

中国新疆地区酸马奶中乳酸菌生物多样性研究*

孙天松¹ 王俊国^{1,2} 张列兵³ 孟和毕力格^{1,2} 张和平^{1,2**}

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院 呼和浩特 010018)

(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)

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要 研究了新疆地区传统发酵酸马奶中乳酸菌的生物多样性。从30份酸马奶中分离出152株乳杆菌,采用传统分类鉴定方法对其进行鉴定。结果表明,新疆地区酸马奶中的主要乳酸菌为 *Lactobacillus*(*L.*)*helveticus*(占总分离株的51.3%)其次为 *L. acidophilus*(18.4%)和 *L. casei* subsp. *pseudopiantarum*(8.6%),此外,*L. gasseri*、*L. casei* subsp. *casei*、*L. curvatus*、*L. sanfrancisco*、*L. coryniformis* subsp. *coryniformis*、*L. brevis*、*L. plantrum*、*L. homohiechill*、*L. fermentum*、*L. dellbrueckii* subsp. *bulgaricu*、*L. ruminis*、*L. crispatus*、*L. farciminis* 及 *L. hilgardii* 等乳杆菌在酸马奶中也有出现,但其数量较少(1~4株),还有8株乳杆菌按目前的鉴定方法无法准确判断其归属。*L. helveticus* 和 *L. acidophilu* 存在于所有的酸马奶样品中,*L. helveticus* 为优势菌。

关键词 酸马奶,乳酸菌,生物多样性

中图分类号:TS252.54 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0451-04

The Biodiversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Koumiss-A Traditional Fermented Mare Milk Product in Xinjiang of China*

SUN Tian-Song¹ WANG Jun-Guo^{1,2} ZHANG Lie-Bing³ MENGHE-Bilige^{1,2} ZHANG He-Ping^{1,2**}

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University Huhhot 010018)

(Key Lab of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education in Inner Mongolia Agricultural University Huhhot 010018)

Abstract The biodiversity of lactic acid bacteria (LAB) involved in production of koumiss, a traditional fermented mare milk product in Xinjiang of China, were studied. A total of 152 LAB strains were isolated from 30 home-made koumiss samples and identified using standard conventional identification methods. The predominant strains proved to be *Lactobacillus*(*L.*)*helveticus*(51.3% of the total isolates), *L. acidophilus*(18.4%) and *L. casei* subsp. *pseudopiantarum*(8.6%), while strains of *L. gasseri*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. curvatus*, *L. sanfrancisco*, *L. coryniformis* subsp. *coryniformis*, *L. brevis*, *L. ruminis*, *L. plantrum*, *L. homohiechill*, *L. fermentum*, *L. dellbrueckii* subsp. *bulgaricu*, *L. crispatus*, *L. farciminis* and *L. hilgardii* were also present in lower numbers(1~4strains). 8 strains of the isolates can't be identified according to present methods. The results obtained showed *L. helveticus* and *L. acidophilus* were present in all koumiss samples and *L. helveticus* was the predominant strain.

Key words Koumiss, Lactic Acid Bacteria, Biodiversity

酸马奶(Koumiss)是以新鲜马奶为原料,经乳酸菌和酵母菌等微生物共同自然发酵形成的酸性低酒精含量乳饮料,主要在东欧和中亚地区、东南俄罗斯、蒙古国以及中国的内蒙古、新疆等区域制作

和饮用。前苏联和蒙古及中国内蒙古常用酸马奶来治疗肺结核、心血管疾病、消化系统疾病、神经性疾病、贫血及糖尿病^[1,2]。现代医学也证实了酸马奶具有降血脂、降血压^[1]、抑制结核菌生长^[2,3]、治疗

* 国家自然科学基金项目(No.30660135, No.30671483);
国家高技术研究发展计划(863计划)(No.2006AA10Z345);
教育部春晖计划项目(No.Z2004-2-15009);
其他作者:徐杰^{1,2} 云月英^{1,2}

** 通讯作者 Tel:0471-4319940 E-mail:hepingdd@vip.sina.com
收稿日期:2006-07-17,修回日期:2006-08-24

便秘、黄褐斑^[4,5]等疗效。目前在俄罗斯、蒙古国和内蒙古等国家和地区均设有“酸马奶医疗中心”,专门治疗肺结核等慢性消耗性疾病。

中国新疆地区哈萨克族和蒙古族牧民家庭自古以来就有制作和食用酸马奶的习惯,至今还保留着传统制作方法,经过几千年的自然驯化,这些酸马奶中保留了许多具有优良特性的乳酸菌,为乳酸菌的研究开发提供了宝贵的资源。本文主要对新疆地区酸马奶中乳酸菌的生物多样性进行研究,以探明该地区酸马奶中乳酸菌的种类和特点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:30份传统发酵酸马奶样品采集自新疆哈萨克族和蒙古族牧民家庭,其中从伊犁哈萨克族自治州乌苏市巴音沟卡(代号B)采集样品4份、尼勒克县唐布拉牧场(C)8份、博尔塔拉蒙古自治州赛里木湖牧场(D)5份、伊犁哈萨克族自治州新源县那拉提高山草原(E)7份、巴半日高勒蒙古自治州巴音布鲁克(F)6份。

1.1.2 参考菌株:*Lactobacillus acidophilus* ATCC4356、*L. helveticus* ATCC12278和*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供。

1.1.3 培养基与试剂:MRS、BL、TPY培养基及其它生理生化试验和糖类发酵试验用培养基参照文献[7]和[8]配制。乳酸旋光性试剂盒由德国Boehringer Mannheim株式会社生产。二氨基庚二酸(Diaminopimelic acid, DAP)购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的分离及纯化:将酸马奶样品划线接种于含有放线菌酮和硫酸粘菌素的BL琼脂平板上,30℃厌氧培养48h~72h,挑取单菌落转接于TPY培养液中培养24h~48h,再次划线接种于BL琼脂培养基培养24h~48h,进行革兰氏染色和过氧化氢酶试验。将革兰氏染色阳性、过氧化氢酶试验阴性菌暂定为乳酸菌,穿刺接种于MRS半固体培养基,37℃培养后4℃保存于备用。

1.2.2 乳酸菌的鉴定:乳酸菌的生理生化试验、糖发酵试验参考文献[7]和[8],乳酸旋光性测定采用试剂盒,细胞壁中DAP测定参考文献[7]。

2 结果与分析

从30份酸马奶中共分离到152株革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性的杆状乳杆菌属细菌,进一步对其进行生理生化试验和糖发酵试验,结果见表1。

参照《乳酸菌实验手册》^[8]和《伯杰氏系统细菌学手册》^[9],经检索除类群18中的8株乳杆菌无法从文献中找到与其特征描述相一致的菌株名称外,其余144株乳杆菌可归到17个类群中,其中*L. helveticus* 78株,*L. acidophilus* 28株,*L. casei* subsp. *pseudoplantarum* 13株,*L. gasseri*和*L. casei* subsp. *casei*各4株,*L. curvatus*和*L. sanfrancisco*各3株,*L. coryniformis* subsp. *coryniformis* 2株,*L. brevis*、*L. plantarum*、*L. homohiechill*、*L. fermentum*、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*L. ruminis*、*L. crispatus*、*L. farciminis*及*L. hilgardii*各1株。

新疆不同地区酸马奶中乳杆菌的数量及其鉴定结果如表2所示。

从B、C、D、E和F5个不同采样点的酸马奶中分别分离到6、8、4、8和5个类群的乳酸菌,所有样品中均有*L. helveticus*和*L. acidophilus*,以*L. helveticus*(占总分离株的51.3%)为优势菌,其次为*L. acidophilus*(18.4%),其中从B、C、D采样点分离到的*L. helveticus*分别占该地区总分离株的57%、60%和75%。E、F采样点的*L. helveticus*分别占该地区总分离株的23%和40%,且*L. acidophilus*与*L. helveticus*的数量大致相同。除F采样点外,其它采样点酸马奶中均有*L. casei* subsp. *pseudoplantarum*,且其数量与*L. acidophilus*接近。其它类群的乳酸菌尽管多达14种,但数量较少,一般只有1~4株,并且不同采样点之间菌群的种类有较大差异。

孟和毕力格等^[10]的研究表明,蒙古国酸马奶中的优势乳酸菌为*L. acidophilus*,其次为*L. plantarum*和*L. casei*,内蒙古酸马奶中的乳酸菌以*L. casei*为主,其次为*L. acidophilus*和*L. plantarum*。石井智美等^[11,12]研究认为内蒙古酸马奶中优势乳酸菌为*L. casei*,此外还分离到*L. curvatus*和*L. rhamnosus*,蒙古国酸马奶中分离到*L. plantarum*。Ying An等^[13]研究表明,内蒙古酸马奶中的乳酸菌主要以*L. plantarum*和*L. pentosus*为主。本研究从新疆地区酸马奶中分离到的优势乳酸菌为*L. helveticus*,这与其

表1 中国新疆地区酸马奶中乳杆菌的生理生化试验和糖发酵试验结果

菌群特征	菌株类群																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
葡萄糖产气	0/78*	2/28	0/13	0/4	0/4	0/3	0/2	3/3	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	5/8
苹果酸产气	7/78	4/28	9/13	1/4	3/4	2/3	1/2	1/3	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/8
明胶液化	2/78	0/28	0/13	0/4	0/4	0/3	0/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/8
15℃生长	38/78	16/28	13/13	3/4	4/4	3/3	1/2	3/3	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1	9/8
45℃生长	73/78	27/28	12/13	4/4	4/4	2/3	2/2	3/3	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	5/8
耐热性	46/78	20/28	7/13	4/4	4/4	1/3	1/2	3/3	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	4/8
4% NaCl 生长	7/78	0/28	2/13	2/4	1/4	0/3	0/2	0/3	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/8
pH3.5 生长	61/78	20/28	8/13	2/4	1/4	3/3	1/2	1/3	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	4/8
pH4.5 生长	78/78	28/28	13/13	4/4	4/4	3/3	2/2	3/3	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	8/8
pH9.0 生长	20/78	9/28	7/13	0/4	3/4	2/3	1/2	1/3	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	3/8
细胞壁中 DAP	0/78	0/28	0/13	0/4	0/4	0/3	0/2	0/3	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/8
L	2/78	0/28	0/13	0/4	4/4	0/3	0/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/8
DL	41/78	14/28	6/13	2/4	0/4	2/3	0/2	0/3	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/8
L + DL	35/78	9/28	5/13	2/4	0/4	1/3	2/2	3/3	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1	4/8
D + DL	0/78	5/28	2/13	0/4	0/4	0/3	0/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	2/8
木糖	7/78	8/28	0/13	0/4	0/4	0/3	0/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/8
鼠李糖	0/78	0/28	1/13	0/4	0/4	0/3	1/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/8
核糖	17/78	3/28	6/13	2/4	0/4	1/3	1/2	0/3	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	4/8
葡萄糖	70/78	24/28	13/13	4/4	4/4	3/3	2/2	1/3	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	2/8
甘露糖	64/78	20/28	12/13	3/4	4/4	3/3	1/2	1/3	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/8
果糖	22/78	18/28	12/13	4/4	4/4	2/3	2/2	0/3	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/8
半乳糖	69/78	27/28	13/13	4/4	4/4	3/3	2/2	1/3	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	3/8
蔗糖	13/78	24/28	13/13	4/4	4/4	0/3	2/2	0/3	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/8
麦芽糖	34/78	23/28	13/13	2/4	4/4	3/3	1/2	1/3	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	4/8
纤维二糖	4/78	7/28	13/13	3/4	3/4	3/3	2/2	0/3	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	2/8
乳糖	72/78	26/28	10/13	4/4	4/4	3/3	1/2	1/3	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	2/8
蕈糖	13/78	19/28	13/13	3/4	4/4	3/3	2/2	1/3	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/8
蜜二糖	1/78	6/28	9/13	2/4	2/4	0/3	1/2	0/3	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	3/8
棉子糖	0/78	3/28	7/13	2/4	2/4	0/3	0/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/8
松三糖	0/78	1/28	11/13	1/4	4/4	0/3	1/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/8
糊精	9/78	12/28	12/13	2/4	3/4	3/3	1/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/8
淀粉	1/78	1/28	3/13	0/4	1/4	2/3	1/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/8
菊粉	0/78	1/28	9/13	0/4	2/4	0/3	0/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/8
甘露醇	3/78	4/28	13/13	2/4	4/4	2/3	1/2	0/3	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/8
山梨醇	1/78	2/28	10/13	2/4	3/4	0/3	0/2	0/3	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/8
肌醇	0/78	2/28	8/13	0/4	1/4	0/3	0/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/8
七叶苷	2/78	5/28	12/13	1/4	3/4	0/3	1/2	0/3	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/8
水杨苷	5/78	10/28	13/13	3/4	4/4	3/3	2/2	0/3	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/8
扁桃苷	0/78	5/28	13/13	3/4	1/4	1/3	1/2	1/3	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	1/8
α-甲基葡萄糖苷	0/78	0/28	2/13	0/4	1/4	1/3	0/2	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/8
葡萄糖酸盐	2/78	2/28	13/13	0/4	4/4	3/3	1/2	0/3	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/8

注:菌株类群 1 *L. helveticus*, 2 *L. acidophilus*, 3 *L. casei* subsp. *pseudoplantarum*, 4 *L. gasseri*, 5 *L. casei* subsp. *casei*, 6 *L. curvatus*, 7 *L. coryniformis* subsp. *coryniformis*, 8 *L. sanfrancisco*, 9 *L. brevis*, 10 *L. plantrum*, 11 *L. homohiechill*, 12 *L. fermentum*, 13 *L. dellbrueckii* subsp. *bulgaricu*, 14 *L. ruminis*, 15 *L. crispatus*, 16 *L. farciminis*, 17 *L. hilgardii*, 18 不确定菌株, * 分子为呈现阳性反应的菌株数量, 分母为该菌群菌株数量。

表2 中国新疆不同地区酸马奶中
乳杆菌分离株数量及鉴定结果

分离菌株名称	采样地点					\sum_1	%
	B	C	D	E	F		
<i>L. helveticus</i>	16	27	18	7	10	78	51.3
<i>L. acidophilus</i>	3	5	2	7	11	28	18.4
<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudoplatantarum</i>	2	4	2	5	-	13	8.6
<i>L. gasseri</i>	-	3	-	-	1	4	2.6
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	1	-	1	2	-	4	2.6
<i>L. curvatus</i>	3	-	-	-	-	3	2.0
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	-	2	-	-	-	2	1.3
<i>L. sanfrancisco</i>	-	-	-	-	3	3	2.0
<i>L. brevis</i>	1	-	-	-	-	1	0.7
<i>L. plantrum</i>	-	-	-	1	-	1	0.7
<i>L. homohiechill</i>	-	-	-	1	-	1	0.7
<i>L. fermentum</i>	-	1	-	-	-	1	0.7
<i>L. dellbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	-	-	-	-	1	1	0.7
<i>L. ruminis</i>	-	1	-	-	-	1	0.7
<i>L. crispatus</i>	-	1	-	-	-	1	0.7
<i>L. farciminis</i>	-	-	-	1	-	1	0.7
<i>L. hilgardii</i>	-	-	-	-	1	1	0.7
不确定	2	1	1	3	1	8	5.3
\sum_2	28	45	24	27	28	152	100.4

注： \sum_1 不同类群菌株数， \sum_2 不同地区分离菌株总数 % $\sum_1/152$

它地区的优势菌有所不同,样品中分离到的 *L. helveticus*、*L. acidophilus*、*L. casei* subsp. *pseudoplatantarum*、*L. gasseri*、*L. casei* subsp. *casei*、*L. curvatus*、*L. sanfrancisco*、*L. coryniformis* subsp. *coryniformis*、*L. plantrum* 和 *L. fermentum* 在相关文献[11,12,13]中均有报道,而分离株 *L. brevis*、*L. homohiechill*、*L. dellbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*L. ruminis*、*L. crispatus*、*L. farciminis* 及 *L. hilgardii* 未见报道。可见,新疆地区酸马奶中乳酸菌的种类具有明显的地域特点,并且在新疆不同地区酸马奶中乳酸菌生物多样性也有所区别。自然发酵酸马奶中乳酸菌的多样性与当地的地理地貌、气候条件有关,同时和酸马奶的制作方法、发酵温度及发酵时间息息相关。

马奶中乳糖含量较高,为6%~7%,在自然发酵过程中产生的乳酸也相应较多,例如前一研究测定的新疆地区酸马奶平均酸度为 $106.57^{\circ}\text{T} \pm 43.21^{\circ}\text{T}$ [6],由

于酸度高,因此耐酸性差的乳球菌到发酵后期难以存活,所以很难从中分离出乳球菌,这也从本研究的分离结果中得到证实。

3 结论

从30份新疆传统发酵酸马奶中共分离出152株乳杆菌属细菌。经鉴定,144株可归为17个属种,其中 *L. helveticus* 78株, *L. acidophilus* 28株, *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* 13株, *L. gasseri* 和 *L. casei* subsp. *casei* 各4株, *L. curvatus* 和 *L. sanfrancisco* 各3株, *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* 2株, *L. brevis*、*L. plantrum*、*L. homohiechill*、*L. fermentum*、*L. dellbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*L. ruminis*、*L. crispatus*、*L. farciminis* 及 *L. hilgardii* 各1株。其余8株以传统分类鉴定方法无法准确判断其归属,有待进一步研究。

新疆不同地区酸马奶中的乳酸菌种类和数量有所不同,呈现出多样性,但 *L. helveticus* 和 *L. acidophilus* 存在于所有的样品中,并且分别占总分离株的51.3%和18.4%,*L. helveticus* 为优势菌。

参考文献

- [1] 乌·扎木苏. 酸马奶疗法. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1986.
- [2] 候文通, 雷天富. 畜牧兽医杂志, 1989, 2: 1~4.
- [3] 孙惠平, 彭恭嘉. 实用医技杂志, 2003, 10(10): 112.
- [4] 刘贵肾, 马丽亚汉. 中国民间疗法, 2000, 8(6): 27~28.
- [5] 吴江媛, 马凤珍. 中国皮肤性病杂志, 1998, 12(2): 110.
- [6] 孙天松, 孟和毕力格, 王俊国, 等. 中国乳品工业, 2005, 33(10): 9~13.
- [7] 凌代文. 乳酸菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, PP. 117~128.
- [8] 小崎道雄, 内村泰, 冈田早苗. 乳酸菌实验マニュアル. 东京: 朝仓书店, 1992, PP. 29~72.
- [9] Peter H A, Sneath. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2, Williams & Wilkins, 1986, 1047~1245.
- [10] 孟和毕力格, 乌日娜, 王立平, 等. 中国乳品工业, 2004, 32(11): 6~11.
- [11] 石井智美, 菊池政则, 高尾彰一. 日畜会报, 1997, 68(3): 325~329.
- [12] 石井智美. Milk Science, 2001, 50(1): 25~29.
- [13] Ying An, Yoshikazu A, Yasuki O. Animal Science Journal, 2004, 75(3): 245.