

阿拉善双峰驼酸驼乳中乳酸菌的分离鉴定及耐酸和耐盐研究

FAHAD Shah¹, 徐鸿洋¹, 智超², 宫海萌¹, 张和平¹, 赵国芬^{1,*}

(1. 内蒙古农业大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010011; 2. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:以采自内蒙古阿拉善地区的传统发酵阿拉善双峰驼酸驼乳为材料,采用乳酸细菌培养基(MRS)对其中的乳酸菌进行初分离,经平板划线法纯化后,借助 16 SrDNA 的序列分析法进行分子鉴定,并对其耐酸性、产酸能力、最适 pH 值及耐盐性等性质进行研究。结果表明,分离纯化出 3 株疑似优势乳酸菌,分别为乳杆菌属的 *Lactobacillus plantarum* strain KC28、*Lactobacillus plantarum* strain K25 和 *Lactobacillus* sp. D1501。3 株菌均为革兰氏阳性,耐酸性较好,产酸性能适中;最适培养 pH 值为 6.5。

关键词:酸驼乳;乳酸菌;传统发酵;耐酸性;耐盐性

Separation, Identification, Acid-Resistant and Halotolerant Characterization of Lactic acid bacteria from Shubat of Alashan Bactrian Camel

FAHAD Shah¹, XU Hong-yang¹, ZHI Chao², GONG Hai-meng¹, ZHANG He-ping¹, ZHAO Guo-fen^{1,*}

(1. Life Sciences College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010011, Inner Mongolia, China;
2. College of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: In this study the traditional fermentational shubat of Alashan bactrian camel in Inner Mongolia was used as an example, the *Lactic acid bacteria* were initially separated using the MRS medium, further purified by flat scribing and identified by 16 SrDNA sequence analysis. Then, their acid resistance, acid production ability, optimum pH value and halotolerance etc. were studied. The results showed that separated and purified three suspected dominant *Lactic acid bacteria* which divided into *Lactobacillus* and were *Lactobacillus plantarum* strain KC28, *Lactobacillus plantarum* strain K25 and *Lactobacillus* sp. D1501, respectively. All 3 strains were gram-positive that possessed good acid resistance, moderate acid production performance and halotolerance. The optimum pH value were 6.5.

Key words: shubat; *Lactic acid bacteria*; traditional fermentation; acid-resistance; halotolerance

引文格式:

FAHAD Shah, 徐鸿洋, 智超, 等. 阿拉善双峰驼酸驼乳中乳酸菌的分离鉴定及耐酸和耐盐研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(18): 189-194

FAHAD Shah, XU Hongyang, ZHI Chao, et al. Separation, Identification, Acid-Resistant and Halotolerant Characterization of *Lactic acid bacteria* from Shubat of Alashan Bactrian Camel[J]. Food Research and Development, 2020, 41(18): 189-194

基金项目:国家自然科学基金项目(31560443);内蒙古自治区科技成果转化项目(CGZ2018122);内蒙古自然科学基金项目(2017MS0306)
作者简介:FAHAD Shah(1995—),男,在读硕士研究生,研究方向:食品微生物。

* 通信作者

驼奶营养成分丰富^[1-3],有一定的保健功效,在糖尿病、肺结核、肝炎、贫血、食物过敏反应和消化道疾病等的治疗中有改善作用^[4-6]。而酸驼乳风味浓郁,口感醇厚,极具民族特色,除了具有驼奶的营养价值外,还有一定的抗菌和益生特点,是一个极具市场竞争力的

新产品。其中微生物菌系十分复杂,含有丰富的对人体有益生作用的乳酸菌及酵母菌资源。而不同地域的酸驼乳中的乳酸菌种类和数量又存在特别大的差异^[7-10],因此其风味也有所差异。但目前有关酸驼乳的研究甚少,酸驼乳的工业化生产急需开发其中的微生物资源。

阿拉善盟双峰驼是内蒙古自治区的特色动物,驼产业是阿拉善地区的支柱产业,驼奶资源丰富,本研究旨在充分利用好地区资源并结合产业优势,以开发传统发酵酸驼乳中的乳酸菌资源,生产自主研发的、风味独特酸驼奶制品为宗旨,从传统发酵酸驼乳中分离优势乳酸菌并进行鉴定、耐酸性和耐盐性研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验原料

酸驼乳(ASR)、鲜驼乳(AXR)、马奶:来自内蒙古阿拉善地区牧民家中经过传统发酵、巴氏消毒。酸驼乳传统发酵数天放置于密封塑料壶中冷冻保存运到实验室,与鲜驼奶一起置于4℃冰箱中暂时保存。

1.1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、2×PCR mix、溶菌酶(20 000 U/mg)、蛋白酶 K(≥ 40 U/mg protein):大连宝生物工程有限公司;引物(7 F/1540 R)、dNTP Mix:天根生化科技有限公司。

无水乙醇、异丙醇、氯化钠、D(+)-无水葡萄糖、柠檬酸铵、蛋白胨、琼脂、牛肉浸粉、酵母提取粉、硫酸锰、磷酸氢二钾、乙酸钠、硫酸镁、吐温-80:国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要设备

TG16-W 微量高速离心机:长沙湘仪离心机仪器有限公司;THZ-100B 恒温培养摇床:上海一恒科学仪器有限公司;E1509020 紫外可见分光光度计:上海菁华科技仪器有限公司;DYY-10C 型核酸电泳仪:北京市六一仪器厂;Ver Sa Doc2000 凝胶成像系统:美国 Bio-Rad 公司;LD2X-30KA 立式电热压力蒸汽灭菌锅:上海申安医疗器械厂;徕卡 DMLB 型显微镜:德国徕卡显微镜与系统公司;DELTA320 pH 计:METTLER TOLEDO。

1.2 方法

1.2.1 培养基的配制

按微生物学试验指导的方法配制^[11]。

1.2.2 酸驼奶样品的梯度稀释、pH 值测定与涂布培养

将从阿拉善牧人家获取的1份传统发酵的阿拉善双峰驼酸驼奶样品用 pH 计测定 pH 值,测定3次,取

平均值。按照表1的感官评分标准进行评分然后将稀释到 10^{-5} 的酸驼奶样品涂布在普通 MRS 固体培养基进行培养^[12]。将长出的单菌落刮取一定量,在 MRS 固体培养基上进行划线纯化4次,将分离纯化得到的疑似乳酸菌进行感官评定和革兰氏染色分析形态^[13]。

表1 感官评定评分表

Table 1 Sensory assessment scale

项目	评分标准
色泽(30分)	淡乳黄色,均匀一致(25分~30分);色泽好,略分层(18分~24分);沉淀色差(0~17分)
口感(15分)	细腻均匀,口感纯正(12分~15分);略淡,口感不纯(9分~11分);口感较差(0~8分)
酸味(15分)	适宜(12分~15分);不足(9分~11分);略淡(0~8分)
甜味(15分)	适宜(12分~15分);不足(9分~11分);略淡(0~8分)
乳味(15分)	适宜(12分~15分);不足(9~11分);略淡(0~8分)

1.2.3 基于16SrDNA疑似乳酸菌的分子生物学鉴定

利用细菌基因组提取试剂盒分别对分离纯化的疑似乳酸菌菌液提取基因组,利用7F/1540R引物聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增16SrDNA片段^[14],然后将PCR产物电泳后回收,送由基因公司测序。将测序结果用Blast与NCBI中的Gene Bank数据库中近缘菌株的16SrDNA进行同源性比对,使用MEGA7软件进行系统进化树的构建,确定疑似菌株的分类地位。

1.2.4 乳酸菌在MRS液体培养基中生长曲线的测定

将鉴定为乳酸菌的菌株分别接种到液体 MRS 培养基中37℃进行摇床培养,约4h后按2%的体积比例接种到新的 MRS 液体培养基中进行培养,每隔2h测定 OD_{600nm} 。

1.2.5 乳酸菌耐酸性、产酸性和最佳pH值的确定

按2%的体积比例接种已鉴定的乳酸菌菌液到pH值分别调为4.0、3.0、2.0和1.0的MRS液体培养基中,37℃摇床培养,测定12h的 OD_{600nm} ,以在MRS培养基中培养为对照,分析各个菌株在不同pH值下的生长情况及存活率,来判断其耐酸性。

按2%的体积比例接种已鉴定的乳酸菌菌液到中性的MRS液体培养基中培养,分别测定12、24、48h的pH值,判断各个菌株的产酸性能。

将已鉴定的乳酸菌接种在MRS液体培养基中进行活化,取活化好的菌株以3%体积比的接种量分别接种到pH值分别为3.5、4.5、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0的8种MRS液体培养基中,37℃恒温摇床中生长24h,测定 OD_{600nm} ,确定其最佳pH值。

1.2.6 乳酸菌耐盐性分析

按3%的体积比例分别接种乳酸菌菌液到NaCl浓度分别为2%、4%、6%和8%的液体MRS培养基中,每隔2h测定一次 OD_{600nm} ,判断各菌对不同浓度的NaCl的耐受性。

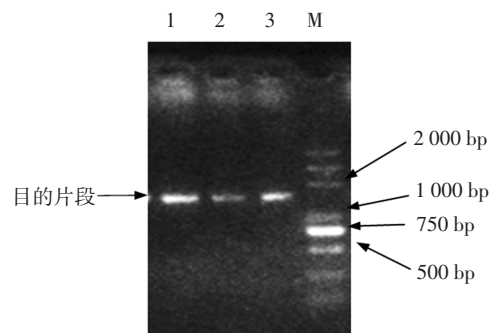
1.2.7 乳酸菌对鲜马奶和鲜驼奶反发酵试验

将已经鉴定的乳酸菌菌液经扩大培养后以3%的体积比例分别接种到分装好的已灭菌的鲜马奶和鲜驼奶中35.5℃进行发酵,分别测定发酵24、48、72h的pH值,考察其发酵情况。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离鉴定

将3株乳酸菌提取基因组DNA后,用16SrDNA引物扩增16SrDNA片段,1%的琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图1,都有与16SrDNA目的片段大小一致的条



M 为 Trans 2K[®] Plus DNA Marker;1、2、3 为 1、2、3 号乳酸菌。

图1 3株菌的16SrDNA PCR产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis of 16 S rDNA PCR products of three strains of *Lactobacillus*

带出现,说明16SrDNA基因片段扩增成功。

1号~3号乳酸杆菌的16SrDNA基因片段构建的进化树见图2~图4。

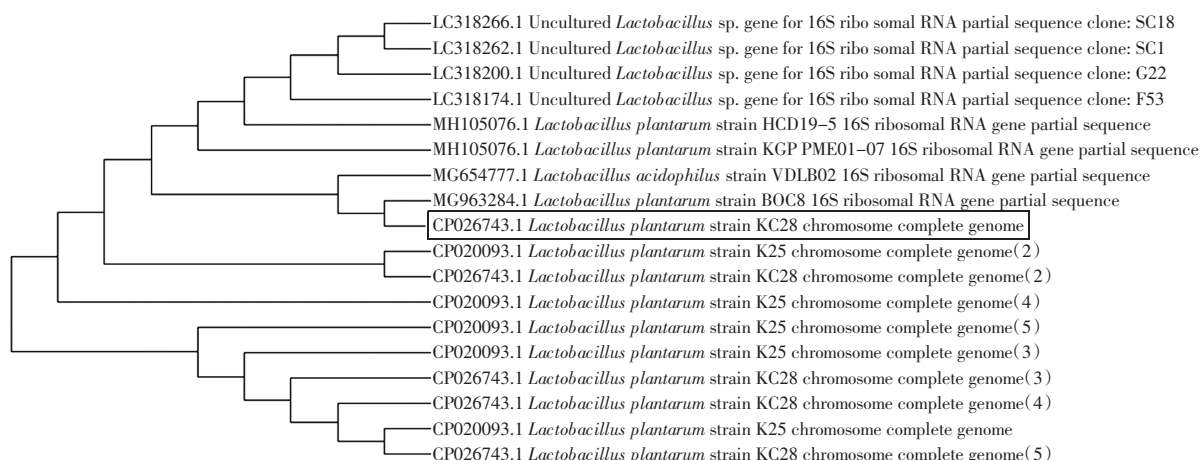


图2 1号乳酸杆菌的16SrDNA基因片段构建的进化树

Fig.2 Evolutionary tree by 16 S rDNA gene fragment of *Lactobacillus* No.1

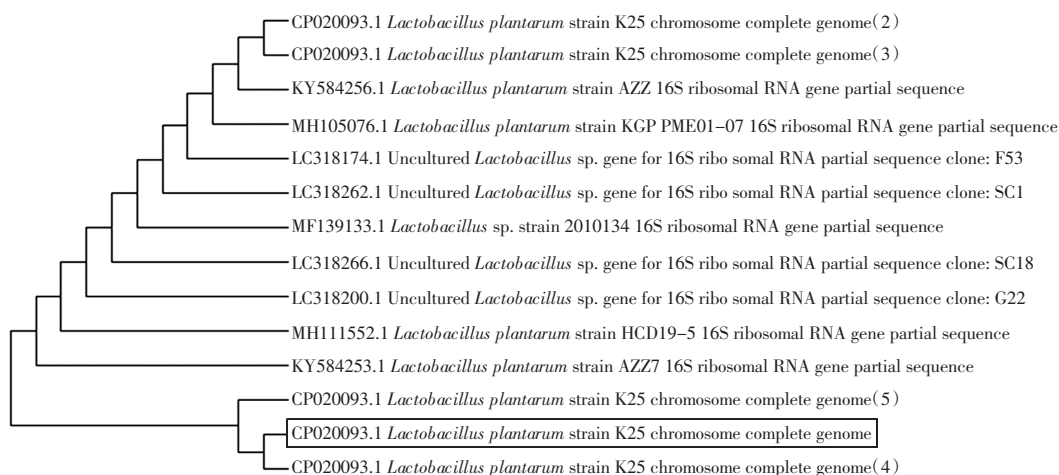


图3 2号乳酸杆菌的16SrDNA基因片段构建的进化树

Fig.3 Evolutionary tree by 16 S rDNA gene fragment of *Lactobacillus* No.2

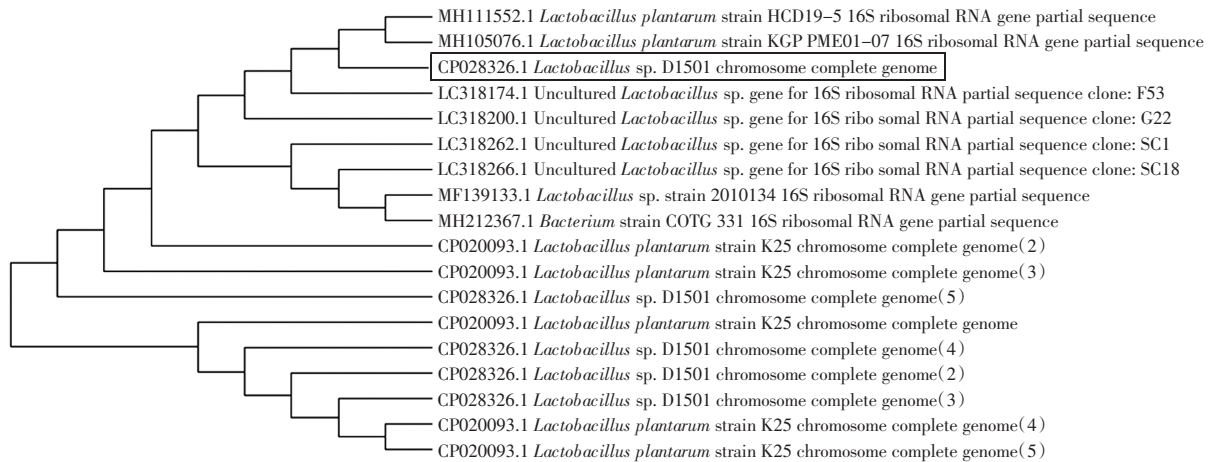


图4 3号乳酸杆菌的16SrDNA基因片段构建的进化树

Fig.4 Evolutionary tree by 16S rDNA gene fragment of *Lactobacillus* No.3

传统发酵阿拉善双峰驼酸驼奶样品的 pH 值为 4.12~4.16, 经过感官评定, 该酸驼奶样品的评分结果为: 色泽 26 分, 较均匀、乳黄色; 口感 14 分, 纯正; 酸味 15 分, 较酸; 甜味 8 分, 较淡; 乳味 13 分, 乳味很重。从中分离纯化出 3 株乳酸菌, 菌落清晰、均一明显。颜色呈乳黄色, 菌落相对较小、圆形、凸起, 发出较浓酸味。菌体革兰氏染色为阳性, 呈短杆状。

分别提取 3 株菌的 DNA, 用 7 F/1540 R 引物进行 16 S rDNA 扩增、电泳(图 1)和回收后测序, 将测序结果在 Gene Bank 中进行 Blast, 并使用 MEGA7 软件构建进化树, 结果如图 2~图 4。结果表明, 1 号菌、2 号菌和 3 号菌分别为 *Lactobacillus plantarum* strain KC28、*Lactobacillus plantarum* strain K25 和 *Lactobacillus* sp. D1501, 与这 3 个菌株的 16 SrDNA 序列相似性分别为 99.9%、99.9% 和 99.8%, 均属于植物乳酸杆菌属。

2.2 乳酸菌在 MRS 液体培养基中的生长曲线

将已鉴定的 3 株乳酸菌分别在液体 MRS 液体培养基中 37℃ 培养, 每 2 h 测定一次 OD_{600nm} 绘制的生长曲线如图 5。

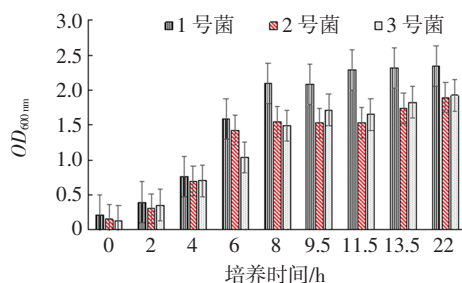


图5 3株乳酸菌的生长曲线

Fig.5 Curve of growth curve of three strain of *Lactobacillus*

3 株菌均在 4 h 左右开始进入对数生长期, 11.5 h 后基本达到稳定生长期稳定期, 一直持续到 22 h 左

右, 后逐渐进入凋亡期。

2.3 乳酸菌耐酸性、产酸性和最佳 pH 值

为比较 3 个菌株的耐酸性, 分别将 3 株乳酸菌在 pH 值分别为 4.0、3.0、2.0 和 1.0 的 MRS 液体培养基培养, 以 MRS 培养基为对照, 比较在不同 pH 值环境中的生存率, 来反映其耐酸性强弱, 结果如图 6 所示。

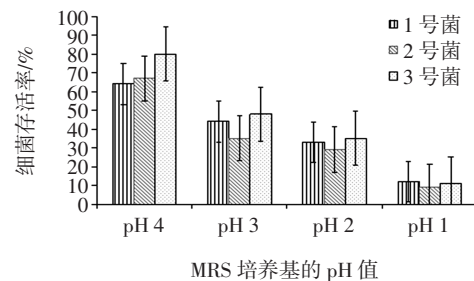


图6 不同 pH 值下 3 株乳酸菌的存活率

Fig.6 Survival rate of three strains of *Lactobacillus* at different pH

由图 6 可知, 1 号、2 号菌株在 pH 值大于 3 时存活率都在 50% 以上, pH 值为 3 时, 3 号菌存活率为 48.2%, 说明 3 株菌的耐酸性都很好, 且在 pH 值为 1 时仍然能生长。pH 值为 2 时, 3 株菌也可以生长, 只不过生长速度下降了, 说明 3 株菌均可以耐胃酸这样的环境。若这些菌种用来发酵驼奶, 利于其顺利通过胃部进入肠道在消化道中生存而发挥其益生活性。

培养液中的 pH 值可反映微生物生长过程中的产酸性能。为了解 3 株菌的产酸性能, 测定 3 株乳酸菌菌液分别在中性的 MRS 液体培养基中培养 12、24、48 h 的 pH 值, 3 株乳酸菌的产酸性能见图 7。

由图 7 可知, 3 株菌均能产酸, 培养基中 pH 值下降不大, 且规律大致相同, 产酸性能适中, 不仅对成品酸驼乳的风味有重要影响, 也可有效防止杂菌污染。

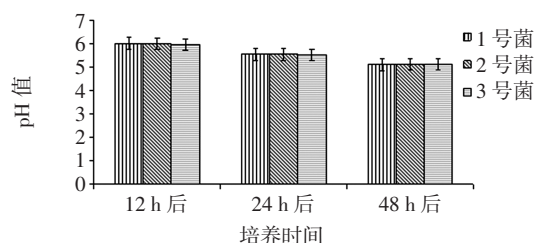


图7 3株乳酸菌的产酸性能

Fig.7 Acid production performance of three strains of *Lactobacillus*

为了解乳酸菌培养的最适 pH 值将 3 株乳酸菌在不同 pH 值的 MRS 中培养 24 h,测定 OD_{600nm} ,结果见图 8。

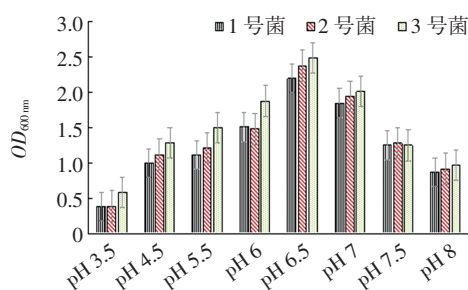


图8 不同 pH 值下 3 株乳酸菌的生长情况

Fig.8 Growth of three strains of *Lactobacillus* at different pH value

结果表明 3 株菌的最适 pH 值均为 6.5。耐酸微生物是指最适 pH 值接近中性时能生长,而嗜酸微生物是指最适 pH 值小于 3 的微生物,所以,3 株菌均属于耐酸微生物,不属于嗜酸微生物。

2.4 乳酸菌的耐盐性

驼奶相对牛奶盐度较高,对盐度的耐受性反映乳酸菌可否在高盐浓度下发酵驼奶并正常生存。3 株乳酸菌对不同 NaCl 浓度耐受性情况如图 9 所示。

由图 9 可知,含 2 %NaCl 的 MRS 培养基中乳酸杆菌可以正常生长,其生长规律与在 MRS 培养基中基本相似;在含 4 %NaCl 的 MRS 培养基中,乳酸杆菌的对数生长期被延迟,且未达到较高的菌体浓度,在达到

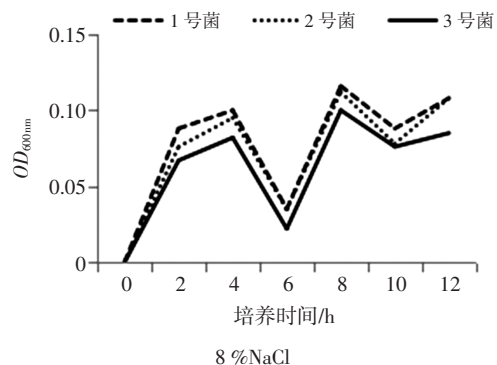
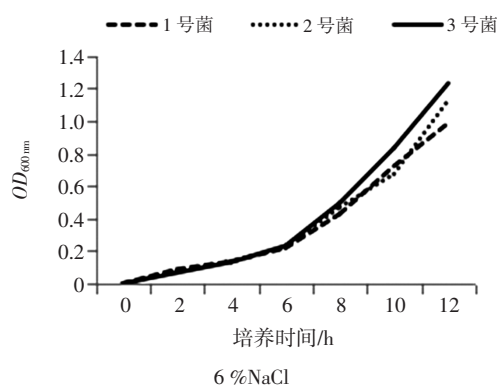
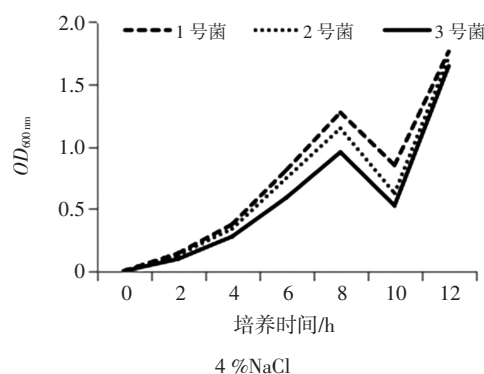
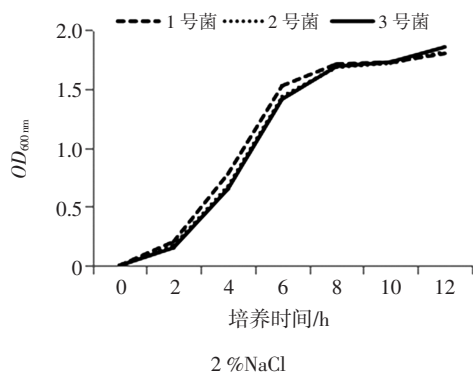


图9 3株乳酸菌对不同 NaCl 浓度的耐受力

Fig.9 Tolerance of three strains of *Lactobacillus* to different NaCl concentrations

相应较高生长浓度后受到抑制,剧烈下降后持续快速生长,说明 4 %盐浓度的耐受有一个适应的过程;在含 6 %NaCl 的 MRS 中,乳酸菌的延滞期和对数生长期都得到延迟,而且生长速度明显变慢,出现了持续明显的抑制现象;含 8 %NaCl 的培养基中,乳酸菌生长受到严重抑制,并且在生长到 6 h 时急剧下降后又有明显上升趋势,但始终受到高浓度的 NaCl 的抑制,基本无法在此环境中正常生长。耐盐微生物能够生长在很广的盐浓度范围内,但最适宜其生长的是在盐浓度 0.2 mol/L(即 2.9 %)^[15]。所以,3 株均为耐盐微生物,这些耐盐乳酸菌在驼奶发酵过程中使用,有助于改善酸驼奶风味和防治杂菌感染。

2.5 乳酸菌可发酵鲜马奶和鲜驼奶

测定了 3 株乳酸菌在 35.5 °C 发酵鲜马奶和鲜驼奶 24、48、72 h 的 pH 值,结果如表 1 和表 2 所示。

表 2 乳酸菌发酵驼奶不同时间点的 pH 值

Table 2 The pH value of lactic acid bacteria fermented camel milk at different time points

细菌编号	初始 pH 值	24 h	48 h	72 h
1 号	6.09	5.58	5.44	4.25
2 号	6.09	5.54	5.50	4.25
3 号	6.09	5.56	5.22	4.18

表 3 乳酸菌发酵马奶不同时间点的 pH 值

Table 3 The pH value of lactic acid bacteria fermented horse milk at different time points

细菌编号	初始 pH 值	24 h	48 h	72 h
1 号	5.08	4.96	4.57	4.24
2 号	5.08	4.86	4.70	4.13
3 号	5.08	4.95	4.74	4.14

经乳酸杆菌发酵而成的酸驼奶和酸马奶在酸度上与天然发酵驼奶和马奶非常接近,利用相同方法从中也可分离得到相应乳酸菌;经过感官评定也发现其口感与天然发酵酸驼奶和酸马奶极其相似(天然酸驼奶的 pH 值为 4.12~4.16,天然酸马奶的 pH 值为 3.80~4.20)。

3 结论

对来自阿拉善地区传统发酵的阿拉善双峰驼酸驼乳中的乳酸菌进行了分离鉴定及耐酸性和耐盐性的研究表明,分离出 3 株乳酸菌,经鉴定均为乳杆菌属,分别是 *Lactobacillus plantarum* strain KC28、*Lactobacillus plantarum* strain K25 和 *Lactobacillus* sp. D1501, 是阿拉善地区传统发酵的阿拉善双峰驼酸驼乳中的优势菌。3 株菌均为革兰氏阳性,菌落均清晰、较小、圆形、凸起,发出较浓酸味,颜色呈乳黄色;耐酸性很好;产酸性能一般;最适 pH 值均为 6.5;在不超过 2 % 的盐度下生长不受影响,为耐盐微生物。如果将分离菌株合理组合,会开发出生物学特性独特、风味优良的驼奶发酵菌剂,并且有望在胃肠道环境中发挥重要生理作用。

参考文献:

- [1] Yaqoob M, Nawaz H. Potential of Pakistani camel for dairy and other uses[J]. Animal Science Journal, 2007, 78(5): 467-475
- [2] 吾尔恩·阿合别尔迪. 酸驼奶的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2010,31(3): 187-190
- [3] Konuspayeva G, Faye B, Loiseau G. The composition of camel milk: a meta-analysis of the literature data[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22(2): 95-101
- [4] 赵电波,白艳红,张文彬. 自然发酵双峰驼乳营养价值的研究[J]. 乳业科学与技术, 2007, 30(6): 305-307
- [5] Mal G, Sena D, Suchitra. Therapeutic Value of Camel Milk as a Nutritional Supplement for Multiple Drug Resistant(MDR) Tuberculosis Patients[J]. Israel Journal of Veterinary Medicine, 2006, 61(3): 88-91
- [6] Shabo Y, Barzel R, Yagil R. Etiology of Crohn's disease and camel milk treatment[J]. Journal of Camel Practice and Research, 2008, 15: 55-59
- [7] 吕欣. 酸驼奶中产细菌素乳酸菌的分离及细菌素特性[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2014
- [8] Sulieman AbdelMoneim E H, Ilayan A A, Faki Ahmed E A El. Chemical and microbiological quality of Garris, Sudanese fermented camel's milk product[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2006, 41(3): 321-328
- [9] Shuangquan, Burentegusi, Miyamoto T. Microflora in traditional fermented camel's milk from Inner Mongolia, China[J]. Milchwissenschaft-Milk Science International, 2004, 59(11): 649-652
- [10] 孟和毕力格, 敖墩格日勒, 李少英, 等. 内蒙古双峰驼乳及乳制品中乳酸菌的分离及其生物学特性的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2002, 23(1): 79-84
- [11] 黄秀梨. 微生物学试验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 89-106
- [12] 王琦, 周雨霞, 李少英, 等. 内蒙古地区乳制品中乳酸菌的分离、鉴定[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1997, 18(2): 1-6
- [13] 肖平, 吕嘉彬. 乳酸菌的分类鉴定方法的研究进展[J]. 中国酿造, 2008, 27(24): 8-10
- [14] 卢海鹏. 传统酸马奶乳酸菌的鉴定及降胆固醇作用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018
- [15] 李梓铭. 盐渍辣椒制品中耐盐乳酸菌筛选鉴定及其应用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014

收稿日期: 2019-10-10