

文章编号:1671-9352(2008)07-0018-05

# 新疆酸奶子中乳酸菌多样性分析

赵蕊, 霍贵成\*

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**从15份采自新疆伊犁牧民家庭传统方法制作的酸奶子中分离出71株乳酸菌,并进行了生理生化表型特征鉴定。对其中的28株菌测定了16S rRNA基因全序列,构建系统发生树,结合生理生化结果,鉴定结果为,该酸奶子中乳酸菌涉及5个属、11个种及亚种,有些菌株对生长温度适应性较强。乳杆菌为新疆酸奶子中的优势菌属,以瑞士乳杆菌(*Lb. helveticus*)为最优势。

**关键词:**传统乳制品;乳酸菌;多样性

**中图分类号:**TS252.56;Q93-331 **文献标志码:**A

## Diversity of lactic acid bacteria isolated in sour milk from Xinjiang

ZHAO Rui, HUO Gui-cheng\*

(Key laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Seventy one lactic acid bacterial strains were isolated from 15 samples of naturally fermented sour milk collected from the farmyards in Xinjiang. They were identified by physiological and biochemical tests, 28 of them were further analyzed by sequencing their 16S rRNA genes. Based on constructing phylogenetic neighbor-joining trees, the results in combination with traditional taxonomic methods based on phenotypic characteristics showed that the lactic acid bacteria in traditional dairy products covered 5 genera and 11 species or subspecies. *Lactobacillus* was the predominant genus, of which *Lb. helveticus* was the most predominant strain. Some strains could adapt to a wide temperature range.

**Key words:** traditional fermented dairy product; lactic acid bacteria; biodiversity

## 0 引言

在中国及东南亚地区的传统发酵食品中,蕴藏着大量未知微生物,是探索有用微生物菌种的绝好宝库。中国新疆地区哈萨克族和蒙古族等少数民族自古以来就有制作和食用发酵乳制品的习惯。他们以牛乳、水牛乳、羊乳、牦牛乳、马乳、骆驼乳等作为原料,采用传统的制作工艺制成各种传统乳制品,如奶皮子、稀奶油、酸奶子、奶豆腐、奶干、奶酒、奶疙瘩、马奶酒和黄油等<sup>[1,2]</sup>。传统的乳制品制作有着明显的地域性以及户籍性,从而做成的乳制品有着浓厚的地区特色和风味。经过几千年的驯化,这

些传统乳制品中保留了许多赋予乳制品独特风味的乳酸菌,为发酵乳制品菌种的分离筛选以及研究开发提供了宝贵的资源<sup>[3]</sup>。我国学者曾研究了内蒙古、新疆、云南、西藏、青海等地区的传统乳制品,产品类型涉及到乳饼、乳扇、酸马奶、开菲尔粒、发酵山羊乳、发酵骆驼乳等<sup>[3-8]</sup>,并从中分离得到许多有优良特性的菌株。这些研究中针对内蒙古传统乳制品居多。

酸奶子(酸奶)是蒙古族、达斡尔族等少数民族最常用的一种乳制品,是鲜奶经自然发酵制成,乳发酵变酸,其中酪蛋白遇酸凝固,即成酸奶。口感清酸爽口,开胃增食,是农牧民野外、农耕、放牧的理想食品,并且是制作奶干、奶豆腐的原料<sup>[2]</sup>。

收稿日期:2008-04-25

基金项目:国家“863计划”资助项目(2006AA10Z344)

作者简介:赵蕊(1982-),女,博士研究生,从事乳品微生物的研究。

\*通讯作者:霍贵成(1958-),男,教授,博士生导师,研究方向为乳品加工与食品微生物。Email:gchuo58@126.com

新疆地区少数民族牧民制作的酸奶子历史悠久、经验丰富,酸奶子自然发酵过程中形成的微生物类群受多种因素影响,使用传统方法在长期自然选择保留下来的发酵菌种,利于进行微生物多样性分析<sup>[5]</sup>。本试验在进行了大量生理生化试验的基础上,选取代表菌株进行 16S rRNA 基因序列分析,并将两种方法的结果结合,对菌株进行较为全面、准确的鉴定。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

15 份酸奶子均采集自新疆维吾尔自治区伊犁巩留地区用传统工艺制造酸奶子的牧民家庭。采集酸奶子装于灭菌的离心管内,封严后放入冰盒。空运至实验室, -20 °C 保存至使用。

#### 1.1.2 标准株来源

嗜酸乳杆菌 ATCC4356 (*Lactobacillus acidophilus*), 乳酸乳球菌乳酸亚种 ATCC19435 (*Lactococcus lactis subsp. lactis*), 均购自中科院微生物研究所菌种保藏中心。

### 1.2 仪器设备

光学显微镜(OLMPUS), PCR 仪(bioer)、凝胶成像系统(UVP)。

### 1.3 各种培养基与试剂

乳酸菌富集用加富的脱脂乳培养基(10%脱脂乳、0.5%蛋白胨、0.25%酵母粉、1%葡萄糖);分离培养采用 MRS 培养基(分离乳酸菌)和 M17 培养基(分离乳酸球菌)<sup>[9]</sup>。做生理生化试验所用的培养基均按照文献<sup>[10]</sup>的方法配制。H<sub>2</sub>S 生成试验、各种糖发酵试验的培养基均为浙江杭州天和微生物试剂有限公司生产的细菌微量生化反应管。

### 1.4 乳酸菌的分离与纯化

取一定量的样品,用加富的脱脂乳培养基活化 2 代后,划平板,37 °C 培养 24~48 h。分离明串珠球菌时用的是 MRS 培养基(pH 6.2),在 25 °C 培养 24~48 h。记录菌落形态,挑特征性的菌落,继续划平板,至确定为纯菌。同时做革兰氏染色和过氧化氢酶试验,将革兰氏阳性,过氧化氢酶阴性的菌暂定为乳酸菌。将纯化后的菌株进行斜面保存、甘油法低温冻存和冻干保存。

### 1.5 乳酸菌的生理生化鉴定

参考文献<sup>[4,5,10-12]</sup>,将革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性的菌株暂定为乳酸菌。将硝酸盐还原试

验、H<sub>2</sub>S 产生试验、明胶液化试验、吲哚试验结果均为阴性的杆菌鉴定为乳杆菌属。鉴定乳酸乳球菌,需要做硝酸盐还原试验、6.5% NaCl 生长试验、4% NaCl 生长试验、葡萄糖产气试验、10 °C 和 45 °C 生长试验,进而区分肠球菌属、链球菌属、乳球菌属和明串珠球菌属,再分别进行糖发酵试验。

### 1.6 16S rRNA 基因序列分析

#### 1.6.1 DNA 的提取

用 Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit 试剂盒提取乳酸菌的染色体 DNA,按说明书操作。

#### 1.6.2 16S rRNA 基因序列的测定

参照文献<sup>[13]</sup>,PCR 扩增的引物为 16SF(5'-AGAGTTTGAT CCTGGCT CAG-3')和 16SR(5'-CTACG-GCTAC CTTGTTACGA-3')。PCR 反应体系如下:dNTP 400 μmol/L, 10 × PCR buffer(含 Mg<sup>2+</sup>) 5 μL,引物各 1 μmol/L, Taq 酶(TaKaRa) 0.5 U,模板 DNA 2 μL,去离子水补足至 50 μL。

PCR 扩增条件:94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min(30 个循环), 72 °C 延伸 10 min。

将 PCR 产物送至上海生工测序。

#### 1.6.3 同源性分析

将测序所得序列及 GeneBank 中获得的参比菌株的 16S rRNA 基因序列经 ClustalX 序列比对后,采用 MEGA4 中的邻接法(Neighbour-joining)进行系统发育树的构建,自展值(bootstrap)为 1 000。

## 2 结果

### 2.1 乳酸菌生理生化鉴定结果

从 15 份酸奶子中共分离鉴定了 71 株乳酸菌,包括 32 株球菌和 39 株杆菌。按照 1.5 所述的方法和项目进行鉴定,发现杆菌都为乳杆菌属(*Lactobacillus*),球菌涉及肠球菌属(*Enterococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)和明串珠菌属(*Leuconostoc*)。其生理生化鉴定结果列在表 1 中。

### 2.2 16S rRNA 基因序列分析

选取各类群的代表菌株和生理生化鉴定中没鉴定到具体菌种的菌株共 28 株,提取其基因组 DNA,扩增其 16S rRNA 基因序列,进行测序。将 16S rRNA 基因序列在 GeneBank 中进行同源序列搜索,发现各受试菌株与标准菌株的同源性都在 99% 以上。

为显示供试菌株与已知菌种之间的亲缘关系及其系统地位,按照 1.2.5 的方法进行同源性分析,结果见图 1。

表1 分离自新疆酸奶子中的乳酸菌的生理特性

Table 1 Physiological characteristics of the lactic acid bacteria isolated from fermented dairy products collected in Xinjiang

项目	乳杆菌菌群			项目	球菌菌群			
	瑞士乳杆菌	发酵乳杆菌	植物乳杆菌		肠球菌	链球菌	乳球菌	明串珠菌
硝酸盐还原	0/26	0/10	0/3	硝酸盐还原	0/7	0/10	0/2	0/13
明胶液化	0/26	0/10	0/3	明胶液化	0/7	0/10	0/2	0/13
生成吡啶	0/26	0/10	0/3	6.5% NaCl 下生长	7/7	0/10	0/2	0/13
H <sub>2</sub> S 的产生	0/26	0/10	0/3	4% NaCl 下生长	7/7	2/2	13/13	
运动性	0/26	0/10	0/3	运动性	0/7	0/10	0/2	0/13
45 °C 下生长	1/26	10/10	3/3	45 °C 下生长	7/7	10/10	0/2	0/13
15 °C 下生长	0/26	8/10	3/3	10 °C 下生长	7/7	0/10	2/2	13/13
葡萄糖产气	0/26	10/10	0/3	葡萄糖产气	0/7	0/10	0/2	13/13
苦杏仁苷	0/26	0/10	3/3	阿拉伯糖	0/7			0/13
阿拉伯糖	0/26	1/10	0/3	纤维二糖				0/13
纤维二糖	0/26	0/10	3/3	七叶灵		2/10		1/13
七叶灵	0/26	0/10	3/3	果糖				10/13
果糖	26/26	9/10	3/3	半乳糖			2/2	13/13
半乳糖	26/26	10/10	3/3	葡萄糖酸盐	0/7			
葡萄糖	26/26	10/10	3/3	乳糖		10/10		13/13
葡萄糖酸盐	0/26	6/10	1/3	麦芽糖				13/13
乳糖	26/26	10/10	3/3	甘露醇	0/7	0/10	2/2	1/13
麦芽糖	18/26	10/10	3/3	甘露糖			2/2	10/13
甘露醇	0/26	0/10	3/3	松三糖	0/7		0/2	
甘露糖	26/26	3/10	3/3	蜜二糖	3/7		0/2	4/13
松三糖	0/26	0/10	3/3	棉籽糖	0/7	4/10	0/2	5/10
蜜二糖	0/26	8/10	3/3	鼠李糖	0/7			
棉籽糖	0/26	8/10	3/3	核糖		1/10	2/2	5/13
鼠李糖	0/26	0/10	0/3	水杨苷		2/10		2/13
核糖	1/26	10/10	3/3	山梨醇	0/7	0/10		
水杨苷	0/26	0/10	3/3	蔗糖	1/7			13/13
山梨醇	0/26	0/10	2/3	海藻糖		1/10		6/13
蔗糖	0/26	10/10	3/3	木糖	0/7			6/13
海藻糖	1/26	4/10	3/3	甘油	6/7			
木糖	0/26	4/10	0/3	40%胆汁生长			2/2	
石蕊牛奶凝固	26/26	10/10	3/3	pH9.6 下生长		0/10	0/2	
所占比例(%)	36.62	14.08	4.23	所占比例(%)	9.86	14.08	2.82	18.31

注：“-/-”是指阳性菌株数目/受试菌株总数；球菌碳水化合物发酵项目较少，空格表示没有测定。

### 2.3 分离菌株的综合鉴定结果

总体来说,16S rRNA 基因序列鉴定结果能较好地与生理生化结果相吻合。26 株生理生化鉴定为 *Lb. helveticus* 的菌株,经 16S rRNA 基因序列分析结果再次得到证实;10 株 *Lb. fermentum* 中,有 4 株生理生化鉴定结果与标准菌株完全相符,另有 6 株菌结果与 *Lb. fermentum* 相近,个别项目不符,且这 6 株菌的 16S rRNA 序列分析结果都为 *Lb. fermentum*, 同源性都在 99% 以上,综合鉴定这 10 株菌均为 *Lb. fermentum*;生理生化鉴定结果为 *Lb. plantarum* 的 3 株菌都可以在 45 °C 条件下生长,这点与 *Lb. plantarum* 的模式株不符,有 1 株菌的糖发酵结果与 *Lb. plantarum* 模式菌株完全相符,另 2 株菌各有 1 种糖

发酵结果与模式菌株不一致。16S rRNA 基因测序结果表明这 3 株菌与 *Lb. plantarum* 和 *Lb. pentosus* 同源性都在 99% 以上,但与 *Lb. pentosus* 更接近,而 3 株菌的糖发酵结果与 *Lb. pentosus* 模式株有 2~4 项不一致。综合看来,这 3 株菌仍属于 *Lb. plantarum*。

将乳酸球菌鉴定到属,两种鉴定方法得到的结果一致。肠球菌属,包括 4 株 *E. durans*,另有 3 株肠球菌两种鉴定方法都不能区分其为 *E. durans* 或 *E. hirae*;链球菌属中,8 株为 *S. thermophilus*, 2 株为 *S. bovis*,生理生化鉴定结果与 16S rRNA 基因测序鉴定结果完全吻合;乳球菌属的 2 个菌株均为乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lc. lactis subsp. lactis*),生理生化

鉴定结果与 16S rRNA 基因测序鉴定结果完全一致。

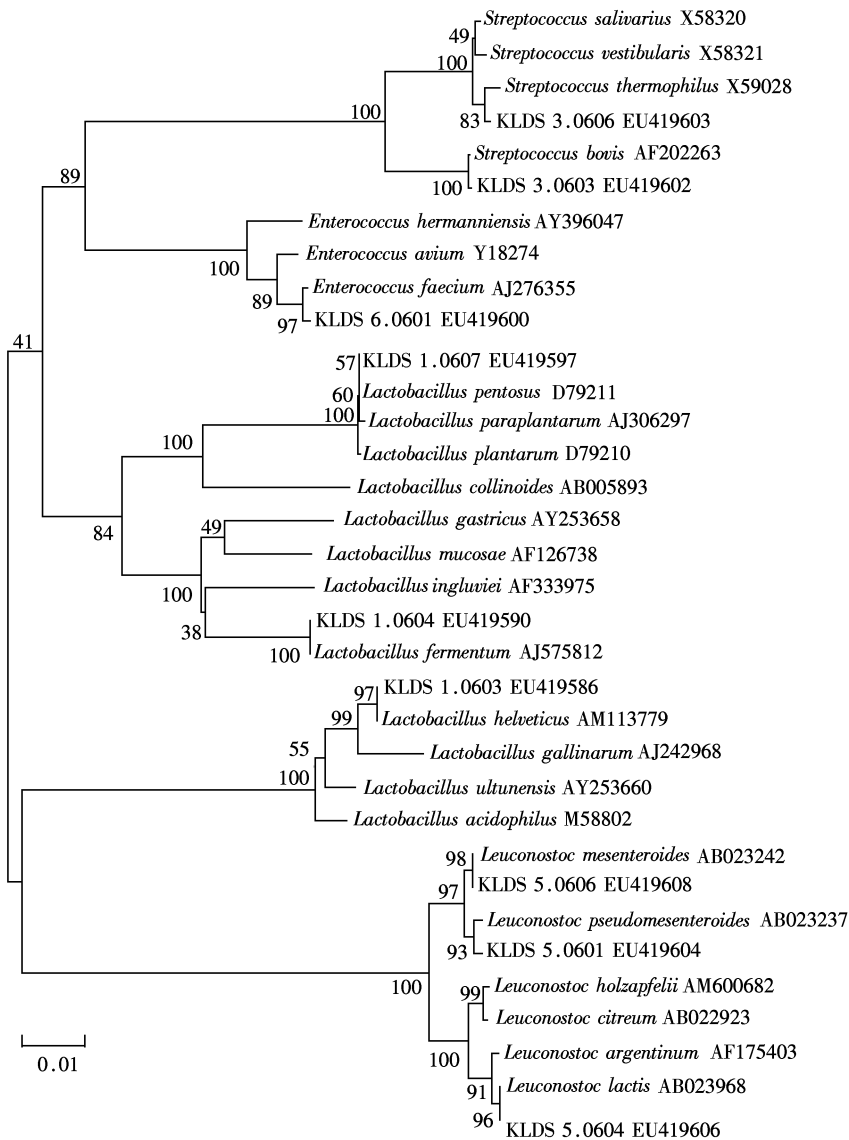


图1 根据 16S rRNA 基因序列绘制的系统树

Fig.1 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene alignment. Bar, 0.01 sequence divergence

明串珠菌属内多个种之间碳水化合物发酵特征十分相似,单纯依据生理生化指标,很难鉴定到种。13株明串珠菌中,有7株菌用两种鉴定方法得到同样的结果,包括:3株假肠膜明串珠菌葡聚糖亚种(*Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*),3株乳明串珠菌(*Ln. lactis*),1株假肠膜明串珠菌(*Ln. pseudomesenteroides*)。余下的6株明串珠菌都是生理生化鉴定结果不能与某一具体菌种完全相符:1株难以区分为阿根廷明串珠菌(*Ln. argentinum*)或乳明串珠菌(各有1项不符),2株不能区分其为假肠膜明串珠菌或肠膜明串珠菌(各有1项鉴定项目不符),另有3株不能区分其为假肠膜明串珠菌或是阿根廷明串珠菌(分别有2项和1项鉴定结果不符)。对这些菌做进一步的16S rRNA基因序列分析表明,生理生化

鉴定中怀疑是阿根廷明串珠菌的菌株,其16S rRNA序列与乳明串珠菌更接近,因此将其鉴定为乳明串珠菌;其余的5株16S rRNA序列与假肠膜明串珠菌更为接近,因此将其鉴定为假肠膜明串珠菌。

### 3 讨论

#### 3.1 鉴定的方法与可靠性

生理生化鉴定结果本身具有不确定性,加之有些菌种生理生化性质相近,单纯用传统的表型分类及糖发酵实验难以区分,还必须依靠分子鉴定手段,一般来说菌株间的16S rRNA相似性>97%,可能属于同一个种;16S rRNA基因相似性高达99%以上,可能属于同一亚种。因此,将生理生化鉴定与16S

rRNA 基因测序的结果结合起来,才能够较准确地做出鉴定。

当几种菌亲缘关系很近时(如一个种的亚种之间或同一菌群内的不同菌种间),生理生化指标,与 16S rRNA 分子鉴定结果不一致时,有必要进行细胞全蛋白的 SDS-PAGE 和 AP-PCR 等分子手段的分析<sup>[14]</sup>。

### 3.2 生长温度的问题

根据文献[10,11]发酵乳杆菌在 15℃ 不生长,但试验的结果却是 10 株发酵乳杆菌中有 8 株可以在 15℃ 生长。与此类似,植物乳杆菌在 45℃ 不应该生长<sup>[11,12]</sup>,但试验结果却是 3 株植物乳杆菌都可以在 45℃ 生长。这可能与分离菌株的适应能力增强有关。由于牧民家庭制作的乳及乳制品往往存放在自然环境中,温差变化大,菌株经过长期的适应,形成了这种在广泛温度范围内生长的特性<sup>[15]</sup>。

### 3.3 酸奶子中乳酸菌多样性的分析

分菌时根据菌落、菌体形态从同一样品中分出许多不同的菌株,生理生化鉴定发现这些“不同”的菌都归于同种菌,但彼此间生理生化特性可能略有差异。它们可能是同一样品中不同的菌株,也可能是同一菌株对某些碳水化合物利用结果的不确定性造成的。传统发酵乳制品常常是混合菌株发酵,这对抵御噬菌体的污染也起到重要的作用,因此有必要研究、开发这些菌株,制成多菌株的混合发酵剂。

采自新疆伊犁的 15 份酸奶子中,只有 2 个样品(2 006,2 016)没有分离到乳杆菌,而且在分离这 2 个样品时都曾分离到肠道菌;有 3 个样品(2 017,2 019,2 028)中没有分离到乳酸球菌,但只有 2 017 曾分离出非乳酸菌;另有 10 个既分离出乳杆菌,又分离出乳酸球菌的样品,只有 2 个样品(2 015,2 020,2 021)从中分离到非乳酸菌,说明乳杆菌对肠道菌有一定的抑制作用。对于没有分离出球菌的样品,可能因为球菌的耐酸性能不如杆菌。由于采集的样品有些已经发酵了几天,pH 值已经降到很低,这对于乳酸球菌的生长存活很不利,造成菌体的死亡或活性下降,因此当分离时不能有效地分离出来。

分离鉴定的 71 株乳酸菌,涉及到乳品中常见也是发酵工业上常用的乳酸菌。乳杆菌属中,尽管只分离鉴定出 3 种乳杆菌,但它们分别代表了专性同型发酵、兼性异型发酵或专性异型发酵 3 种发酵类群,且都能发酵乳糖。培养法得到的结果表明,瑞士乳杆菌为酸奶子中的优势菌,在酸奶子的发酵中起重要作用。发酵乳杆菌,尤其是植物乳杆菌能够利用松三糖、蜜二糖、棉籽糖、纤维二糖这些人体难以利用的寡糖。

乳酸球菌中,明串珠菌分离株无论在种类还是在数量上都占优势,可能正是它们赋予了酸奶子优良的风味和质地。

分离鉴定的乳球菌菌株无论是种类还是数量都很少,这可能与酸奶子较低的 pH 值有关,致使乳球菌生长受到抑制,活性也不高,不能在分离培养基中很好的生长。

链球菌中,除了有在乳品中常见的嗜热链球菌,还分离到牛链球菌,该菌有一定的致病性,说明传统乳制品含有一些不良因素,在今后的开发利用中要扬长避短。

孟和毕力格、张和平等人曾研究了新疆酸马奶中乳酸菌的多样性<sup>[4]</sup>,发现 *Lb. helveticus* 为优势菌种,并且也分离到 *Lb. plantrum* 和 *Lb. fermentum*,这点与本试验的结果相同。

### 3.4 研究方法的局限性及改进的方向

我国现有的对传统乳制品中微生物的多样性分析都是采用传统的培养法(culture-dependent),然而许多情况下某些细菌由于其活力不够或不可在分离培养基中生长,不能被有效地分离,造成对环境微生物多样性的低估<sup>[16]</sup>。宜同时采用无需培养(culture-independent)的分子生物学的方法,如 PCR-DGGE 法,直接从样品中抽提 DNA,PCR 扩增,再进行 DGGE 分析,或是与已知的参照株比较,或是回收序列进行测序,就可以知道样品中含有的微生物,如此可以更真实地还原这些乳制品中微生物的多样性。

致谢:感谢师守信老师在生理生化鉴定过程中给予的指导和帮助,感谢谷春涛老师在 16S rRNA 基因分析及构建系统发生树方面给予的指导和帮助。

### 参考文献:

- [1] 乌尼,敖敦格日勒,张爱荣,等. 内蒙古牧区民族乳制品的种类及制造工艺[J]. 内蒙古农牧学院学报,1996,17(1):63-67.
- [2] 刘计民. 内蒙古传统风味民族乳食品简介[J]. 中国乳品工业,1993,21(5):237-240.
- [3] 孙天松,刘红霞,倪慧娟,等. 传统发酵酸乳中乳酸菌的分离及鉴定[J]. 中国乳品工业,2006,36(9):4-7.
- [4] 孙天松,王俊国,张列兵,等. 中国新疆地区酸马奶中乳酸菌生物多样性研究[J]. 微生物学通报,2007,34(3):451-454.
- [5] 倪慧娟,包秋华,孙天松,等. 新疆地区酸马奶中酵母菌的鉴定及其生物多样性分析[J]. 微生物学报,2007,47(4):578-582.
- [6] 国立东,王欣,杜鹏,等. 传统乳制品中乳酸菌的分离及性能研究[J]. 食品科学 2006,27(03): 60-64.

(上接第22页)

- [7] 张以芳,舒相华,刘旭川,等. 乳扇制品中乳杆菌分离鉴定及其发酵性能试验[J]. 中国奶牛,2000,(2):22-23.
- [8] 张文羿,徐杰,云月英,等. 青海省海西地区传统发酵山羊乳中乳酸菌的分离及鉴定[J]. 中国乳品工业,2006,34(11):4-8.
- [9] ERCOLINI D, MAURIELLO G, BLAIOTTA G, et al. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004(96):263-270.
- [10] 凌代文主编. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 第1版. 北京:中国轻工业出版社,1999:1-129.
- [11] 布坎南 R E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第8版. 北京:科学出版社,1984.
- [12] GIOVANNA E Felis, FRANCO Dellaglio. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria[J]. Curr Issues Intestinal Microbiol, 2005, 8:44-61.
- [13] MAURO S, DIEGO M, SILVIA C, et al. Development of genus/species-specific PCR analysis for identification of *Carnobacterium strains*[J]. Curr Microbiol, 2002, 45:24-29.
- [14] DEVRIESE L A, VANCANNEYT M, DESCHEEMAER P, et al. Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002(92):821-827.
- [15] 李少英,乌尼,李培锋,等. 内蒙古牧区乳与乳制品中乳酸菌资源及其生态分布[J]. 生态学杂志,2006,25(12):1495-1499.
- [16] KALLIOPI Rantsiou, ROSALINDA Urso, LUCILLA Iacumin, et al. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4):1977-1986.

(编辑:于善清)