

蒙古国地区酸乳中乳酸菌的鉴定及耐酸菌株筛选

杜晓华 艾日登才次克 李 莉 王伟宏 张彦斌 崔利敏 于 洁 张家超
刘文俊 孙志宏 孙天松 张和平* 孟和毕力格*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘 要: 本研究对采集自蒙古国地区牧民家庭中 17 份发酵乳样品中的乳杆菌进行了分离、鉴定、生物学特性和耐酸性研究。共分离出 45 株乳杆菌。通过形态观察、生理生化试验、糖发酵试验及 16S rDNA 序列分析等研究将这些菌株鉴定为 *Lactobacillus fermentum*(*L. fermentum*)31 株, *L. helveticus* 12 株, *L. plantarum* 1 株 和 *L. casei* 1 株, 所以认为 *L. fermentum* 是蒙古国地区传统酸乳中的优势菌群。经 pH 为 3.0 的人工胃液耐受性试验复筛后发现, 存活率在 80%以上的仅 1 株, IMAU20085 的存活率高达 81.44%。菌株的分离鉴定以及高耐酸性菌株的筛选, 对我国益生菌资源的保藏和开发有重要的意义, 对我国未来益生菌的开发具有重要价值。

关键词: 乳酸菌, 鉴定, 16S rDNA 序列分析, 耐酸性, 益生菌

Identification and Screening of Acid-tolerant LAB from Nomad Yogurt in Gobi Region of Mongolia

DU Xiao-Hua Airidengcaিকে LI Li WANG Wei-Hong ZHANG Yan-Bin
CUI Li-Min YU Jie ZHANG Jia-Chao LIU Wen-Jun SUN Zhi-Hong
SUN Tian-Song ZHANG He-Ping* MENGHE Bilige*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineer, Education Ministry of China,
Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: 45 strains of *Lactobacillus* were isolated from 17 samples of traditional fermented milk in Gobi region of Mongolia. Based on morphological, physiological, biochemistry test and 16S rDNA sequencing analysis, identified as 31 strains of *Lactobacillus fermentum*(*L. fermentum*), 12 strains of *L. helveticus*, one strain of *L. plantarum* and one strain of *L. casei*. Survival rate of IMAU20085 is 81.44% in the screening experiment of resistance to the artificial gastric juice (pH 3.0). The isolation and identification of these strains and the screening of high acid-tolerant strains have important meaning to the preservation and exploitation of probiotic resource.

Keywords: Lactic acid bacteria, Identification, 16S rDNA sequence analysis, Acid-tolerant, Probiotic

乳酸菌是从葡萄糖(或可利用的碳水化合物) 惯叫法, 并不是微生物分类学上的名称。Bernardeau
发酵产生大量乳酸的一群细菌。乳酸菌只是一种习 M(2008)报道, 乳杆菌属已包括 135 个不同的种和

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA10Z345, 2007AA10Z353); 国家自然科学基金项目(No. 30660135, 30800861); 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-06-0269)

* 通讯作者: 张和平: Tel: 86-471-4319940, 信箱: hepingdd@vip.sina.com; 孟和毕力格: Tel: 86-471-4300593, 信箱: mhbige@163.com

收稿日期: 2008-11-08; 接受日期: 2009-02-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

27 个亚种, 其中许多菌株已作为益生菌应用于商业化开发^[1]。1986 年 Kandler 和 Weiss 以葡萄糖发酵类型为依据, 将这些种划分为 3 个类群, 即专性同型发酵群、兼性异型发酵群和专性异型发酵群。1991 年, 辩野义己从乳酸旋光性、糖类发酵特性的角度, 对乳杆菌属各个种的分类与鉴定作了较为详细的叙述。近些年来, 随着分子生物学的发展, 从分子和基因水平上认识乳酸菌的遗传结构、组成和分类已成为可能, 许多新的分子标记技术被运用于乳酸菌的分类鉴定, 如: 16S rDNA、16S~23S rDNA 间隔区 (Intergenic spacer region, ISR) 序列分析和基于 PCR 技术的分子标记技术等^[2]。16S rRNA 序列同源性分析作为细菌的系统发育和亲缘关系研究已被普遍接受和应用。

乳酸菌作为益生菌筛选的主要来源, 对其基础研究和应用开发日益引起国内外专家的热切关注。研究发现乳酸菌对人体有降胆固醇、降血压和调节肠道微生态等多种保健作用。胃液 pH 的大小根据饮食结构不同而波动很大, 通常 pH 为 3.0 左右, 空腹或食用酸性食品可达 1.5, 益生菌需要能够在酸度更高的胃酸中生存, 以便于它们顺利地通过胃到达小肠并能够在小肠中生存。因此, 人们已经普遍接受耐酸性是筛选理想益生菌株的特性之一^[3]。Marteau P^[4](1997) 等人经研究发现乳杆菌具有能够在低 pH 环境中生长和存活特性。

因此本研究针对蒙古国地区采集的 17 份传统发酵乳制品中分离到的 45 株乳杆菌, 通过乳杆菌的形态观察、生理生化试验、糖发酵试验和 16S rDNA 序列分析等方法, 准确地对菌株进行种属归类, 并进一步研究乳杆菌对人工胃液的耐受性, 以便为其在乳制品中的应用打下一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 样品来源于蒙古国 5 个地区牧民家庭中自然发酵的 6 份酸马奶、4 份酸驼奶、3 份酸山羊奶、3 份混合奶和 1 份鲜奶。将牧民自然发酵的酸奶从其发酵容器中充分搅拌后, 用灭菌移液器吸取 1 mL 放入装有无菌 CaCO₃ 粉的 2 mL 采样瓶中, 拧紧螺旋帽后放入冰盒内冷却, 间隔一定时间更换冰袋, 保持在较低的温度下带回实验室后放于 4℃ 冰箱, 尽快进行乳酸菌的分离。在采样现场利用 pH

试纸和便携式温度计测试采样时酸奶的 pH 值和温度, 本次采集的样品采集温度从 14.2℃~34.5℃ (平均温度为 20.3℃), 部分样品的 pH 值因天气原因未测定。

1.1.2 参考菌株: *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 和 *L. dellbrueckii* 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 试剂及培养基: 脱脂乳培养基、TPY 液体培养基 (Trypticase peptone yeast broth, TPY)、BLB 液体培养基 (Briggs liver broth, BLB)、二氨基庚二酸 (DL- α,ϵ -Diaminopimelic acid DAP) 购自 Sigma 公司、乳酸旋光性试剂盒即 F-试剂盒 (D-乳酸/L-乳酸, UV-Test) 由德国 Boehringer Mannheim 株式会社生产、糖类发酵培养基参照文献^[5]配制。糖发酵试验所用糖类购于 Sigma 公司, PCR 引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。10×PCR buffer、dNTP、rTaq 酶购于大连宝生物有限公司。人工胃液^[6]: NaCl 0.2%、胃蛋白酶 (Pepsin, Sigma) 0.35%, 用 1 mol/L HCl 调整 pH 值为 3.0 后过滤除菌备用。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的分离与纯化: 吸取 1 mL 样品接种于 5 mL 灭菌脱脂乳培养基中, 30℃ 培养 72 h, 挑取少量培养物划线接种于含有 10 ppm 放线菌酮的 TPY 琼脂培养基上, 置于 BBL 厌氧培养罐中, 30℃ 培养 48 h~72 h。观察并记录菌落形态, 挑取单个菌落接种于 TPY 液体培养基中, 30℃ 培养 18 h~24 h 后显微镜中观察菌株形态及排列方式。选择革兰氏染色阳性的纯菌株进一步进行过氧化氢酶试验。将革兰氏染色阳性、过氧化氢酶试验阴性的菌株暂定为乳酸菌^[5]。进一步通过形态学观察将分离菌株分为杆菌和球菌, 从中选出杆菌作为下一步试验对象。

1.2.2 乳杆菌的传统生理生化鉴定: 将纯化的杆菌制成供试菌液, 参照凌代文等 (1999) 编著的乳酸菌鉴定手册^[5]和 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol.2, 1986)^[7]进行生理生化试验, 试验结果参照文献^[5]中描述的特征进行分析, 确定其是否属于乳杆菌属菌株。将分离到的认为是乳杆菌属的菌株, 进一步按照种特性试验的研究方法进行种的鉴定。糖发酵试验参照文献^[7]进行, 以 *Lactobacillum acidophilus* ATCC4356 和 *L. dellbrueckii* subsp.

bulgaricus JCM1002 为参考菌株, 将从蒙古国地区采集的 17 份样品中分离到的乳杆菌进行初步的种群归类。

1.2.3 16S rDNA序列分析与分子鉴定: 将纯化好的菌株接种于 10 mL 无菌MRS液体培养基中, 置 37°C培养 24 h, 连续培养 3 代后采用CTAB法提取其总DNA^[8]。并利用细菌通用引物^[9,10]PCR扩增其 16S rDNA片段。正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3'; 反向引物为 1495R: 5'-CTACGG CTACCTTCTTACGA-3'。PCR反应体系(25 μ L), 其中包括: 上下游引物各 1 μ L (10 μ mol/L), 模板DNA 1 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP mix 2 μ L, 超纯水 17.2 μ L, rTaq酶 0.3 μ L。PCR扩增程序为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 2 min, 30 次循环; 72°C 10 min, 4°C保温。将PCR产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测片段长度约 1500 bp后的阳性产物直接送上海桑尼生物技术有限公司进行序列测定。得到的序列运用软件校准排齐后, 在GenBank数据库中进行Blast同源性比对分析, 将待测菌株鉴定到种。所得序列与该种的模式菌株序列运用MEGA 4.0 软件的相邻计算法构建系统发育进化树, 进一步进行种属鉴定。

1.2.4 乳酸菌人工胃液耐受性试验: 参照乳杆菌生理生化结果, 选出在TPY固体培养基(pH值 3.0 和pH值 3.5)中生长良好的菌株作为复筛菌株^[11]。将复筛菌株制成供试菌液, 无菌吸取 0.5 mL供试菌液于 4.5 mL人工胃液中(pH值 3.0), 分别在 0 h 与 3 h计活菌数, 用灭菌生理盐水依次做 10 倍递增稀释, 取 10⁻⁵、10⁻⁶、和 10⁻⁷三个稀释度, 分别吸取 1 mL菌液倾注于TPY固体培养基中, 于 37°C厌氧培养 48 h, 记录其活菌数, 计算各菌株的存活率^[12]。

$$\text{菌株存活率} = N_1/N_0 \times 100\%$$

N_0 : 0 h的活菌数(0 h即试验开始时间); N_1 : 3 h的活菌。

2 结果与讨论

2.1 乳酸杆菌生理生化鉴定

本研究从蒙古国地区采集的 17 份样品中分离纯化得到了 45 株杆菌, 这 45 株杆菌均无芽孢、革兰氏阳性、过氧化氢酶试验阴性、在 pH4.5 的 TPY 液体培养基中生长良好, 同型或异型发酵, 符合乳杆菌属细菌的特性, 从而将其鉴定为乳杆菌属细菌, 参照文献[5,7,13]可将这 45 株乳杆菌归属为 4 个类群 A、B、C、D。试验结果见表 1 和表 2。

表 1 蒙古国地区传统发酵乳中乳杆菌的生理生化特性
Table 1 Physiological and biochemical character of *Lactobacilli* isolated from the traditional fermented milk in Gobi region of Mongolia

| 杆菌理化特性 Phenotypic characteristic of <i>Lactobacillus</i> | 菌株类群 Strains of groups | | | | | |
|--|---------------------------------|-----|-----|-------|----------|---------|
| | A | B | C | D | ATCC4356 | JCM1002 |
| Catalase | 0 ^a /12 ^b | 0/1 | 0/1 | 0/31 | — | — |
| Gas from glucose | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 31/31 | — | — |
| Growth at 15°C | 3/12 | 1/1 | 1/1 | 23/31 | — | — |
| Growth at 45°C | 11/12 | 1/1 | 1/1 | 31/31 | + | + |
| Growth in 4.0% NaCl | 5/12 | 0/1 | 1/1 | 19/31 | + | — |
| pH 3.0 | 2/12 | 0/1 | 1/1 | 17/31 | — | — |
| pH 4.5 | 12/12 | 1/1 | 1/1 | 29/31 | + | + |
| L | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 0/31 | — | — |
| Lactic acid isomers | | | | | | |
| DL | 11/12 | 0/1 | 0/1 | 27/31 | — | — |
| L+DL | 1/12 | 0/1 | 0/1 | 3/31 | — | — |
| D+DL | 0/12 | 0/1 | 0/1 | 1/31 | + | — |
| mDAP in cell wall | 0/12 | 0/1 | 1/1 | 0/31 | — | — |

注: 菌株类群A到D分别为 *L. helveticus*、*L. casei*、*L. plantrum*、*L. fermentum*; ^a: 阳性反应的菌株数量; ^b: 该类群所有菌株数量; —: 试验结果阴性; +: 试验结果阳性。

Note: Groups A-D were identified as *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantrum*, *L. fermentum*; ^a: Number of positive strains; ^b: Number of all strains; +: Positive; -: Negative.

表 2 蒙古国地区传统发酵乳中乳杆菌的糖类发酵特性
Table 2 Carbohydrate fermentation patterns of *Lactobacilli* isolated from the traditional fermented milk in Gobi region of Mongolia

| 糖类发酵特性 Carbohydrate fermentation patterns | 菌株类群 Strains of groups | | | | | |
|---|---------------------------------|-----|-----|-------|----------|---------|
| | A | B | C | D | ATCC4356 | JCM1002 |
| Arabinose | 0 ^a /12 ^b | 0/1 | 1/1 | 0/31 | — | — |
| Xylose | 0/12 | 0/1 | 1/1 | 0/31 | — | — |
| Rhamnose | 0/12 | 0/1 | 1/1 | 0/31 | — | — |
| Ribose | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 30/31 | — | — |
| Glucose | 12/12 | 1/1 | 1/1 | 0/31 | + | + |
| Mannose | 12/12 | 1/1 | 1/1 | 1/31 | + | + |
| Fructose | 4/12 | 1/1 | 1/1 | 31/31 | + | — |
| Galactose | 12/12 | 1/1 | 1/1 | 31/31 | + | — |
| Sucrose | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 30/31 | + | — |
| Maltose | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 27/31 | + | — |
| Cellobiose | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 0/31 | + | — |
| Lactose | 12/12 | 1/1 | 1/1 | 31/31 | + | + |
| Trehalose | 1/12 | 1/1 | 1/1 | 0/31 | + | — |
| Melibiose | 0/12 | 0/1 | 1/1 | 31/31 | — | — |
| Raffinose | 0/12 | 0/1 | 1/1 | 31/31 | — | — |
| Melezitose | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 0/31 | — | — |
| Mannitol | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 0/31 | — | — |
| Sorbitol | 1/12 | 1/1 | 1/1 | 0/31 | — | — |
| Aesculin | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 0/31 | — | — |
| Salicin | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 0/31 | — | — |
| Amygdalin | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 0/31 | — | — |
| Sod-Glu | 0/12 | 1/1 | 1/1 | 31/31 | — | — |

注：菌株类群A到D分别为 *L. helveticus*、*L. casei*、*L. plantrum*、*L. fermentum*；^a：阳性反应的菌株数量；^b：该类群所有菌株数量；—：试验结果阴性；+：试验结果阳性。
Note: Groups A-D were identified as *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantrum*, *L. fermentum*; ^a: Number of positive strains; ^b: Number of all strains; +: Positive; -: Negative.

D 类 群 菌 株：IMAU20031、IMAU20034、IMAU20037、IMAU20041、IMAU20043~IMAU20046、IMAU20049~IMAU20057、IMAU20059、IMAU20060、IMAU20064~IMAU20065、IMAU20079~IMAU20081、IMAU20083~IMAU20086~IMAU20089 这 31 株菌均能够发酵葡萄糖产生气体，属异型乳酸发酵类型，产生DL乳酸。在 15℃不生长或生长较弱，而在 45℃生长良好，属于高温型乳酸菌。可以发酵核糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖、蔗糖、乳糖、蜜二糖、棉籽糖和葡萄糖酸钠其余均呈现阴性，对其它碳水化合物的发酵情况依菌株而异，基本符合伯杰氏手册^[7]描述的*L. fermentum*的特征，结合参考文献[5,13]将其归为*L. fermentum*。

A 类 群 中 的 杆 菌 分 离 株 IMAU20033、

IMAU20035、IMAU20042、IMAU20058、IMAU20061、IMAU20062、IMAU20067、IMAU20074、IMAU20076~IMAU20078、IMAU20082 它们均能发酵葡萄糖但不产生气体，属同型乳酸发酵类型，产生 DL-乳酸。15℃生长较弱，45℃生长良好，属于高温型乳酸菌，均不能发酵葡萄糖酸钠产酸。均不能发酵或弱发酵甘露糖、果糖和蔗糖产酸，并且均能够发酵葡萄糖、半乳糖和乳糖产酸，菌株的以上特性与参考文献^[7]中 *L. helveticus* 特性基本一致。

IMAU20063 能发酵葡萄糖并产生气体，属异型乳酸发酵类型，产生 DL-乳酸。在 15℃生长而 45℃呈弱生长，属中温型乳酸菌。都可以发酵葡萄糖酸钠产酸，细胞壁中含有二氨基庚二酸(meso-DAP)。分解核糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖、蔗糖、

麦芽糖、纤维二糖、蕈糖、乳糖、蜜二糖、棉籽糖、甘露醇、七叶苷、水杨苷、扁桃苷和葡萄糖酸盐产生,符合文献[7,13]中描述 *Lactobacillus plantarum* 的特征,因而将其归为 C 群, *L. plantarum*。

IMAU20048 在 15°C 生长, 45°C 生长良好, 细胞壁中不含 meso-DAP, 发酵产 DL 型乳酸, 发酵葡萄糖、甘露糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、乳糖、蕈糖、松三糖、甘露醇和葡萄糖酸钠, 不发酵阿拉伯糖、木糖、鼠李糖、核糖。参照参考文献[7,13] 将这其菌鉴定为 *L. casei*, 如 B 类群所示。

2.2 16S rDNA 序列分析

为了将蒙古国地区 17 份样品分离纯化到的 45 株乳杆菌准确进行归类, 本研究对 45 株乳杆菌进一步做 16S rDNA 序列分析。利用 Blast 软件, 将 45 株乳杆菌的 16S rDNA/rRNA 序列与 GenBank/EMBL/ DDBJ 数据中已知细菌的相应序列进行比较, 比对后可知: 31 株菌与 *L. fermentum* IFO3956 或 *L.*

fermentum IFO3957 的同源性均在 99% 以上, 从分子水平上将这 31 株归属为 *L. fermentum*; 与 *L. helveticus* DPC4571 的同源性都在 99% 以上的 12 株菌定为 *L. helveticus*; 仅有 1 株菌的 16S rDNA/rRNA 序列与菌株 *L. plantarum* WCFS1 的同源性是 100%, 认为这株菌为 *L. plantarum*; 1 株与 *L. casei* ATCC334 的同源性是 99%, 判读该菌株为 *L. casei*。

从蒙古国地区分离到的 45 株乳杆菌中抽取了 18 株具有代表性的乳杆菌和相应的 4 株模式菌株的 16S rDNA/rRNA 序列构建系统发育树见图 1。从系统发育树上可看出: 从总体上可将其分为 4 个大群, 即与模式菌株(*L. fermentum* NCDO1750)处于同一支的以 IMAU20080 为代表的归为第 1 群, IMAU20048 与 *L. casei* ATCC334 归为第 2 群, IMAU20063 与 *L. plantarum* JCM1149 归为第 3 群, 剩下的与 *L. helveticus* NCDO2712 非常接近的归为第 4 群。由第 1

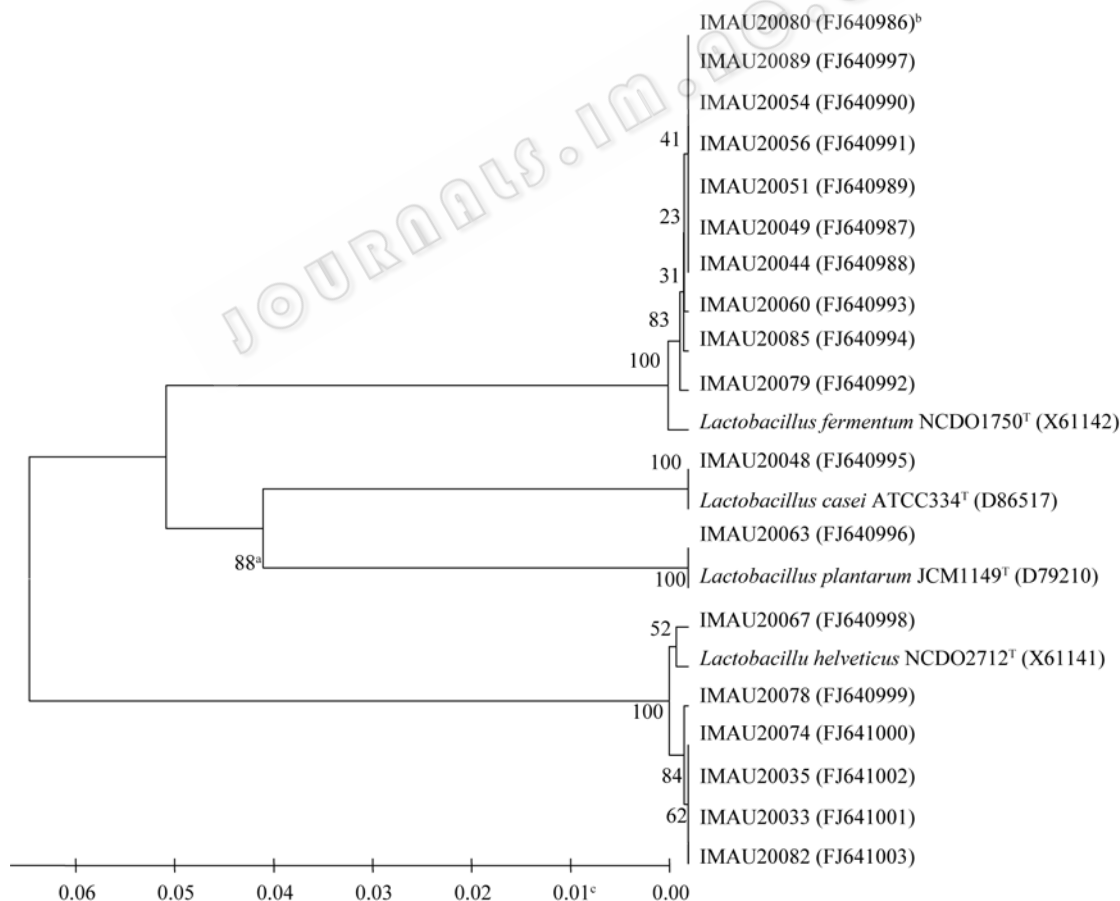


图 1 18 株菌株和 4 株模式菌株的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of 18 strains and 4 strains type strain based on 16S rDNA

注: 分支上的数值: Bootstrap 检验的支持百分率(>70%); T: 模式菌株; ^b: 登录号; ^a: 500 次重复中聚合在一起的百分率; ^c: 遗传距离。

Note: The number on the tree: Bootstrap values greater than 70%; T: The type strain; ^b: Accession numbers; ^a: The percentage of the associated taxa clustered together in 500 replicates.

群到第 4 群的鉴定结果与传统鉴定方法所归属的种群 D、B、C、A 完全相符。

本研究采用传统鉴定方法和 16S rDNA 序列分析相结合, 通过 Blast 比对和系统发育树分析, 更加准确地将蒙古地区的乳杆菌进行了归类, 结果表明传统分类方法与 16S rDNA 序列分析的结果相一致。

乳酸菌因地区差异和生存环境的不同, 其种类也存在差异, 旭日花^[14]从内蒙古通辽市牧区分离到的乳杆菌以*L. plantarum*为主。孟和毕力格等^[15]从内蒙古锡林浩特市酸马奶中分离出的乳杆菌以中温性*L. casei*菌株居多, 蒙古国酸马奶中以高温性*L. acidophilus*居多。本研究从蒙古地区发酵乳样品中分离出的乳杆菌以*L. fermentum*为主要菌群, 不同地区以及同一地区不同采样点乳制品中的乳酸菌种类有较大差异, 这可能与当地的环境、气候、乳制品的制作方法等因素有关。

2.3 耐酸性试验

作为益生菌的首要条件之一, 乳酸菌必须具有

足够的耐酸性环境中生长发育的特性, 而且耐酸性是任何能够在消化道中起作用的菌株所应拥有的特性^[16]。由表 3 可见, 本研究从蒙古地区酸乳中分离的乳杆菌中尽管多数都能在pH 3.0 的TPY固体培养基中生长, 但经过pH值为 3.0 的人工胃液消化 2 h后存活的菌株较少, 而且不同菌株之间的存活率差异很大, 同一菌种之间存活率也有一定的差异性。菌株IMAU20085、IMAU20063、IMAU20054、IMAU 20044 和IMAU20060 在 2 h之后的活菌数仍在 10⁸ CFU/mL, 并且存活率都在 50%以上, IMAU20085 的存活率高达 81.44%, 并符合活菌数达到 80%的要求^[17], 可对该菌株进行更进一步的研究。

陈霞(2008)^[18]认为乳酸菌的耐酸性与乳酸菌菌体内的质子泵、大分子的保护或修复等因素有关。MCDONALDM^[19]等人于 1990 年发现了在*L. plantarum*中存在着酸耐受反应系统, 从而*L. plantarum*的耐受性较强。本研究*L. fermentum*和*L. plantarum*的耐酸性较强, *L. plantarum*的耐酸性与文献[19]报

| 表 3 乳杆菌耐人工胃液试验结果 | | | | | |
|--|--|--|---|--------|-------------------------|
| Table 3 <i>Lactobacilli</i> screening experiment of resistance to the artificial gastric juice | | | | | |
| 菌株 Strains | pH 3.0 TPY 固体培养基 TPY agar plate of pH 3.0 | pH 4.5 TPY 固体培养基 TPY agar plate of pH 4.5 | pH 3.0 人工胃液(10 ⁸ CFU/mL) Artificial gastric juice of pH 3.0 | | 存活率(%) Survival rate |
| | | | 0 h | 3 h | |
| IMAU20085 | + | + | 3.39 | 2.76 | 81.44 |
| IMAU20063 | + | + | 1.01 | 0.75 | 74.25 |
| IMAU20054 | + | + | 4.26 | 3.06 | 71.83 |
| IMAU20044 | + | + | 2.28 | 1.54 | 67.54 |
| IMAU20060 | + | + | 2.15 | 1.15 | 53.48 |
| IMAU20083 | + | + | 0.61 | 0.25 | 41.46 |
| IMAU20065 | + | + | 3.60 | 1.47 | 40.97 |
| IMAU20084 | + | + | 3.70 | 1.48 | 40.00 |
| IMAU20086 | + | + | 5.35 | 2.04 | 38.13 |
| IMAU20051 | + | + | 1.42 | 0.50 | 36.07 |
| IMAU20057 | + | + | 5.30 | 1.78 | 33.58 |
| IMAU20055 | + | + | 2.99 | 0.97 | 31.96 |
| IMAU20088 | + | + | 4.25 | 1.32 | 31.13 |
| IMAU20090 | + | + | 6.05 | 1.40 | 23.14 |
| IMAU20059 | + | + | 3.44 | 0.79 | 22.96 |
| IMAU20041 | + | + | 4.71 | 0.68 | 14.46 |
| IMAU20080 | + | + | 2.70 | 0.03 | 1.11 |
| IMAU20081 | + | + | 2.95 | 0.32 | 1.08 |
| IMAU20042 | + | + | 1.41 | ≤0.001 | 0 |
| IMAU20082 | + | + | 2.30 | ≤0.001 | 0 |
| IMAU20089 | + | + | 2.66 | ≤0.001 | 0 |

道相一致,但未见 *L. fermentum* 具有较强耐酸性的相关报道。

内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室以内蒙古及蒙古国酸马奶中分离到的乳杆菌为研究对象,经过一系列的研究,从中筛选出 2 株益生特性优良的乳杆菌,分别为 *L. casei* Zhang 和 *L. acidophilus* MG 2-1, 它们具有耐酸、耐胆盐、抗氧化、调节血脂及免疫增强的作用^[20]。采集自蒙古国地区中酸乳中的乳杆菌 *L. fermentum* IMAU20085 存活率高达 81.44%, *L. plantarum* IMAU20063 存活率达到 74.25%, *L. fermentum* IMAU20085 具有良好的益生菌开发潜力,可进一步深入探讨其耐胆盐、抗氧化等特性。

3 结论

鉴定结果可知: *L. fermentum* 是蒙古国地区发酵乳中乳酸菌的优势菌群,同时还分离到 *L. helveticus*、*L. plantarum* 和 *L. casei*。

本研究通过 pH 值为 3.0 的人工胃液耐受试验可知,从蒙古国地区的酸乳样品中分离到的 *L. fermentum* 具有良好的耐酸性,其中 *L. fermentum* IMAU20085 存活率高达 81.44%,具有良好的益生菌开发潜力。

参 考 文 献

- [1] Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus. *Int J Food Microbiol*, 2008, **126**(3): 278–285.
- [2] Johansson ML, Quednau M. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett Appl Microbiol*, 1995, **21**: 155–159.
- [3] 霍贵成. 乳酸菌的研究与应用. 北京: 中国轻工业出版社, 2007, p.14.
- [4] Marteau P, Minekus M, Havenaar, et al. Survival of Lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Dairy Sci*, 1997, **80**: 1031–1037.
- [5] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999, pp.117–128.
- [6] 李海燕, 徐 杰, 云月英, 等. 传统发酵酸马奶瑞士乳杆菌耐酸性的筛选. 乳业科学与技术, 2006, **119**(4): 158–160.
- [7] Peter HA, Sneath. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2, Williams & Wilkins, 1986.
- [8] F 奥斯伯, R 布伦特编. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998, pp.37–39.
- [9] Mauro Scarpellini, Diego Mora, Silvia Colombo, et al. Development of genus/species-specific PCR analysis for identification of *Carnobacterium* strains. *Current Microbiology*, 2002, **45**: 24–29.
- [10] 乌日娜. 内蒙古传统酸马奶中乳杆菌的分离鉴定及 16S rDNA 序列同源性分析. 内蒙古农业学硕士学位论文, 2005.
- [11] Ishii S. Study on the koumiss (Airag) of Mongolia nomads after severe cold in the winters of 2000 and 2001. *Milk Science*, 2003, **52**: 49–52.
- [12] Liong MT, Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* stains. *Dairy Sci*, 2005, **88**: 55–66.
- [13] Badis A, Guetarni D. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 2004, **21**: 579–588.
- [14] 旭日花, 周雨露, 王志峰, 等. 内蒙古通辽市牧区传统乳制品中乳杆菌的分离鉴定. 畜牧与饲料科学, 2005, **26**(6): 19–21.
- [15] 孟和毕力格, 乌日娜, 王立平, 等. 不同地区酸马奶中乳杆菌的分离及其生物学特性的研究. 中国乳品工业, 2004, **32**(11): 6–11.
- [16] 张和平, 孟和毕力格, 王俊国. 分离自内蒙古传统酸马奶中 *L. casei* Zhang 潜在益生特性的研究. 中国乳品工业, 2006, **34**(4): 4–9.
- [17] 王玉华, 张桂荣, 刘景圣. 2 株耐酸及耐胆盐乳杆菌的分离筛选及其发酵特性研究. 东北师大学报(自然科学版), 2006, **38**(3): 115–118.
- [18] 陈 霞, 乌日娜, 孟 和. 乳酸菌耐酸机理. 中国乳品工业, 2008, **36**(3): 30–41.
- [19] McDonald LC, Fleming HP, Hassan HM. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(7): 2120–2124.
- [20] 孙天松. 中国新疆地区传统酸马奶的化学组成及乳酸菌生物多样性研究. 内蒙古农业大学博士学位论文, 2006.