宏基因组测序技术评估藏灵菇微生物组成与益生功能的研究与应用

于志伟[1]，李 笨[2]，周美玲[3]，杨紫琦[2]，林广宇[4]，于 晋[1, 3*]

1 那曲市人民医院，西藏那曲 852000
2 锦州医科大学医疗学院，辽宁锦州 121000
3 锦州医科大学附属口腔医院，辽宁锦州 121000
4 辽宁省农业发展中心，辽宁沈阳 110000

摘 要：[目的]藏灵菇（TKGs）作为我国西藏地区一种历史悠久的传统发酵制品，在民间饮食文化中占据独特地位。本研究旨在利用宏基因组测序技术，剖析TKGs的微生物组成与益生功能，为其开发利用提供依据。[方法]本研究从西藏林芝采集TKGs样本，经培养、DNA提取后，借助高通量测序构建宏基因组文库，并运用多种数据库开展生物信息学分析。[结果]本次测序数据质量高、组装效果佳。微生物以细菌为主，乳杆菌类群占主导，其中产马乳酒乳杆菌（*Lactobacillus kefiranofaciens*）占比54%，还有少量病毒、真核生物和古菌。病毒中乳杆菌噬菌体Llun1（*Lactobacillus phage Llun1*）占5%，真菌中小哈萨克斯坦酵母（*Kazachstania exigua*）占68%。功能基因注释表明，该菌株代谢活跃，如碳水化合物代谢通路基因为1477；环境信息处理能力强，膜转运和信号转导通路基因分别为934和503。同时，其细菌感染性疾病相关基因为12占比较低，但有一定抗微生物药物耐药性基因为265。CAZy和eggNOG数据库注释发现，该菌株碳水化合物代谢能力突出，整体代谢活跃。[结论]宏基因组测序揭示了TKGs的微生物组成与益生功能，本研究不仅强调了TKGs作为一种天然益生菌源的潜在价值，也为开发利用其益生功能提供科学依据。

关键词：藏灵菇（TKGs）；宏基因组测序；微生物组成；益生功能

文章编号：1671–4393（2025）10–0101–08 DOI:10.12377/1671–4393.25.10.16

中国乳业线上阅读

基金项目：西藏自治区自然科学基金组团式援藏医学项目[XZZR202402083（W）]；辽宁省教育厅基本项目（JYTMS20230677）

作者简介：于志伟（1986–），男，山东威海人，本科，主治医师，研究方向为临床微生物；
李 笨（1993–），男，辽宁葫芦岛人，满族，硕士，助教，研究方向为病原微生物与免疫；
周美玲（1986–），女，辽宁锦州人，硕士，主治医师，研究方向为口腔内科学；
杨紫琦（2005–），女，辽宁铁岭人，在读本科，研究方向为口腔医学；
林广宇（1979–），男，辽宁沈阳人，硕士，中级畜牧师，研究方向为病原微生物学。

*通信作者：于 晋（1985–），男，辽宁锦州人，硕士，副主任医师，研究方向为口腔颌面外科和口腔修复学。

0 引言

藏灵菇（Tibetan Kefir Grains，TKGs）是独特而复杂的蛋白质-脂质-多糖基质和多种微生物混合物，作为一种历史悠久的传统发酵制品，在我国民间饮食文化中占据独特地位。研究证明，TKGs及其产物具有降胆固醇、抗氧化、调节肠道菌群以及缓解情绪等多种益生功能[1~3]。TKGs发酵质量在很大程度上取决于其微生物组成，尽管TKGs的益生作用已得到一定认知，但目前对其内部微生物的详细构成以及具体益生功能的理解仍存在诸多不足。在传统微生物研究中，对于无法在体外培养的微生物物种，存在一定的研究局限性，这限制了TKGs中微生物多样性的全面和精准识别与分析，尤其是对于复杂多样的微生物种类[4，5]。因此，目前对TKGs中不同益生菌之间的协同作用机制，以及它们如何在人体内发挥独特益生功效的认识仍处于相对浅显的层面。

宏基因组测序技术的出现，为TKGs微生物种类构成的深入研究带来了新机遇。该技术不仅无需对菌体内的微生物进行分离培养，就能直接测序分析全部微生物基因组，还可以从功能基因角度全面、深入地揭示TKGs复杂微生物群落的组成和益生功能[6，7]。本研究采用宏基因组测序技术，对1 株取自于西藏林芝地区的TKGs菌株展开深度的微生物组成和功能基因特性分析，揭示该株TKGs的微生物多样性及益生功能，为后续该株TKGs单一菌株分离及其在食品、医药等领域的开发利用提供坚实的科学依据，扩展TKGs资源的合理开发与应用。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

从西藏林芝地区藏民家中采集TKGs样品。将其置于纯牛奶中浸泡，并转移至实验室，静置在25 ℃、需氧条件下发酵培养，待其发酵乳产生酸味气体、液体状态微凝固后，取部分TKGs菌粒按上述发酵条件进行多次活化，获得足量TKGs菌粒，低温条件运输至杭州联川生物技术股份有限公司（简称“联川生物”）进行下一步核酸提取和宏基因组测序。核酸提取前需充分混匀，方可进行微生物总DNA提取。

1.2 宏基因组测序

试剂盒提取的微生物总DNA，经质控评估合格后，利用联川生物HiSeq4000平台进行高通量测序（鸟枪法测序），构建TKGs宏基因组文库。步骤主要包括基因组DNA超声打断、DNA片段末端修复、加A碱基至DNA片段的3’末端、加测序接头、片段选择、PCR扩增、文库质检、上机测序。

1.3 生物信息学分析

数据过滤与组装：预处理数据后，对测序数据进行质量过滤和序列组装，将组装好的Contigs进行CDS预测，随后根据预测结果进行过滤和去冗余；计算相应丰度；过滤低丰度表达后获得Unigenes；物种注释：使用NR_mate库对组装的Unigenes进行物种分类注释；功能预测：通过KEGG PATHWAY数据库进行基因功能注释，预测微生物的代谢途径和益生功能，以上分析在联川生物云平台（https：//www.omicstudio.cn/analysis）上完成。

2 结果

2.1 宏基因组测序及组装结果

获得大量清洁数据后，组装得到原始数据（Raw Data），其中Read 44584976、Base 6.69G，预处理后得到有效数据（Valid Data），其中，Read 43427098、Base 6.51G有效数据占原始数据的97.40%。有效数据中数据质量≥Q20的占比为99.79%，数据质量≥Q30的占比为98.62%，有效数据中数据GC含量值为38.50%。

随后进行TKGs宏基因组装，通常组装结果的

中国乳业线上阅读

优劣取决于组装后Contig数目，数目越少、N50越大、组装总长度越长，组装片段越完整，组装效果越好。本次TKGs宏基因组装后Contig数目为3 911、N50为37 809、最终获得23 980 123条unigenes，证明该组装片段完成度较高、组装的连续性较好。对其进行CDS预测，获得unigenes中基因的总长度为21.05 Mbp，平均长度为821.22 bp，预测unigenes中基因的整体GC含量值为44.14%。

2.2 微生物组成分析

利用DIAMOND软件将Unigenes与NR_meta库进行比对，并对结果进行物种分类。通过MEGAN软件结合NCBI物种分类系统，将物种分类信息与unigenes的丰度信息结合，可得到各个分类等级的丰度信息和序列各个分类等级的具体物种注释信息（图1）。使用Krona软件展示的样本物种组成以细菌为主，尤其是乳杆菌相关类群占主导地位，其中乳杆菌（*Lactobacillus*）占比突出。同时，样本中还包含少量病毒（0.9%）、真核生物（0.03%）和古菌（0.001%），以及其他门类和属的细菌。

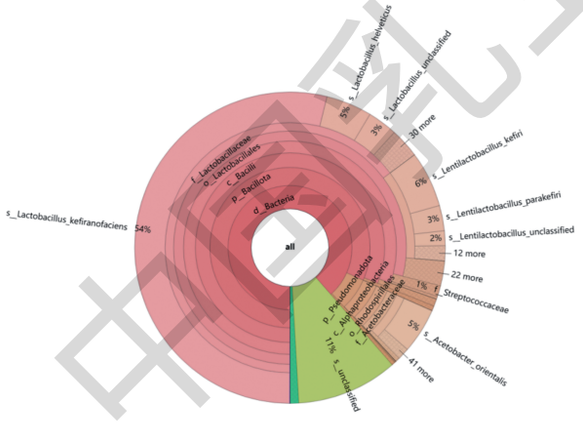


图 1 TKGs 物种注释结果可视化展示

2.2.1 主要物种及占比

开菲尔乳杆菌（*Lactobacillus kefiranofaciens*）占比54%，是绝对优势物种；而未分类假单胞菌门（*Pseudomonadota*）占比11%；开菲尔慢乳杆菌（*Lentilactobacillus kefiri*）占比6%；类开菲尔慢乳杆菌（*Lentilactobacillus parakefiri*）占比3%；未分类*Lentilactobacillus*（慢乳杆菌属未分类种）占比2%。

2.2.2 其他物种及占比

瑞士乳杆菌（*Lactobacillus helveticus*瑞士乳杆菌）占比3%；未分类乳杆菌属未分类种（*Lactobacillus*）占比3%；东方醋杆菌（*Acetobacter orientalis*）占比5%；链球菌科（*Streptococcaceae*）占比1%。

2.2.3 病毒和真菌物种及占比

（1）主要病毒占比总病毒结果：乳杆菌噬菌体Llun1（*Lactobacillus phage Llun1*）占比5%；霍乱弧菌噬菌体vB_VpaM_IME15（*Vibrio phage vB_VpaM_IME15*）占比4%；乳杆菌噬菌体P108（*Lactobacillus phage P108*）占比3%（图2）。

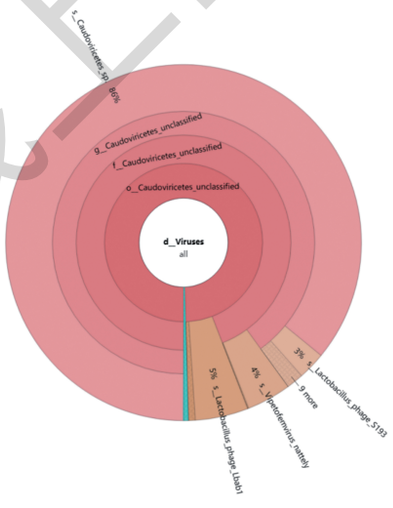


图 2 TKGs 病毒注释结果可视化展示

（2）主要真菌占比总真菌结果：小哈萨克斯坦酵母（*Kazachstania exigua*）占比68%，是真菌

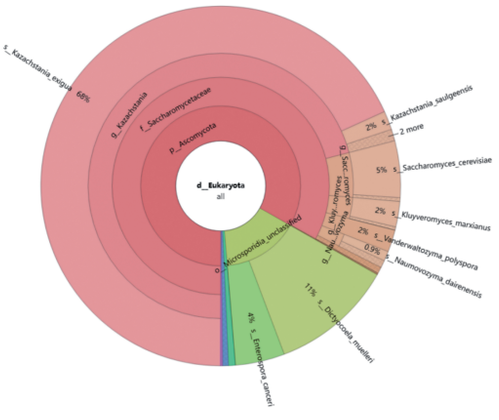


图 3 TKGs 真菌注释结果可视化展示

中国乳业线上阅读

组成的绝对优势物种；酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）占比5%；马克斯克鲁维酵母（*Kluyveromyces marxianus*）占比2%（图3）。

2.3 KEGG PATHWAY 数据库注释

KEGG PATHWAY数据库常用于序列的注释。利用DIAMOND软件将Unigenes与KEGG PATHWAY数据库的蛋白序列进行比对，取分值最高的KEGG比对结果序列的注释作为该Unigenes序列的注释。结合KEGG PATHWAY数据库的层次结构，得出KEGG PATHWAY各个层级或水平的信息（图4）。

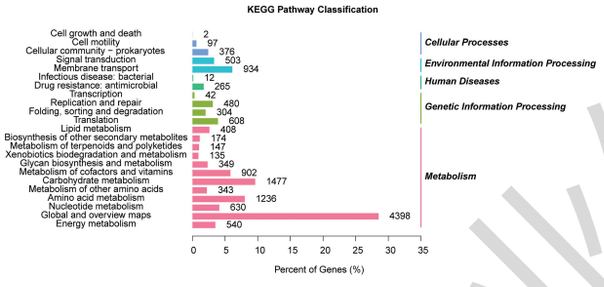


图 4 TKGs KEGG PATHWAY 数据库注释分类统计信息

2.3.1 代谢相关通路

本研究中TKGs在代谢相关通路方面基因占比普遍较高，显示样本代谢活动较活跃。其中，全局和概述图谱（Global and Overview Maps）通路的基因高达4 398 条unigenes，在所有通路类别中位居首位；碳水化合物代谢（Carbohydrate Metabolism）通路的基因为1 477 条unigenes；氨基酸代谢（Amino Acid Metabolism）通路的基因为1 236 条unigenes；此外，辅因子和维生素代谢（Metabolism of Cofactors and Vitamins）通路的基因为902 条unigenes；脂质代谢（Lipid Metabolism）通路的基因为408 条unigenes；核苷酸代谢（Nucleotide Metabolism）通路的基因为630 条unigenes。

2.3.2 环境信息处理相关通路

在环境信息处理方面，膜转运（Membrane Transport）和 信号转导（Signal Transduction）通路的基因分别为934 条和503 条unigenes，数值较高，证明样本细胞在与外界进行物质交换以及感知和传递外界信号方面的功能较突出。

2.3.3 人类疾病相关通路

在人类疾病相关通路中，细菌感染性疾病（Bacterial Infectious Disease）通路的基因仅为12 条unigenes，相对很低，这暗示样本中与细菌感染直接相关的基因表达较少；而抗微生物药物耐药性（Antimicrobial Drug Resistance）通路的基因为265 条unigenes，证明样本中的微生物可能具备一定抗药能力。

2.3.4 细胞过程相关通路

在细胞过程相关通路中，原核生物的细胞群体（Cellular Community-prokaryotes）通路的基因为376 条unigenes，表示样本中可能存在丰富的原核生物群体；细胞运动（Cell Motility）通路的基因为97 条unigenes；细胞生长与死亡（Cell Growth and Death）通路的基因仅为2 条unigenes，占比较低。

2.3.5 遗传信息处理相关通路

在遗传信息处理方面，翻译（Translation）通路的基因为608 条unigenes，证明样本中蛋白质合成过程较活跃，可能在合成大量的结构蛋白、酶或其他功能性蛋白质；复制与修复（Replication and Repair）通路的基因为480 条unigenes，证明样本细胞可能处于DNA复制活跃期；折叠、分类与降解（Folding，Sorting and Degradation）通路的基因为304 条unigenes，反映细胞对蛋白质质量控制的需求，确保合成蛋白质能正确折叠、定位和降解；转录（Transcription）通路的基因为42 条unigenes，相对较低。

2.4 CAZy 数据库注释

本研究通过CAZy数据库分析TKGs中碳水化合物活性酶（CAZymes）的基因组、结构和生化信息等。利用DIAMOND软件将unigenes与CAZy数据库的蛋白序列进行比对，取分值最高的CAZy比对结果

中国乳业线上阅读

序列的注释作为该unigenes序列的注释。

糖苷水解酶（GH）家族：unigenes数量接近2 000 条，是所有家族中数量最多的，证明TKGs具有较强的碳水化合物降解能力，在分解环境中的多糖类物质方面表现活跃；糖基转移酶（GT）家族：Unigenes数量接近2 000 条，与GH家族数量相当，证明TKGs在糖类物质合成与修饰方面的活动频繁，在构建细胞表面糖结构或合成储能多糖等过程中较活跃；碳水化合物结合模块（CBM）家族：unigenes数量约500 条，证明TKGs具备对碳水化合物的识别和结合能力，有助于更高效进行碳水化合物代谢相关过程；碳水化合物酯酶（CE）家族：unigenes数量介于200～500 条之间，可催化碳水化合物酯类水解，参与碳水化合物修饰和代谢，体现TKGs在处理碳水化合物酯类物质方面有一定基因基础，可参与碳水化合物的精细代谢调控；辅助活动（AA）家族酶参与多种与碳水化合物代谢相关的氧化还原等辅助反应：数量较少，在100条以下，证明这些辅助反应在TKGs整体碳水化合物代谢中占比较小；多糖裂解酶（PL）家族酶催化多糖的非水解性裂解反应：数量是所有家族中最少，几乎接近0，其极低的数量证明TKGs在通过裂解方式进行多糖代谢的能力很弱（图5）。

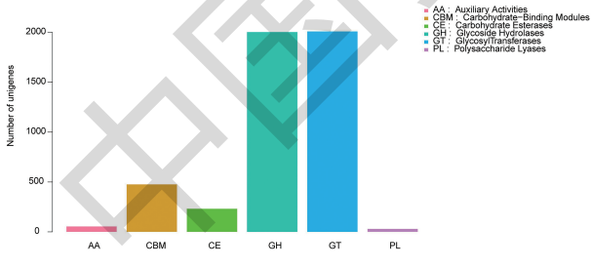


图 5 TKGs CAZy 数据库注释分类统计信息

2.5 eggNOG 数据库注释

eggNOG是直系同源基因数据库，可整合多个物种的蛋白质序列信息，并对其进行功能注释和分类。通过eggNOG可对宏基因组中的基因进行功能预测和分类，了解基因在不同生物过程和代谢途径中的作用（图6）。

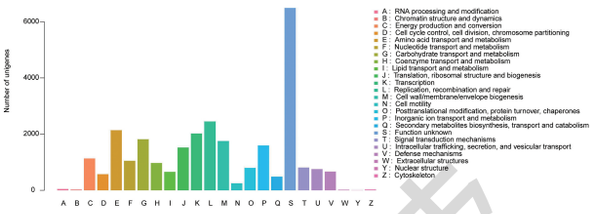


图 6 TKGs eggNOG 数据库注释分类统计信息

本研究中，功能未知（S）基因数量最多，超过6 000 条unigenes，表明TKGs中有大量基因的功能尚未明确，有待进一步研究和注释；翻译、核糖体结构与生物发生（J）相关基因数量约2 500 条unigenes，反映TKGs在蛋白质合成相关过程中较活跃；氨基酸转运与代谢（E）相关基因数量约2 200 条unigenes，证明TKGs对氨基酸的转运和代谢有较高需求；碳水化合物转运与代谢（G）相关基因数量约2 000 条unigenes，显示TKGs在碳水化合物的摄取、转运和代谢方面具有一定的基因表达基础，证明TKGs对能量获取的需求较高；转录（K）相关基因数量约1 800 条unigenes，意味着TKGs中有较多基因参与遗传信息从DNA到RNA的转录过程；复制、重组与修复（L）相关基因数量约1 600 条unigenes，显示TKGs维持基因组的稳定性和遗传信息的准确传递；辅酶转运与代谢（H）、脂质转运与代谢（I）等其他功能相关基因数量为1 000～1 500 条unigenes，它们分别参与辅酶、脂质等物质的转运和代谢过程，对维持细胞正常生理功能不可或缺；RNA加工与修饰（A）、染色质结构与动态变化（B）等功能相关基因数量较少，在1 000 条unigenes以下，说明这些功能在样本中的活跃程度相对较低，TKGs体系相对稳定。

3 讨论

本研究借助宏基因组测序技术，深度剖析一株TKGs的微生物组成及益生功能。从微生物组成来

中国乳业线上阅读

看，TKGs中细菌占主导地位，其中乳杆菌相关类群尤为突出，*Lactobacillus kefiranofaciens*占比高达54%。乳杆菌作为益生菌的典型代表，能调节肠道菌群平衡，抑制有害菌生长，增强肠道屏障功能[8, 9]，这与TKGs改善消化功能的益生特性高度契合[10]。少量病毒、真核生物和古菌虽占比微小，但它们在微生物群落的生态平衡中可能发挥着不可忽视的作用。例如，噬菌体（如*Lactobacillus phage Llun1*等）可通过感染细菌，调控细菌种群数量和基因水平转移，影响微生物群落的结构和功能[11]。在功能基因注释方面，本研究参照Zeng等[12]研究方法，选用KEGG PATHWAY、CAZy、eggNOG 3 个主流据库对TKGs进行全面分析。

KEGG PATHWAY分析揭示TKGs在代谢活动中极为活跃。代谢相关通路中，Global and Overview Maps通路基因数量极高（4 398 条unigenes），这表明TKGs的微生物群落参与广泛且复杂的代谢过程。其中，碳水化合物代谢（1 477 条unigenes）和氨基酸代谢（1 236 条unigenes）通路基因占比较大，说明其具备高效利用碳水化合物和氨基酸的能力。这不仅为微生物自身生长提供能量和物质基础，还可能产生有益代谢产物（如短链脂肪酸、维生素等），对人体健康产生积极影响。在环境信息处理方面，膜转运（934 条unigenes）和信号转导（503 条unigenes）通路基因占比高，反映微生物细胞能够积极与外界环境进行物质交换和信息传递，以适应环境变化，维持自身稳态。

CAZy数据库注释结果显示，GH家族和GT家族unigenes数量接近2 000 条，表明TKGs在碳水化合物降解与合成修饰方面能力强劲，这有助于其在发酵过程中分解复杂多糖，同时构建和修饰细胞表面糖结构，参与细胞识别、免疫调节等生理过程。CBM家族约500 条unigenes，体现对碳水化合物的识别和结合能力，可辅助碳水化合物代谢。而AA家族和PL家族数量较少，说明相关辅助反应和多糖裂解代谢在整体碳水化合物代谢中相对次要。

eggNOG数据库注释中，大量基因丰度参与翻译、氨基酸转运与代谢等功能类别，进一步辅助证明TKGs微生物群落的代谢活跃程度较高。而功能未知基因数量最多（超过6 000 条），这既是挑战也是机遇。一方面，大量未知功能基因限制了对TKGs微生物功能的全面理解；另一方面，也为后续挖掘TKGs新的生物活性和功能提供了研究方向[13, 14]。

4 展望

TKGs起源于白种索山脉，是我国西藏地区特有的一种开菲尔发酵菌[15]，本研究结果展示了TKGs与开菲尔发酵菌相似，都是一类由乳杆菌、酵母菌和醋酸菌组成的共生微生物混合物。在发酵过程中会产生酒精、乳酸、胞外多糖、生物活性肽、抗生素和大量细菌素[16]。研究表明，开菲尔发酵菌发酵产物具有抗菌、刺激免疫系统、抗氧化、抗高血压、抗癌、降胆固醇和降糖的益生作用[17~19]。本研究通过宏基因组测序技术，全面解析一株TKGs的微生物组成和益生功能。相较于其他研究微生物物种鉴定和组成的方法（如依赖培养的方法和非培养的方法，包括变性梯度凝胶电泳和16S rRNA测序等），运用该技术分析的优势在于其能够全面、无偏见地揭示微生物群落的多样性和功能特性，为深入理解TKGs的益生机制及开发利用其益生菌资源提供了重要依据。

基于本研究结果，未来工作可进一步探索TKGs中特定益生菌菌株的益生机制，通过体内外试验验证其益生功能[8, 20]。此外，可以研究不同发酵条件下微生物群落的变化，优化TKGs的发酵工艺，以提高其益生菌含量和益生功能[21, 22]。同时，利用宏基因组测序技术、代谢组学分析以及蛋白组学[23]，多组学联合分析深入揭示TKGs中微生物发酵过程中的代谢途径和相互作用，有助于在传统饮食中开发更多具有特定健康功能的发酵乳制品，为其在预防和治疗慢性代谢疾病方面的应用提供更广阔的前景。

参考文献

[1] Sun Y，Zhao H，Chang M，et al.Prophylactic effects of

中国乳业线上阅读

Tibetan goat kefir on depression-like behaviors in chronic unpredictable stress model through the gut-brain axis[J].Journal of the Science of Food and Agriculture，2025，105（1）：266-75.

[2] Aziz T，Xingyu H，Sarwar A，et al.Assessing the probiotic potential，antioxidant，and antibacterial activities of oat and soy milk fermented with Lactiplantibacillus plantarum strains isolated from Tibetan kefir[J].Frontiers in microbiology，2023，9（14）：1265188.

[3] Zhang J，Zhao X，Jiang Y，et al.Antioxidant status and gut microbiota change in an aging mouse model as influenced by exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum YW11 isolated from Tibetan kefir[J].Journal of Dairy Science，2017，100（8）：6025-41.

[4] Chen K，Yang J，Guo X，et al.Microflora structure and functional capacity in Tibetan kefir grains and selenium-enriched Tibetan kefir grains：A metagenomic analysis[J].Food Microbiol，2024，119：104454.

[5] Aydin S，Erözden A A，Tavşanlı，N，et al.Anthocyanin addition to kefir：Metagenomic analysis of microbial community structure[J].Current microbiology，2022，79（11）：327.

[6] Baars T，Van Esch B，Van Ooijen L，et al.Raw milk kefir：Microbiota，bioactive peptides，and immune modulation[J].Food & Function，2023，14（3）：1648-1661.

[7] Liu S，Lu S Y，Qureshi N，et al.Antibacterial property and metagenomic analysis of milk kefir[J].Probiotics and Antimicrobial Proteins，2022，14（6）：1170-1183.

[8] Zhao J，Wang Y，Wang J，et al.Lactobacillus kefiranofaciens ZW18 from Kefir enhances the anti-tumor effect of anti-programmed cell death 1（PD-1）immunotherapy by modulating the gut microbiota[J].Food & Function，2022，13（19）：10023-10033.

[9] Xing Z，Tang W，Yang Y，et al.Colonization and gut flora modulation of Lactobacillus kefiranofaciens ZW3 in the intestinal tract of mice[J].Probiotics and Antimicrobial Proteins，2018，10（2）：374-382.

[10] Peluzio M C G，Dias M M E，Martinez J A，et al.Kefir and intestinal microbiota modulation：Implications in human health[J].Frontiers in nutrition（Lausanne），2021，8：638740.

[11] Mahony J，Mcdonnell B，Casey E，et al.Phage-host interactions of cheese-making lactic acid bacteria[J].Annu Rev Food Sci Technol，2016，7（1）：267-285.

[12] Zeng X，Wang Y，Jia H，et al.Metagenomic analysis of microflora structure and functional capacity in probiotic Tibetan kefir grains[J].Food Research International，2022，151：110849.

[13] Gao J，Mao K，Wang X，et al.Tibet kefir milk regulated metabolic changes induced by high-fat diet via amino acids，bile acids，and equol metabolism in human-microbiota-associated rats[J]. Journal of Agriculturaland Food Chemistry，2021，69（23）：6720-6732.

[14] Mantegazza G，Dalla V A，Licata A，et al.Use of kefir-derived lactic acid bacteria for the preparation of a fermented soy drink with increased estrogenic activity[J].Food research international，2023，164：112322.

[15] Blasche S，Kim Y，Mars R A T，et al.Metabolic cooperation and spatiotemporal niche partitioning in a kefir microbial community[J].Nature microbiology，2021，6（2）：196-208.

[16] Rosa D D，Dias M M S，Grzeskowiak L M，et al.Milk kefir：Nutritional，microbiological and health benefits[J].Nutrition Research Reviews，2017，30（1）：82-96.

[17] Dimidi E，Cox S，Rossi M，et al.Fermented foods：Definitions and characteristics，impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease[J].Nutrients，2019，11（8）：1806.

[18] Mendes E，Casaro M ，Fukumori C，et al.Preventive oral kefir supplementation protects mice from ovariectomy-induced exacerbated allergic airway inflammation[J].Benef Microbes，2021，12（2）：187-197.

[19] Al-Mohammadi A R，Ibrahim R A，Moustafa A H，et al.Chemical constitution and antimicrobial activity of Kefir fermented beverage[J].Molecules（Basel，Switzerland），2021，26（9）：2635.

[20] Cui Y，Jing C，Yue Y，et al.Kefir ameliorates alcohol-induced liver injury through modulating gut microbiota and fecal bile acid profile in mice[J].Molecular nutrition & food research，2024，68（1）：e2300301-n/a.

[21] Alves E，Ntungwe E N，Gregorio J，et al.Characterization of Kefir produced in household conditions：Physicochemical and nutritional profile，and storage stability[J].Foods，2021，10（5）：1057.

[22] Mcgovern C J，Gonz á lez-Orozco B D，Jim é nez-Flores R.Evaluation of kefir grain microbiota，grain viability，and bioactivity from fermenting dairy processing by-products[J].Journal of Dairy Science，2024，107（7）：4259-4276.

[23] Santini G，Bonazza F，Pucciarelli S，et al.Proteomic characterization of kefir milk by two-dimensional electrophoresis followed by mass spectrometry[J].Journal of Mass Spectrometry，2020，55（11）：e4635.

中国乳业线上阅读

Research and Application of Metagenomic Sequencing Technology in Evaluating the Microbial Composition and Probiotic Functions of Tibetan Kefir Grains

YU Zhiwei[1]，LI Ben[2]，ZHOU Meiling[3]，YANG Ziqi[2]，LIN Guangyu[4]，YU Jin[1, 3*]

[1]Naqu People's Hospital，Naqu Tibet 852000

[2]Medical College of Jinzhou Medical University，Jinzhou Liaoning 121000

[3]Affiliated Stomatological Hospital of Jinzhou Medical University， Jinzhou Liaoning 121000

[4]Liaoning Agricultural Development Center，Shenyang Liaoning 110000

Abstract：[Objective]Tibetan kefir grains（TKGs），as a traditional fermented product with a long history in Tibet，China，hold a unique position in folk dietary culture.The aim of this study was to utilize metagenomic sequencing technology to analyze the microbial composition and probiotic functions of TKGs，providing a basis for their development and utilization.[Method]TKGs samples were collected from Linzhi，Tibet. After cultivation and DNA extraction，a metagenomic library was constructed by high-throughput sequencing，and bioinformatics analyses were performed using multiple databases.[Result]The sequencing data had high quality and the assembly was successful. Bacteria were the dominant microorganisms in TKGs，with the Lactobacillus group being predominant. Lactobacillus kefiranofaciens accounted for 54% of the total microorganisms，and there were also a small amounts of viruses，eukaryotes and archaea. Lactobacillus phage Llun1 accounted for 5% of the viruses，and Kazachstania exigua accounted for 68% of the fungi. Functional gene annotation revealed that the microbial strains exhibited vigorous metabolic activity，with 1477 genes related to carbohydrate metabolism pathways.The strains also demonstrated strong capabilities in environmental information processing，with 934 genes associated with membrane transport and 503 genes related to signal transduction pathways. While the proportion of genes related to bacterial infectious diseases was relatively low at 12，there were 265 genes associated with antimicrobial drug resistance.Annotations from the CAZy and eggNOG databases revealed that the strain had outstanding carbohydrate metabolism capabilities and overall high metabolic activity.[Conclusion]Metagenomic sequencing had revealed the microbial composition and probiotic functions of TKGs.This study not only emphasized the potential value of TKGs as a natural source of probiotics but also provided a scientific basis for the development and utilization of their probiotic functions.

Keywords：Tibetan kefir grains（TKGs）；metagenomic sequencing；microbial composition；probiotic function

中国乳业线上阅读