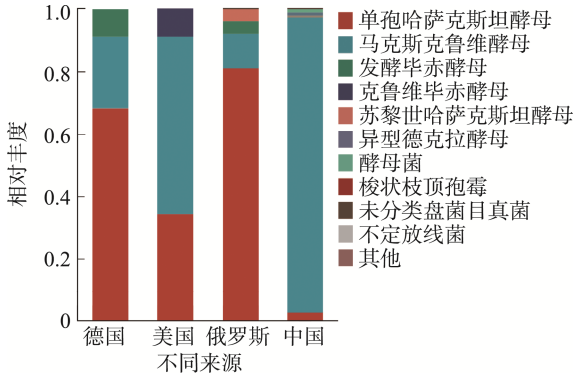


图 4 不同来源开菲尔酸奶种水平上的真菌群落结构

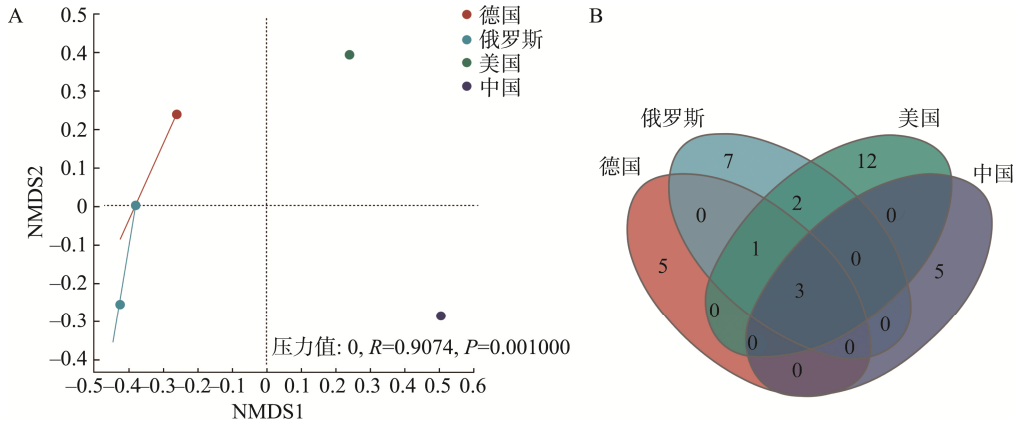
Fig.4 Fungal community structure at the species level of Kefir yogurt from different sources

不同开菲尔粒样品种水平上的真菌群落结构如图 4 所示，主要由单孢哈萨克斯坦酵母和马克斯克鲁维酵母组成，与分离结果一致。源于中国的开菲尔粒中马克斯克鲁维酵母占比明显高于其他样品，达 95.03%，中国与美国开菲尔粒中马克斯克鲁维酵母均为优势菌种[10]；而德国与俄罗斯开菲尔粒以单孢哈萨克斯坦酵母为最优势菌种，且二者群落结构较为接近。

基于 OTUs 水平不同开菲尔粒来源酸奶真菌群落的非度量多维尺度(non-metric multidimensional scaling, NMDS)分析如图 5A 所示，压力值小于 0.01，说明不同开菲尔粒来源酸奶样本在真菌 OTU 水平有很好的排序。不同开菲尔粒来源酸奶样品的真菌群落结构差异具有统计学意义(P<0.05)。德国与俄罗斯的开菲尔酸奶真菌群落的样本点较接近，表明这两个样本物种组成较相似；德国、俄罗斯的开菲尔粒与美国、中国开菲尔粒样品在 NMDS 方向上呈

现分离趋势，不同开菲尔粒来源酸奶样品的真菌群落结构差异显著(P<0.05)。

通过 Venn 图分析不同地区开菲尔粒中真菌所共有和独有的 OTUs 数目如图 5B 所示。结果表明，4 种开菲尔粒中真菌的 OTUs 共 35 个，其中真菌共有 OTUs 数为 3 个。美国地区的开菲尔粒中特有的真菌为 12 个，俄罗斯地区的开菲尔粒中特有的真菌为 7 个，德国与中国的开菲尔粒中特有的真菌为 5 个。



注：A. 真菌群落的 NMDS 分析；B. 真菌群落的 Venn 图。

图 5　基于 OTUs 水平不同来源开菲尔酸奶样品真菌群落的 NMDS 分析和 Venn 图

Fig.5　NMDS analysis and Venn diagram of fungal communities in Kefir yogurt samples from different sources based on OTUs levels

2.2.2　开菲尔粒中细菌群落结构多样性分析

不同来源开菲尔酸奶样品中细菌稀释曲线图如图 6 所示，每个样品取 3 个平行的平均值。稀释曲线逐渐趋于平缓，测序数据达到饱和，能够覆盖本次测序中绝大部分物种，说明本次测序深度能够反映出样品中的细菌含量。

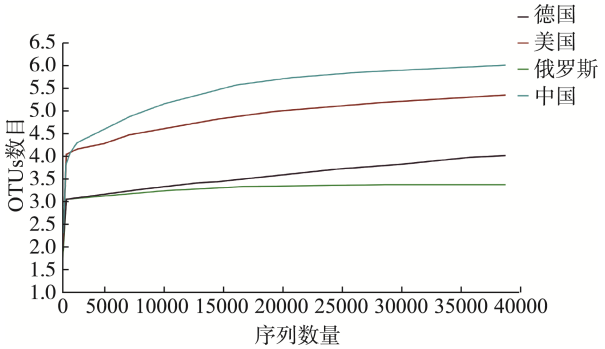


图 6　不同来源开菲尔酸奶的细菌稀释曲线图

Fig.6　Bacterial dilution curve of Kefir yogurt from different sources

不同来源开菲尔种水平上的细菌群落结构如图 7 所示，4 种开菲尔粒共有的优势细菌为马乳酒乳杆菌和开菲尔乳杆菌，中国开菲尔粒中马乳酒乳杆菌占比(74.47%)明显高于其他 3 个地区(俄罗斯 29.84%、德国 40.70%、美国 41.31%)；俄罗斯、美国及德国的开菲尔粒中的优势菌还有巴氏醋杆菌罗旺亚种(*Acetobacter lovaniensis*)。在中国开菲尔粒中未分离出醋酸杆菌，而在德国、俄罗斯的开菲尔粒中分离出醋酸杆菌，该测序结果与分离纯化结果一致。

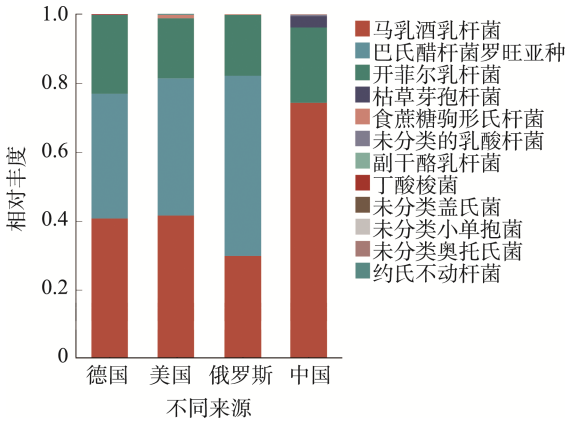
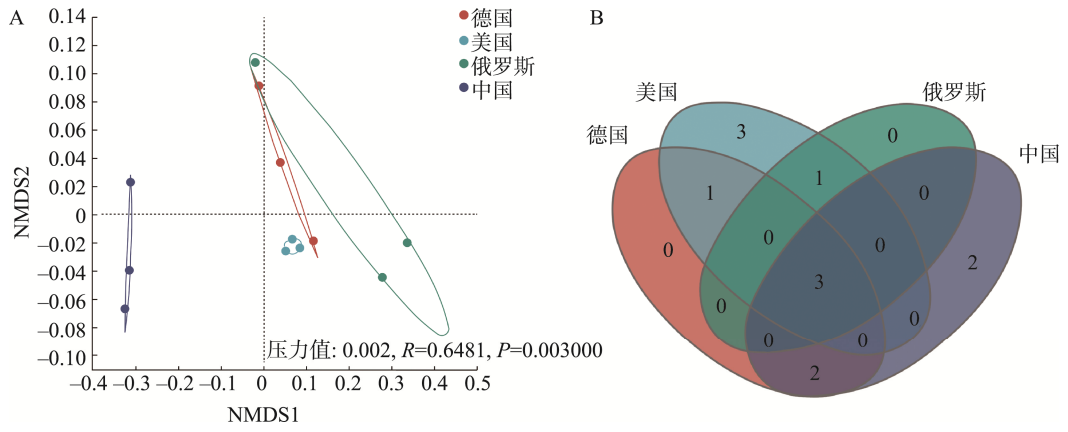


图 7　不同来源开菲尔酸奶的种水平上的细菌群落结构

Fig.7　Bacterial community structure at the species level of Kefir yogurt from different sources

基于 OTU 水平不同开菲尔粒来源酸奶样品细菌群落的 NMDS 分析如图 8A 所示，压力值小于 0.01，说明不同开菲尔粒来源酸奶样本在细菌 OTU 水平有很好的排序。德国、美国、俄罗斯地区的开菲尔粒中细菌群落的样本点较接近，说明这 3 种开菲尔粒细菌组成相近；而中国的开菲尔粒中细菌群落样本点与其他距离较远，差异较大；不同开菲尔粒来源酸奶样品的细菌群落结构差异显著(P<0.05)。

通过 Venn 图分析不同地区开菲尔粒细菌所共有和独有的 OTU 数目如图 8B 所示。从分析结果可以看出，细菌的 OTUs 共 12 个，其中 4 种开菲尔粒共有细菌 OTUs 数为 3 个。美国地区开菲尔粒中特有的细菌为 3 个、中国开菲尔粒中特有的细菌为 2 个，且德国与俄罗斯地区开菲尔粒



注: A. 细菌群落的 NMDS 分析; B. 细菌群落的 Venn 图。

图 8 基于 OTUs 水平不同来源开菲尔酸奶样品细菌群落的 NMDS 分析和 Venn 图

Fig.8 NMDS analysis and Venn diagram of bacterial communities in Kefir yogurt samples from different sources based on OTUs levels

中没有特有的细菌。综合图 5B 和图 8B 可知, 美国、俄罗斯、中国、德国 4 个地区的开菲尔粒中微生物 OTUs 数分别为 26、17、15、15。因此, 美国开菲尔粒的微生物种群丰富最高, 其次是俄罗斯, 再次是中国和德国。

2.3 开菲尔酸奶的品质特性分析

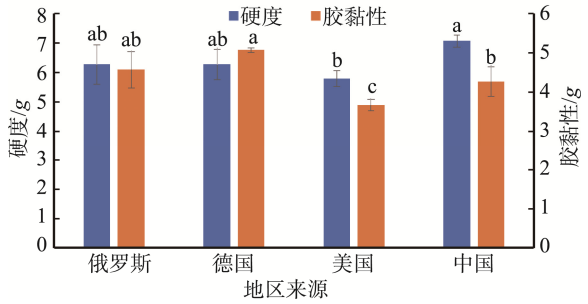
4 种来源的开菲尔酸奶的蛋白质含量如表 4 所示, 酸奶蛋白质含量无显著性差异(P>0.05), 美国来源的开菲尔酸奶蛋白质含量最高为(3.64±0.02) g/100 g; 俄罗斯开菲尔酸奶的持水力最强为 49.86%±2.57%, 而中国开菲尔酸奶的持水力最低, 与其他 3 个地区的持水力之间具有显著性差异(P<0.05); 德国来源的开菲尔酸奶酸度含量最高为(316.6±3.1)°T, 中国来源的酸度含量最低(P<0.05)。

表 4 不同来源开菲尔酸奶的蛋白质含量、持水力及总酸

Table 4 Protein content, water holding capacity and total acid of Kefir yogurt from different sources

地区来源	蛋白质含量/(g/100 g)	持水力/%	酸度/°T
德国	3.46±0.11^{a}	49.77±2.62^{a}	316.6±3.1^{a}
美国	3.64±0.02^{a}	47.22±2.40^{a}	248.0±3.4^{b}
俄罗斯	3.45±0.19^{a}	49.86±2.57^{a}	201.4±3.1^{c}
中国	3.48±0.06^{a}	42.59±1.91^{b}	118.0±2.0^{d}

由图 9、10 可知, 4 个不同地区来源的开菲尔酸奶的黏聚性之间没有显著性差异(P>0.05), 中国的开菲尔酸奶硬度最高, 为(7.07±0.21) g; 其黏聚性最高为 0.52±0.04; 且咀嚼性比其他 3 个地区的酸奶更高(P<0.05), 为(1.22±0.13) mJ。因此, 中国的发酵酸奶的质构特性较好。德国开菲尔酸奶的胶黏性最佳, 为(5.07±0.06) g; 俄罗斯的开菲尔酸奶硬度、胶黏性与黏聚性较好, 但咀嚼性较差; 美国的开菲尔酸奶硬度和胶黏性最低、黏聚性相对较低, 质构特性较差。



注: 不同小写字母表示差异显著(P<0.05); 相同小写字母表示差异不显著(P>0.05), 图 10 同。

图 9 4 个地区开菲尔粒发酵酸奶的硬度与胶黏性

Fig.9 Hardness and adhesiveness of Kefir granules fermented yogurt from 4 regions

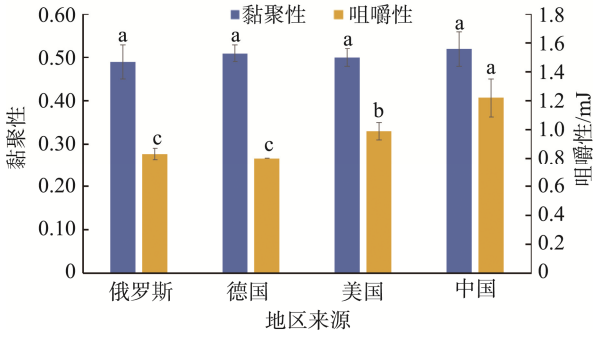


图 10 4 个地区开菲尔粒发酵酸奶的黏聚性与咀嚼性

Fig.10 Cohesiveness and chewiness of Kefir granules fermented yogurt from 4 regions

3 讨论与结论

3.1 不同地区来源开菲尔粒中微生物多样性

本研究中开菲尔粒中优势真菌为单孢哈萨克斯坦酵母和马克斯克鲁维酵母, 细菌主要由马乳酒乳杆菌和开菲尔乳杆菌组成。MARSH 等[30]采用高通量测序技术分析了德国和美国等地区的开菲尔原粒与开菲尔中菌群结构, 发

现克鲁维酵母菌属是其研究开菲尔粒中常见的真菌属; 德国和美国的开菲尔粒中均含有链球菌科和明串珠菌科, 美国的开菲尔粒中醋酸杆菌科比例最高, 与本研究结果一致。而 GAO 等[31]采用高通量测序技术对 4 个不同地区的西藏开菲尔原粒中细菌菌群结构比较研究发现, 优势细菌属为乳球菌属和乳杆菌属; LIU 等[32]的研究结果表明 3 个不同地区的西藏开菲尔原粒中优势细菌菌群都是乳杆菌属和醋酸杆菌属。

3.2　发酵酸奶品质探究

基于开菲尔兼具乳酸菌发酵和酵母菌发酵, 开菲尔酸奶与常规酸奶最大的感官区别在于前者具有爽快的酵母风味, 且酵母菌所产生的少量乙醇和二氧化碳赋予产品特别的酒香味和杀口感[33], 本研究中中国开菲尔粒中酵母菌数量最多, 其酸奶中气泡较多; 乳杆菌在中国的开菲尔酸奶细菌多样性占比高, 与酸奶的品质具有相关性, 可以调整接种比例、发酵温度与时间等优化酸奶发酵工艺, 以获得品质更优的开菲尔酸奶。酸度是影响发酵乳品质的最重要因素, 酸度 70~110°T 为最佳。巩小芬等[34]制备的开菲尔发酵乳酸度大多在 82.01~101.17°T, 而本研究中发酵的 4 个来源的酸奶酸度均超过最佳范围, 与发酵时的接种量、接糖量及发酵时间有密切联系, 后续实验过程中需优化发酵条件以改善此品质指标。持水力同样也是发酵乳品质的一个重要评价指标, 持水力与发酵乳的黏度成正比, 孙敏等[1]得到的发酵乳持水力结果均在 50%以上, 而本研究发酵的酸乳持水力均在 40%以上, 可适当增加接种量以提高酸奶的持水力及黏度。对于消费者来讲, 酸乳硬度是一个非常重要的指标。张亦等[35]制备的发酵乳硬度均处于适宜范围 33.90~39.90 *g*, 此硬度范围的发酵乳更容易为消费者接受。而本研究中的 4 种发酵乳均远低于适宜的硬度范围, 黏聚性也较低, 可进行接种量、加糖量、发酵时间与温度、冷却速度及储存温度等条件的优化达到符合消费者口味的优质酸奶。本研究中不同来源的开菲尔粒中具有不同种类及含量的酵母菌、乳酸菌及其他细菌; 4 种开菲尔酸奶在品质上并未呈现出统一的趋势, 可能与微生物种群多样, 导致发酵产物复杂, 进而影响了酸奶的品质特性。后续可以根据分离纯化得到的乳酸菌和酵母菌进行人工组合接种, 优化工艺和提升品质。

3.3　结　论

4 种地区来源的开菲尔粒共有的优势真菌为单孢哈萨克斯坦酵母和马克斯克鲁维酵母, 优势细菌为马乳酒乳杆菌、开菲尔乳杆菌; 美国开菲尔粒的微生物种群丰富最高, 其次是俄罗斯, 再次是中国和德国, 来源于中国开菲尔粒中各种菌属的相对丰度与其他 3 个地区的样品具有显著性差异(P<0.05)。4 个地区来源的开菲尔发酵乳的蛋白质含量与黏聚性之间无显著性差异(P>0.05)。德国发酵酸奶胶黏性好但酸度过高; 中国的发酵酸奶的质构特性较好但持水力较差; 俄罗斯的发酵酸奶持水力及大部分质构特性优良, 但咀嚼性较差; 美国的发酵乳蛋白质含量最高但质构特性较差。

参考文献

[1] 孙敏, 孙玥, 李博, 等. 开菲尔粒中乳酸菌的筛选与发酵特性[J]. 乳业科学与技术, 2020, 43(4): 1–6.
SUN M, SUN Y, LI B, *et al*. Screening and fermentation characteristics of lactic acid bacteria in Kefir granules [J]. Dairy Science and Technology, 2020, 43(4): 1–6.

[2] MAGRA TI, ANTONIOU KD, PSOMAS EI. Effect of milk fat, Kefir granules inoculum and storage time on the flow properties and microbiological characteristics of Kefir [J]. Journal of Texture Studies, 2012, 43(4): 299–308.

[3] 黎世威, 白英. 开菲尔微生物多样性及互作关系研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 272–280.
LI SW, BAI Y. Research progress on microbial diversity and interactions in Kefir [J]. Food Science, 2024, 45(1): 272–280.

[4] 王荫榆, 李会荣, 贾士芳, 等. 应用变性梯度凝胶电泳和 16S rDNA 序列分析对 Kefir 粒中细菌多样性的研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(2): 310–313.
WANG YY, LI HR, JIA SF, *et al*. Study on bacterial diversity in Kefir granules by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequence analysis [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(2): 310–313.

[5] 卢曼, 陈小兵, 王兴兴, 等. 西藏开菲尔粒中酵母菌的分离与初步鉴定[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(1): 138–145.
LU M, CHEN XB, WANG XX, *et al*. Isolation and preliminary identification of yeast in Kefir granules in Xizang [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(1): 138–145.

[6] 刘朋龙, 王亮, 钟浩, 等. 开菲尔粒中主要组成菌的分离鉴定[J]. 新疆畜牧业, 2016(8): 36–40.
LIU PL, WANG L, ZhONG H, *et al*. Isolation and identification of the main bacterial components in Kefir granules [J]. Xinjiang Animal Husbandry, 2016(8): 36–40.

[7] WITTHUHN RC, SCHOEMAN T, BRITZ TJ. Characterization of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir granules mass cultivation [J]. International Dairy Journal, 2005, 15(4): 383–389.

[8] 高洁, 崔璐, 袁昕蕾, 等. 基于宏基因组学技术的开菲尔粒中细菌组成分析[J]. 中国食品学报, 2016, 16(6): 225–230.
GAO J, CUI L, YUAN XL, *et al*. Bacteria composition analysis of Kefir grain by metagenomic technology [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(6): 225–230.

[9] SULMIYATI S, SAID NS, FAHRODI DU, *et al*. The physicochemical, microbiology, and sensory characteristics of Kefir goat milk with different levels of Kefir granules [J]. Tropical Animal Science Journal, 2019, 42(2), 152–158.

[10] 夏季, 杨琴, 李慧. 开菲尔粒中乳酸菌胞外多糖的提取及其抗氧化活性评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(16): 279–287.
XIA J, YANG Q, LI H. Extraction and antioxidant activity evaluation of exopolysaccharides from lactobacillus in Kefir granules [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(16): 279–287.

[11] WANG XM, LI WP, XU MJ, *et al*. The microbial diversity and

biofilm-forming characteristic of two traditional tibetan Kefir granules [J]. Foods, 2022, 11(1): 12.

[12] ZENG XJ, WANG YW, JIA H, *et al*. Metagenomic analysis of microflora structure and functional capacity in probiotic Tibetan Kefir granules [J]. Food Research International, 2022, 151: 110849.

[13] ILIKKAN OK, BAGDAT ES. Comparison of bacterial and fungal biodiversity of Turkish Kefir granules with high-throughput metagenomic analysis [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 152: 112375.

[14] NALBANTOGLU U, CAKAR A, DOGAN H, *et al*. Metagenomic analysis of the microbial community in Kefir granules [J]. Food Microbiology, 2014, 41: 42–51.

[15] YUSUF B, GURKAN U. Analysis of the Kefir and koumiss microbiota with the focus on certain functional properties of selected lactic acid bacteria [J]. Mljekarstvo, 2021, 71(2): 112–123.

[16] BICER Y, TELLI AE, SONMEZ G, *et al*. Comparison of commercial and traditional Kefir microbiota using metagenomic analysis [J]. International Journal of Dairy Technology, 2021, 74(3): 528–534.

[17] DERTLI E, ÇON AH. Microbial diversity of traditional Kefir granules and their role on Kefir aroma [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 85: 151–157.

[18] YILMAZ B, SHARMA H, MELEKOGLU E, *et al*. Recent developments in dairy Kefir-derived lactic acid bacteria and their health benefits [J]. Food Bioscience, 2022, 46: 101592.

[19] VIEIRA LV, DE-SOUSA LM, CORDEIRO-MAIA TA, *et al*. Milk Kefir therapy reduces inflammation and alveolar bone loss on periodontitis in rats [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 139: 111677.

[20] M'HIR S, RTIBI K, MEJRI A, *et al*. Development of a novel whey date beverage fermented with Kefir granules using response surface methodology [J]. Journal of Chemistry, 2019, 2019: 1–13.

[21] KUMAR LM, SAAD WZ, MOHAMAD R, *et al*. Influence of biofilm-forming lactic acid bacteria against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA S547) [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2017, 7(12): 1107–1115.

[22] STREIMIKYTE P, KAILIUVIENE J, MAZONIENE E, *et al*. The biochemical alteration of enzymatically hydrolysed and spontaneously fermented oat flour and its impact on pathogenic bacteria [J]. Foods, 2022, 11(14): 2055.

[23] 马龙, 邢军, 李安, 等. 开菲尔不同发酵时期微生物群落结构的变化[J]. 现代食品科技, 2019, 35(8): 27–34.
MA L, XING J, LI AN, *et al* Changes of microbial community structure in different fermentation periods of Kefir [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(8): 27–34.

[24] 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 Y, LU LX, XIONG XH. Production of food flavor substances by microbial fermentation [J]. Chinese Condiments, 2011, 36(7): 13–17.

[25] WANG L, DENG K, ZHANG Y. Isolation and screening of high-quality lactic acid bacteria and yeast strains in Kefir granules and preparation of Kefir compound fermentation starter [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, 46(11). https://doi.org/10.1111/jfpp.17073

[26] 谭斯尹, 潘礼业, 罗宇琴, 等. 基于高通量测序分析建曲发酵过程中微生物多样性变化[J]. 中国现代中药, 2024, 26(1): 104–112.
TAN SY, PAN LY, LUO YQ, *et al*. Analysis of microbial diversity changes in the fermentation process of jianqu based on high throughput sequencing [J]. Chinese Modern Traditional Chinese Medicine, 2024, 26(1): 104–112.

[27] 燕平梅, 张聪聪, 贾晶晶, 等. 基于高通量测序分析中草药对发酵泡菜亚硝酸盐含量的影响及机制[J]. 中国调味品, 2024, 49(5): 59–64.
YAN PM, ZHANG CC, JIA JJ, *et al*. The influence and mechanism of Chinese herbal medicine on nitrite content in fermented kimchi based on high-throughput sequencing analysis [J]. Chinese Condiments, 2024, 49(5): 59–64.

[28] 李海平, 周登云, 付荷蓉, 等. 滑菇多糖对发酵酸奶品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(7): 188–194.
LI HP, ZHOU DY, FU HR, *et al*. The effect of shiitake polysaccharides on the quality of fermented yogurt [J]. Food and Fermentation Industry, 2019, 45(7): 188–194.

[29] 何齐, 李雪, 冯倩, 等. 赛里木传统酸奶品质评价及风味物质分析[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(13): 175–182.
HE Q, LI X, FENG Q, *et al*. Quality evaluation and flavor substance analysis of serimu traditional yogurt [J]. Food Research and Development, 2023, 44(13): 175–182.

[30] MARSH JA, O'SULLIVAN O, HILL C, *et al*. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of Kefir granules and milks from multiple sources [J]. PLoS One, 2017, 8(7): e69371.

[31] GAO J, GU F, HE J, *et al*. Metagenome analysis of bacterial diversity in tibetan Kefir granules [J]. European Food Research and Technology, 2013, 236: 549–556.

[32] LIU W, ZHANG M, XIE J, *et al*. Comparative analyses of microbial community diversities of tibetan Kefir granules from three geographic regions [J]. International Journal of Dairy Technology, 2019, 72(4): 536–544.

[33] 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 H, XU ZY, ZHANG H. Research progress on traditional regional fermented milk-Kefir [J]. Food and Fermentation Industry, 2015, 41(10): 204–214.

[34] 巩小芬, 严琪钰, 王雨童, 等. 开菲尔粒中干酪乳杆菌的分离鉴定及发酵性能分析[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(6): 12–18.
GONG XF, YAN QY, WANG YT, *et al*. Isolation, identification, and fermentation performance analysis of *Lactobacillus casei* in Kefir granules [J]. China Dairy Industry, 2018, 46(6): 12–18.

[35] 张亦, 王亮, 吕自力, 等. 一种新型开菲尔风味复合发酵剂的研制[J]. 现代食品科技, 2022, 38(11): 80–89.
ZHANG Y, WANG L, LV ZL, *et al*. Development of a new type of Kefir flavor compound fermentation agent [J]. Modern Food Technology, 2022, 38(11): 80–89.

(责任编辑: 安香玉 蔡世佳)