

雷善钰, 江华明, 李艳, 梁锦鹏, 张小平, 赵珂, 向泉桔, 辜运富. 川西高原传统发酵牦牛奶酪中乳酸菌多样性及优良乳酸菌的筛选[J]. 应用与环境生物学报, 2023, 29 (1): 27-34

Lei SY, Jiang HM, Li Y, Liang JP, Zhang XP, Zhao K, Xiang QJ, GU YF. Diversity of lactic acid bacteria in traditional fermented yak cheese in western Sichuan Plateau [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2023, 29 (1): 27-34

川西高原传统发酵牦牛奶酪中乳酸菌多样性及优良乳酸菌的筛选

雷善钰¹ 江华明² 李艳¹ 梁锦鹏¹ 张小平¹ 赵珂¹ 向泉桔¹ 辜运富¹✉

¹四川农业大学资源学院 成都 611130

²四川省职业技术学院 遂宁 610103

摘要 为认识川西高原乳酸菌资源多样性, 筛选高效乳酸菌菌种, 以川西高原传统发酵牦牛奶酪为研究材料分离了70株乳酸菌, 纯培养以测定其生长曲线、耐酸能力、耐渗透压能力、耐胆盐能力、耐高温能力、产酸能力及拮抗肠道病原菌能力, 运用BOXA1R-PCR聚类分析川西高原乳酸菌多样性以及16S rRNA基因测序鉴定明确其系统发育学地位, 并发酵制作酸奶, 对其进行感官评价. 筛选出4株耐酸、15株耐渗透压、3株耐胆盐、3株产酸强、4株耐高温、3株抗病原菌强的优势菌株, BOXA1R-PCR聚类分析得70株乳酸菌分属于乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*) 和肠球菌属 (*Enterococcus*) 3个属, 其中乳杆菌属为优势菌属. 感官评价表明, RB5 + YA8处理下的酸奶得分最高. 综上, 菌株YA8综合性能最强, 经生理生化及16S rRNA基因序列分析鉴定为干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*). 本研究表明川西地区传统自然发酵牦牛奶酪中的乳酸菌资源丰富, 具有巨大的应用潜能. (图6 表5 参32)

关键词 川西高原; 牦牛奶酪; 乳酸菌; 遗传多样性; 菌株筛选

Diversity of lactic acid bacteria in traditional fermented yak cheese in western Sichuan Plateau

LEI Shanyu¹, JIANG Huaming², LI Yan¹, LIANG Jinpeng¹, ZHANG Xiaoping¹, ZHAO Ke¹, XIANG Quanju¹ & GU Yunfu¹✉

¹ College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

² Sichuan Vocational and Technical College, Suining 610103, China

Abstract To assess the diversity of lactic acid bacteria in traditional fermented yak cheese collected from the western Sichuan Plateau, Sichuan, China, 70 strains of lactic acid bacteria were isolated from it, and their acid, osmotic pressure, bile salt, and high-temperature resistance, as well as acid production ability, growth, and antagonistic ability against pathogenic bacteria were determined. The BOXA1R-PCR technique was used to analyze their diversity, followed by 16S rRNA gene sequencing of the representative strains for phylogenetic analysis. In addition, the quality of the fermented yogurt was evaluated using sensory assessment. Results indicated that among the isolates, four strains were acid-resistant, 15 were osmotic pressure-resistant, three were bile salt-resistant, three were strong acid-producing, four were high temperature-resistant, and three were strongly antagonistic against pathogenic bacteria. BOXA1R analysis clustered the 70 strains into 10 groups with 92% similarity. Based on 16S rRNA analysis, the isolates were identified as *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* strains, with *Lactobacillus* being the dominant genus. The combination of strains RB5 and YA8 received the highest sensory evaluation score. Strain YA8 was identified as *Lactobacillus casei* based on physiological and biochemical analyses and 16S rRNA gene sequencing. The results reported here show abundant lactic acid bacteria in naturally fermented yak cheese in the western Sichuan Plateau, which have potential application prospects.

Keywords western Sichuan Plateau; yak cheese; lactic acid bacteria; genetic diversity; strain screening

乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) 是一种主要在兼性厌氧环境中生存, 在胃肠道中易生存和定植, 能够产酸抑制有

害病原菌生长, 维持肠道的菌群平衡, 提高机体免疫力的一类益生菌^[1]. 而自然界中的乳酸菌数量庞大, 种类繁多, 不同地

收稿日期 Received: 2021-08-30 接受日期 Accepted: 2021-10-17

教育部春晖项目 (Z2017087) 资助 Supported by the Chunhui Project of Ministry of Education of China (Z2017087)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: guyf@sicau.edu.cn)

区不同气候孕育的乳酸菌种类也拥有着不同的优良性状^[2]。我国饲养牦牛的主要地域位于川西高原及青藏高原地区,由于特殊的地理位置和气候条件,牦牛牛奶酪的营养价值丰富,内含大量的蛋白质、氨基酸、乳糖和矿物质,其发酵产物中乳酸菌资源丰富,益生性极高,是开发优良野生型乳酸菌的天然宝库,具有相当大的研究价值^[3]。

乳酸菌的性能决定了发酵乳制品的风味和营养价值,因此,性能优良的乳酸菌资源的开发一直是乳品行业研究的热点^[4]。李洋等人对青海地区采集的牦牛酸乳中乳酸菌进行分离鉴定,得到一株耐胆盐的鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*),在人工胃液中存活率为119.53%,在0.30%胆盐中生长率为41.64%^[5]。张梅梅等人从西藏、云南的传统牦牛酸乳中分离出26株乳酸菌,最终筛选得到5株产细菌素的菌株^[6]。张岩等人从藏区传统牦牛酸乳中分离筛选,得到适用于牦牛乳酪生产的复合菌株Z2和LD3^[7]。陈孝勇等人以抗人工胃液、胆盐中生长效率和细胞表面疏水性为筛选指标,对西藏羊八井地区传统发酵牦牛酸乳中分离出的38株乳酸菌进行体外筛选,最终获得屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、耐久肠球菌(*Enterococcus durans*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)等5株益生特性较好的乳酸菌^[8]。然而,目前研究多数集中于青藏高原地区牦牛乳酸菌的筛选,而川西高原的乳酸菌筛选及多样性报道较少^[9-11]。

本研究将从川西高原5个地区分别采集自然发酵的牦牛奶酪,通过纯培养分离其中的乳酸菌进行筛选及鉴定,BOXA1R-PCR分析分离菌株的遗传多样性,16S rRNA基因测序明确其系统发育地位,并发酵制作酸奶对其进行感官评价,以期揭示川西高原乳酸菌多样性,获得性能优良的牦牛乳酸菌菌株,为丰富高原乳酸菌资源并进行生产应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品来源及供试菌株

以在川西红原县、若尔盖县、康定市和壤塘县等地区采集的11份牦牛牛奶酪为材料进行试验,采样信息见表1。

1.2 试剂与仪器

主要试剂: MRS肉汤培养基、MRS固体培养基、脱脂乳培养基、LB培养基、TSA培养基,天根生化细菌基因组DNA提取试剂盒,大肠杆菌由四川农业大学应用微生物学系实验室保藏。

主要仪器: V-1100D型分光光度计(美谱达); T100梯度定量PCR仪(美国Bio-rad公司); GelDoc XR⁺型凝胶成像系统(美国Bio-rad公司); LRH-250型培养箱(郑州生元仪器有限公司); ZQLY-300S型全温振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司); 5418R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

1.3 样品活化

以3%接种量将采集的奶酪样品加入质量浓度为12.5%的灭菌脱脂乳液体培养基中, 42 ℃条件下发酵4-6 h, 待观察到酸乳出现凝固现象后依照上述步骤进行二次发酵后待用^[12]。

1.4 乳酸菌的分离纯化及初步鉴定

采用稀释涂布法^[12]分离样品中的乳酸菌, 37 ℃下培养48 h, 观察平板菌落生长情况, 挑取具有溶钙圈的乳白色圆形的单菌落在MRS培养基上划线纯化, 培养24 h后, 挑取单菌落的一半做革兰氏染色与过氧化氢酶实验, 进一步筛选目的菌。筛选出来的菌株于30%甘油-80 ℃冰箱保存。

1.5 优良菌株筛选

1.5.1 耐高温试验 将待测菌株活化后, 分别于45 ℃和50 ℃的恒温箱中培养48 h^[13], 观察记录其生长情况。

1.5.2 产酸试验 初筛采用钙溶圈法^[14], 钙溶圈的大小反映菌株产酸能力的强弱。分别挑1环活化好的菌株接种于10 mL MRS液体培养基中, 37 ℃恒温培养24 h。在含有质量浓度为1% CaCO₃的MRS琼脂平板上间隔适宜距离用直径为5 mm的灭菌吸管打孔后, 向孔中分别注入100 μL菌液并做好标记, 将接入菌液的平板置于37 ℃的培养箱培养2-3 d后测量钙溶圈直径大小。

1.5.3 抗病原菌试验 抑菌试验采用牛津杯法^[15]。取10⁸ cfu/mL大肠杆菌的LB溶液100 μL, 涂板于已灭菌的LB培养基中, 上面水平放置牛津杯, 分别加入200 μL相同浓度的目标菌液, 设置3个重复, 37 ℃培养24 h, 记录其抑菌圈直径。

1.5.4 耐酸试验 将菌株接入pH值为3.0、4.0、5.0的MRS培养基中, 37 ℃静置培养24 h, 观察其生长情况, 挑选生长情况较好的菌株活化, 将活化好的浓度为10⁶ cfu/mL的菌株分别接入pH值为1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5的MRS液体培养基中, 37 ℃静置培养, 于0、2、4、6、24 h分别测定发酵液的OD₆₀₀值, 以对应的pH值培养基调零, 以自然pH的MRS培养基接入相同浓度菌株作为对照, 每个菌设置3个重复^[2]。

1.5.5 耐渗透压试验 将菌株接入NaCl质量分数为6%的MRS培养基中, 37 ℃静置培养24 h, 观察其生长情况, 挑选生长情况较好的菌株活化, 将活化好的浓度为10⁶ cfu/mL的菌株分别接入NaCl质量分数为3%、5%、7%、9%的MRS液体培养基中, 37 ℃静置培养, 分别于0、2、4、6、8、24 h测定发酵液

表1 川西地区牦牛奶酪样品来源
Table 1 The source of yak cheese samples in the western Sichuan Province

样品编号 Sample number	样本类型 Sample type	采样地区 Sampling region
HA	牦牛奶酪 Yak cheese	红原县阿木乡卡口村 Kakou Village, Amu Town, Hongyuan County (102°64' E, 32°92' N)
HB	牦牛奶酪 Yak cheese	红原县麦洼乡涧拉村 Jianla Village, Maiwa Town, Hongyuan County (102°91' E, 33°06' N)
HC	牦牛奶酪 Yak cheese	红原县龙日镇格玛村 Gema Village, Longri Town, Hongyuan County (102°45' E, 32°50' N)
HD	牦牛奶酪 Yak cheese	红原县查尔玛乡达尔龙村 Daerlong Village, Chaerma Town, Hongyuan County (102°11' E, 32°44' N)
RA	牦牛奶酪 Yak cheese	若尔盖县铁布镇然多村 Randuo Village, Tiebu Town, Ruoergai County (103°12' E, 34°09' N)
RB	牦牛奶酪 Yak cheese	若尔盖县阿西镇甲尼村 Jiani Village, Axi Town, Ruoergai County (103°21' E, 33°68' N)
RC	牦牛奶酪 Yak cheese	若尔盖县红星镇扎窝村 Zhawo Village, Hongxing Town, Ruoergai County (102°74' E, 34°08' N)
KA	牦牛奶酪 Yak cheese	康定市折多塘村 Zheduotang Village, Kangding City (101°89' E, 29°99' N)
TA	牦牛奶酪 Yak cheese	壤塘县蒲西村 Puxi Village, Rangtang County (101°30' E, 31°78' N)
TB	牦牛奶酪 Yak cheese	壤塘县宗科乡加斯满村 Jiasiman Village, Zongke Town, Rangtang County (101°06' E, 31°80' N)
YA	牦牛奶酪 Yak cheese	雅江县河口镇城厢村 Chengxiang Village, Hekou Town, Yajiang County (101°02' E, 30°03' N)

的OD₆₀₀值,以对应的盐培养基调零,以不加NaCl的MRS培养基接入相同浓度菌株作为对照,每个菌设置3个重复^[16]。

1.5.6 耐胆盐试验 将菌株接入牛胆盐质量分数为0.2%的MRS培养基中,37℃静置培养24 h,观察其生长情况,挑选生长情况较好的菌株活化,将活化好的浓度为10⁶ cfu/mL的菌株分别接入牛胆盐质量分数为0.2%、0.3%、0.5%的MRS液体培养基中,37℃静置培养,分别于0、2、4、6、8、24 h测定发酵液的OD₆₀₀值,以对应浓度的胆盐培养基调零,以不加牛胆盐的MRS培养基接入相同浓度菌株作为对照,每个菌设置3个重复^[17]。

1.5.7 乳酸菌DNA提取 将以上筛选出来的优势乳酸菌菌株活化后,用天根生化细菌基因组DNA提取试剂盒提取菌株基因组DNA,通过电泳鉴定菌株DNA纯度与浓度,-20℃冰箱保存待用。

1.6 多样性分析及系统发育分析

1.6.1 BOXA1R-PCR 引物序列^[18]为5'-CTACGGCAAGG-CGACGCTGACG-3'。反应体系^[19]如下:2×PCR Mix 5 μL,BOXA1R (30 pmol) 0.2 μL,模板DNA (50 ng/mL) 1.0 μL,ddH₂O补至10 μL。

PCR扩增程序为95℃预变性2 min,94℃变性1 min,52℃复性1 min,65℃延伸8 min,65℃最终延伸18 min,35个循环,扩增完成后于4℃冰箱恒温保存。

扩增产物电泳后用凝胶成像系统拍照检测,将所得图谱中的条带进行统计后采用软件NT-SYS进行聚类分析并获得聚类图谱,并从图谱各菌株类群中选出代表菌株进行后续的测序工作。

1.6.2 16S rRNA基因序列分析及系统发育树的构建 以提取的DNA为模板扩增细菌16S rRNA,PCR反应体系25 μL: mix 12.5 μL,通用引物27F (5'-AGAGTTTGTACCTG-GCTCAG-3')和1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTAC-GACTT-3')各1 μL,DNA样本5 μL,补充ddH₂O至25 μL。PCR反应程序:95℃预变性10 min、95℃变性30 s、55℃退火30 s、72℃延伸90 s,30个循环,72℃持续10 min。琼脂糖凝胶检测产物,将正确的片段送至北京擎科生物科技有限公司成都分公司测序,将测序结果上传NCBI数据库并进行BLAST序列同源性分析,并用MEGA7.0软件进行系统发育树的构建。

1.7 酸奶制作及感官评价

将具有优良性能的乳酸菌菌种活化,接种至脱脂乳培养

基中,37℃培养至凝乳,于4℃冰箱冷藏后进行感官评价。感官评分依照GB 19302-2010《食品国家安全标准发酵乳》的指标^[20]稍加改动,具体评价标准见表2。

1.8 数据分析

利用Excel 2010对试验数据进行初步计算。采用软件NT-SYS进行聚类分析并获得聚类图谱,并用MEGA7.0软件进行系统发育树的构建。采用SPSS 23.0软件进行单因素方差分析(ANOVA)来检测感官评价的差异(P<0.05)。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离纯化及初步鉴定

从采集的样品中分离出70株菌株,其中HA 8株、HB 7株、HC 7株、HD 8株、RA 9株、RB 5株、RC 5株、KA 2株、TA 6株、TB 7株、YA 8株。经初步鉴定后判定为乳酸菌。部分乳酸菌在培养基上生长形态如图1所示。

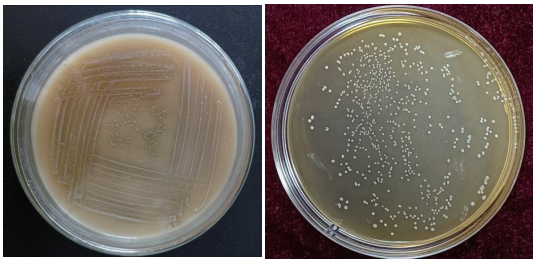


图1 乳酸菌在MRS培养基上的生长形态。
Fig. 1 Growth morphology of lactic acid bacteria on MRS medium.

2.2 优良菌株筛选

部分乳酸菌的耐高温、产酸、抗病原菌能力结果如表3所示。不同菌株在测定结果中差异明显,其中菌株HA1、RB5、YA8均能在50℃条件下生长,展现了较为优越的耐高温能力。在产酸能力测定中,HD1、RA2、RC3、YA8的钙溶圈直径均大于11 mm,产酸能力较强;在抑大肠杆菌试验中发现各菌株均对大肠杆菌有一定抑制作用,但抑菌能力差异较明显。例如KA1的抑菌圈直径为6.02 mm,是所有菌株中最小的,而HB2的抑菌能力最强,其抑菌圈直径为20.00 mm。

将分离的70株菌株进行耐酸性测定,结果显示有64株乳酸菌能够耐受pH为5.0的环境,26株对pH为4.0的环境具有耐受性,但在pH为3.0的条件下还能继续生长的菌株只有4株。

表2 酸奶感官评价指标及标准
Table 2 Sensory evaluation indices and standards of yogurt

评价指标 Evaluation index (分值 Score)	评价标准 Evaluation standard	分值 Score
色泽 Colour and lustre (25)	非常均匀,富有光泽,呈乳白色 Very uniform, glossy, milky white	19-25
	较均匀,略有光泽,呈淡黄色 Uniform, slightly glossy, yellowish	11-18
	不均匀,色泽暗淡,呈其他颜色 Pockety, dimly, with other colors	0-10
气味 Scents (25)	酸奶香浓,略有发酵味,气味协调 Strong smell of yogurt, slightly fermented flavor, balanced smell	19-25
	酸奶香平淡,发酵味较重,气味较协调 Bland, heavy fermented flavor, good smell	11-18
	无酸奶香味,发酵味极重或有其他异味 No smell of yogurt, fermented or other peculiar smell	0-10
滋味 Taste (25)	口感细腻香醇,酸味协调 Soft and delicate taste and harmonious flavor	19-25
	口感较细腻,酸味较协调 Delicate taste and sour coordination	11-18
	口感粗糙,酸味过重或有异味 Bad taste, overacidity or unpleasant odor	0-10
组织状态 Texture (25)	凝乳细腻均匀,形态稳定,无或微量乳清析出 Good organization, stable in shape, without or trace whey precipitation	19-25
	凝乳较均匀,形态较稳定,少量乳清析出 The curd was uniform and stable, and a small amount of whey was precipitated	11-18
	凝乳不均匀,形态不稳定,大量乳清析出 The curd was not uniform, the shape was not stable, and a large amount of whey was precipitated	0-10

对耐酸性能较优越的4株菌株进行酸性条件下的OD₆₀₀测定,具体测定结果见图2. 其中HB2和RA2均在4-6 h时均有小幅下调,但4株菌均能在强酸性条件下持续生长,在pH为1.5的环境培养24 h时OD₆₀₀值为YA8 > HB2 > HD1 > RA2.

以NaCl质量分数为6%的MRS培养基初筛得到15株耐受菌株,经OD₆₀₀测定后部分结果如图3所示. 由图可知,虽然不同菌株对NaCl的耐受程度不同,但样品菌株在24 h的OD₆₀₀值均随NaCl质量分数增大而减小. 其中菌株RC3在9% NaCl的环境中与在无NaCl的环境中相比, OD₆₀₀值仅小幅度下调,表明该菌株能够耐受高渗透压环境;而其他菌株例如YA8, 在高盐环境中虽能生长但被大幅抑制,表明其对高盐环境耐受度不强.

以牛胆盐质量分数为0.2%的MRS培养基初筛得到3株耐受菌株,经OD₆₀₀测定后结果如图4所示. 3株菌均能在0.3%胆盐的溶液里生长,但当盐浓度升高至0.5%时, HB1几乎不生长, RB5和YA8能够继续生长但长势较弱.

2.3 菌株遗传多样性及系统发育

对分离得到的70株菌株进行BOXA1R-PCR后得到遗传谱带,经聚类分析后得到聚类图如图5,以相似水平92%作为标准,70株菌株被划分为10个BOX遗传群.根据BOXA1R-PCR聚类分析结果,选取10株代表菌株进行16S rRNA基因扩增,对扩增的产物测序后比对结果见表4,构建的系统发育树如图6所示.由表4分析可知,10株代表菌株分布在乳

表3 部分菌株的耐高温、产酸及抑菌能力测定

Table 3 Determination of high-temperature resistance, acid production, and bacteriostatic ability of selected strains

菌株编号 Strain number	耐高温能力 High-temperature resistance		产酸能力 (钙溶圈直径) Acid production (d/mm)	抗菌能力 (抑菌圈直径) Bacteriostatic ability (d/mm)
	45 °C	50 °C		
HA1	+++	++	9.26	13.43
HA6	-	-	8.78	8.37
HB1	-	-	9.55	10.90
HB2	-	-	12.08	20.00
HC6	-	-	9.35	10.10
HD1	++	-	11.25	11.08
RA2	+++	++	10.88	17.16
RB5	++	+	9.77	11.69
RC3	++	-	10.10	13.27
KA1	-	-	7.00	6.02
TA2	+	-	9.61	7.54
TB7	-	-	7.48	7.23
YA8	++	+	12.43	18.76

“+++”表示菌株生长状况良好,“++”表示菌株生长状况一般,“+”表示菌株生长较弱,“-”表示菌株不生长.
“+++” means good growth condition of the strain, “++” means normal growth condition of the strain, “+” means weak growth of the strain, and “-” means no growth of the strain.

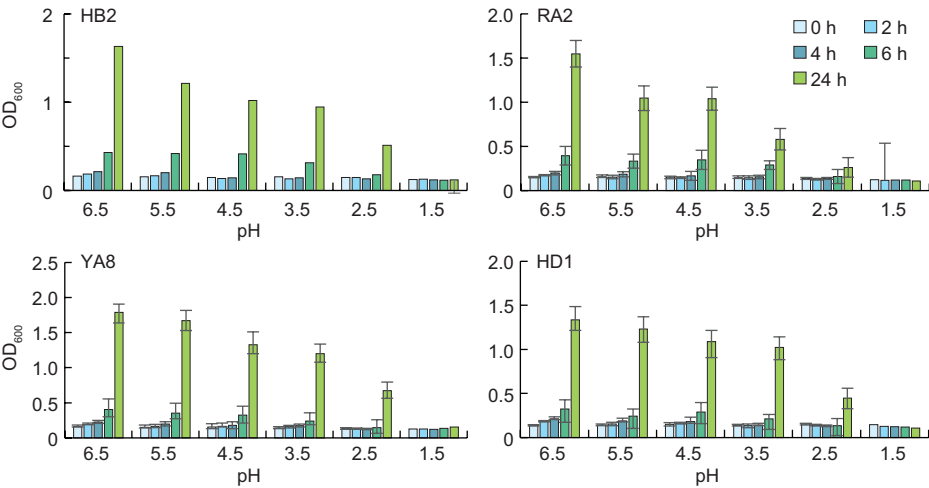


图2 4株耐酸菌株在不同pH下OD₆₀₀测定结果.
Fig. 2 OD₆₀₀ measurement of four acid-tolerant strains at different pH values.

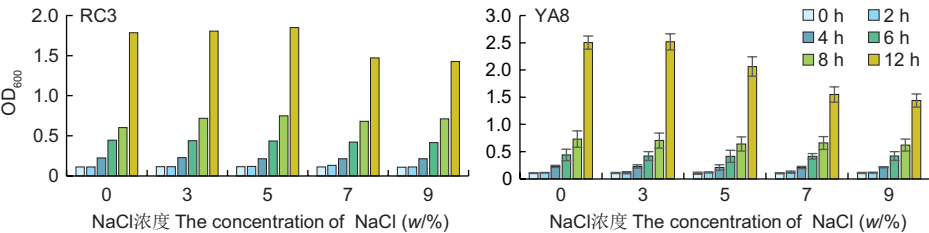


图3 RC3和YA8在不同渗透压环境下OD₆₀₀测定结果.
Fig. 3 OD₆₀₀ measurement of RC3 and YA8 in different osmotic pressure environments.

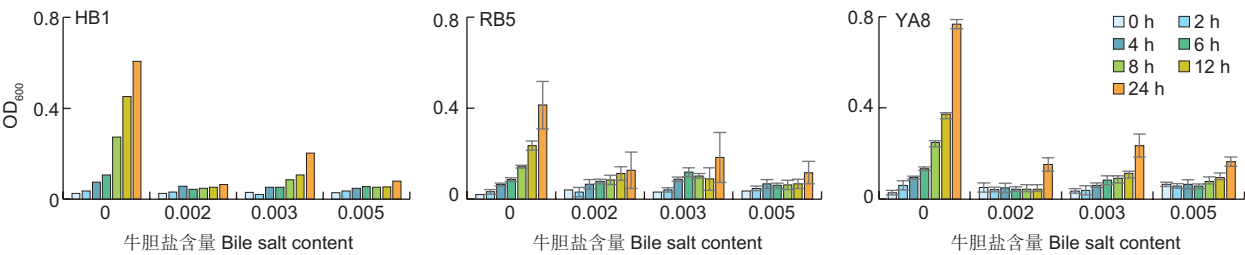


图4 耐胆盐菌株的OD₆₀₀测定结果。
Fig. 4 OD₆₀₀ test results of choline-resistant strains.

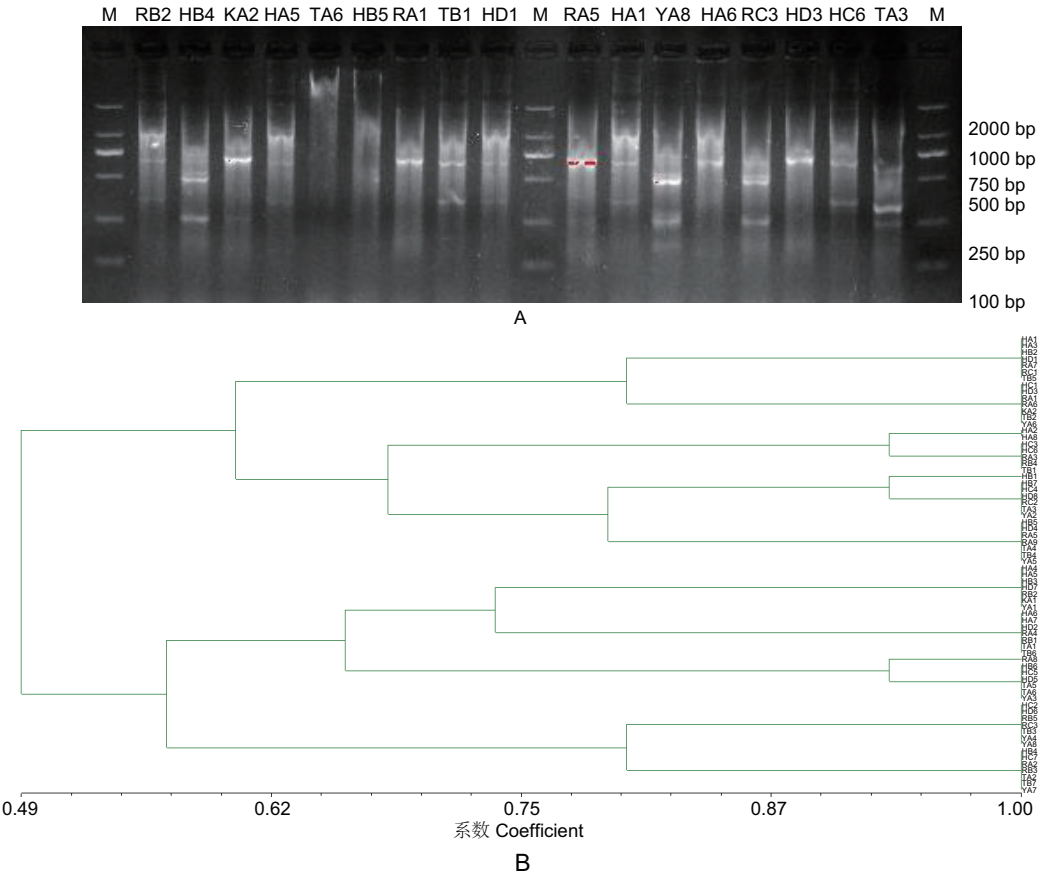


图5 部分BOXA1R-PCR扩增条带图 (A) 以及70株乳酸菌的BOXA1R-PCR聚类图 (B)。
Fig. 5 Partial BOXA1R-PCR bands pattern (A) and clustering dendrogram (B) of the 70 isolated lactic acid bacteria strains.

表4 代表菌株的16S rRNA测序结果对比分析

Table 4 Comparative analysis of 16S rRNA sequencing results of representative strains

菌株类型 Strains of type	菌株编号 Strain number	近缘菌株 Related strain	相似性 Similarity (P/%)
Enterococcus	HC6	<i>Enterococcus</i> sp. (JQ739692)	100
	HA1	<i>Enterococcus hirae</i> (MF628999)	100
	RB2	<i>Enterococcus faecalis</i> (MF424328)	100
	RB1	<i>Enterococcus durans</i> (MF425024)	100
	HB1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (MT613449)	99.55
Lactobacillus	RA1	<i>Lactobacillus fermentum</i> (MK537375)	100
	RA2	<i>Lactobacillus plantarum</i> (KM350169)	99.86
	RA5	<i>Lactobacillus hilgardii</i> (MF583040)	100
	YA8	<i>Lactobacillus casei</i> (CP074377)	99.79
Lactococcus	TA6	<i>Lactococcus lactis</i> (MF354735)	100

杆菌属 (*Lactobacillus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*) 和乳球菌属 (*Lactococcus*)，其中5株都为乳杆菌属，占代表菌株的50%，为优势菌属。

2.4 感官评价结果

经上述筛选鉴定，选择YA8、RA2、RB5三株菌制作酸奶，

邀请了30名评价员对酸奶进行感官评价，整理评价结果如表5所示。由表可知，混菌酸奶评分均大于单菌酸奶，且在混菌酸奶中，组合RB5 + YA8的总体感官评分最高，更能满足消费者需求。在单菌酸奶中，YA8得分也优于RA2和RB5，所以综合数据后，认为YA8是性状优良、具有应用价值潜力的一株乳酸菌。

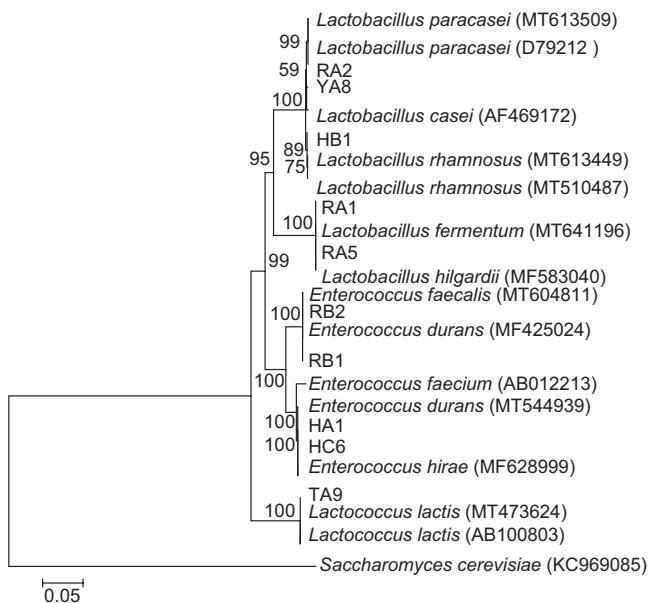


图6 分离的牦牛奶酪代表菌株系统发育树。采用N-J法构建系统发育树，以酿酒酵母（KC969085）作为系统发育分析的外组，括号里为基因登录号。

Fig. 6 The phylogenetic relations of the representative yak cheese isolates. The phylogenetic tree was constructed by Neighbor-joining method, and *Saccharomyces cerevisiae* (KC969085) was used as the outgroup for phylogenetic analysis. The gene accession numbers are in the brackets.

3 讨论

乳酸菌作为人体直接食用的菌种，一个重要的问题是在人体内定植以及存活的情况，所以选择在动物体内筛选乳酸菌，筛选时选择对乳酸菌的适应能力进行了重点考察。在本研究中对来自四川不同地区牦牛奶酪的菌株进行了分离，通过形态学特征和生理生化特性进行初步筛选，然后进行了BOXA1R-PCR和16S rRNA分子生物学鉴定，提高鉴定的准确率。筛选样品来自川西红原县、若尔盖县、康定市和壤塘县等地区，一共获得70株乳酸菌，其中有4株耐酸、15株耐渗透压、3株耐胆盐、3株产酸强、4株耐高温、3株抗病原菌强的优势菌株，说明不同地区的环境差异孕育了差异多样的乳酸菌菌株，这与史迪等人的研究结果^[21]一致。

生长速度、产酸能力及耐高温能力是筛选乳酸菌的重要指标，生长快、产酸强的菌株能迅速在营养环境中取得优势，形成低pH环境，对病原微生物形成竞争性抑制^[22]；而优良的耐高温乳酸菌株有利于提高和改善发酵品质^[23]。研究结果表明，多数乳酸菌在12-16 h进入对数生长期，少数在8-10 h进入对数生长期，这与王蔚森等人的研究结果^[24]相似；HD1、RA2、RC3、YA8四株菌的产酸能力较强，HA1、RB5、YA8均能在50℃条件下生长，可作为优秀潜力菌株。

除了上述指标外，乳酸菌还应具有耐受胃肠道环境的能力。

对70株菌进行了抗病原菌、耐酸、耐渗透压和耐胆盐试验。结果表明所有乳酸菌均对病原菌有不同程度的抑制作用：KA1的抑菌圈直径为6.02 mm，是所有菌株中最小的，而HB2的抑菌能力最强，其抑菌圈直径为20.00 mm。何杉杉等人对分离自雪莲菌的乳酸菌进行抑大肠杆菌测定，结果均在17-20 mm间，差异较小，可能的原因是本研究取样地域较广，菌株间能力差异明显^[25]。耐酸试验中，37%的菌株均能在较低pH环境中存活，其中YA8、HB2、HD1、RA2四株菌耐酸性更强；耐渗透压试验中，有15株菌能够耐受6% NaCl溶液，2株菌能够在9% NaCl溶液中缓慢生长，当盐浓度升高至0.5%时，HB1几乎不生长，RB5和YA8能够继续生长但长势较弱，这可能是由于乳酸菌种属差异及其长期所处的生存环境对菌株的影响所造成的^[26]；耐胆盐试验中，RB5、YA8均能够在0.5%胆盐溶液里生长，但长势较为缓慢，这与刘之园等人的研究结果^[27]相近。

BOXA1R-PCR多样性分析结果显示，乳酸菌分布在乳杆菌属（*Lactobacillus*）、肠球菌属（*Enterococcus*）和乳球菌属（*Lactococcus*），其中乳杆菌属占比50%，为川西地区牦牛奶酪的优势菌属。Liu等人对内蒙古自然发酵牛乳的研究发现，干酪乳酸菌、瑞士乳酸菌（*Lactobacillus helveticus*）是优势乳酸菌^[28]。朱潇等人以甘肃藏区不同藏民家庭制作的传统牦牛发酵乳制品为研究对象，采用Illumina MiSeq高通量测序，共鉴定出5种细菌门、11种细菌属；其中，厚壁菌门及变形菌门为优势菌门，乳杆菌属和链球菌属为各类样品中的高丰度属，其次是球菌属和乳球菌属，不同类型的传统牦牛发酵乳制品具有不同的细菌群落^[29]。这与本文结果相似，但由于地域、气候等差异，乳酸菌的组成既有相同，也有差异。筛选菌株的各类群代表菌株的系统发育研究结果表明，代表菌株种属差异较大，显示出川西高原牦牛乳中的乳酸菌类群多样性较高，可能具有优良生产潜力的菌株。

感官评价结合上述研究结果，得到一株性能较优良的潜力乳酸菌YA8，经16S rRNA鉴定为干酪乳杆菌。吴均等从西藏、川西青藏高原牧区自然发酵的牦牛奶酪样品中分离筛选出7株优良乳酸菌，其中4株为干酪乳杆菌^[30]。肖秋颖等人从川西高原传统发酵牦牛乳中分离筛选出1株高产γ-氨基丁酸的乳酸菌，经鉴定为发酵乳杆菌^[31]。袁乐梅等人从川西彝族传统酸菜汁中分离筛选出1株综合能力较强的植物乳杆菌^[32]。多项研究均表明川西地区的乳杆菌具有良好特性，具有极大生产和开发潜力。

4 结论

从10个川西高原传统发酵牦牛奶酪样品中得到70株乳酸菌，经过耐受性、拮抗性等功能测试及感官评价测试，筛选得到的YA8是综合测定结果最好的优势菌株，经生理生化和16S rRNA序列分析鉴定其为干酪乳杆菌。可见川西地区传统自然发酵牦牛奶酪中的乳酸菌资源丰富，具有巨大的应用潜能。

表5 感官评价得分汇总

Table 5 Sensory evaluation score summary

指标 Index	RB5 + YA8	RA2 + YA8	RB5 + RA2	YA8	RA2	RB5
色泽 Colour and lustre	24.53 ± 0.51a	24.20 ± 0.48a	23.00 ± 0.64b	24.37 ± 0.76a	22.77 ± 0.77b	19.40 ± 1.22c
气味 Scents	24.30 ± 0.89a	23.40 ± 0.72b	24.33 ± 0.80a	23.23 ± 0.82b	21.70 ± 1.29c	20.23 ± 1.22d
滋味 Taste	24.13 ± 0.86a	23.03 ± 1.00bc	23.07 ± 0.78b	23.23 ± 0.82b	22.50 ± 1.33c	16.13 ± 2.26d
组织状态 Texture	24.07 ± 0.74a	23.77 ± 0.73a	20.97 ± 1.33c	24.03 ± 0.81a	21.70 ± 1.29b	16.03 ± 2.31d
总分 Total scores	97.03 ± 3.00a	94.40 ± 2.93b	91.37 ± 3.55c	94.86 ± 3.21b	88.67 ± 4.68d	71.79 ± 7.01e

以平均数±标准偏差表示，同一行数据不同字母代表显著性差异（ $P < 0.05$ ）。

Values are mean ± standard deviation. Different letters in the same row indicate statistically significant difference ($P < 0.05$).

参考文献 [References]

- 1 Yang G, Cui XL, Liu S, Lu J, Hou XY, Meng WR, Zhu RJ, Zhang W, Zhang HY, Zheng W, Fang YW. Effects of dietary *Lactobacillus helveticus* on the growth rate, disease resistance and intestinal health of pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. *Aquaculture*, 2021, **544**: 1-13
- 2 何江波, 姚志芳, 吴国芳, 杨雨鑫, 王磊. 羊瘤胃源乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. 动物营养学报, 2021, **33** (6): 3365-3379 [He JB, Yao ZF, Wu GF, Yang YX, Wang L. Isolation, identification and biological characteristics of rumen lactic acid bacteria from sheep [J]. *Chin J Anim Nutr*, 2021, **33** (6): 3365-3379]
- 3 Li HM, Ying MY, Li QM, Wang JQ, Cheng JJ, Xue J, Shi J. The chemical composition and nitrogen distribution of Chinese yak (Maiwa) milk [J]. *IJMS*, 2011, **12** (8): 4885-4895
- 4 任卫合, 徐轶飞, 罗龙龙, 魏嘉, 龙鸣, 丁功涛, 陈士恩. 牦牛乳的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2020, **41** (24): 219-224 [Ren WH, Xu YF, Luo LL, Wei J, Long M, Ding GT, Chen SE. The research progress of yak milk [J]. *Food Res Dev*, 2020, **41** (24): 219-224]
- 5 李洋, 赵欣, 张玉, 王洪伟, 索化夷. 牦牛酸乳中耐酸耐胆盐乳酸菌的分离筛选和鉴定[J]. 食品与机械, 2018, **34** (7): 23-28+33 [Li Y, Zhao X, Zhang Y, Wang HW, Suo HY. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria resistant to acid and bile salt in yak yogurt [J]. *Food Mach*, 2018, **34** (7): 23-28+33]
- 6 张梅梅, 索化夷, 赵欣, 蹇宇, 李键, 丁阳平, 张玉. 传统发酵牦牛酸乳中细菌素产生菌的筛选与鉴定[J]. 食品与机械, 2017, **33** (3): 21-26 [Zhang MM, Suo HY, Zhao X, Qian Y, Li J, Ding YP, Zhang Y. Screening and identification of bacteriocin-producing bacteria in traditional fermented yak yogurt [J]. *Food Mach*, 2017, **33** (3): 21-26]
- 7 张岩, 李键, 刘鲁蜀, 钟红梅, 陈炼红. 从藏区传统酸乳中筛选牦牛乳酪生产菌株及其生化鉴定[J]. 食品科技, 2016, **41** (9): 18-24 [Zhang Y, Li J, Liu LS, Zhong HM, Chen LH. From the Tibetan traditional yogurt in the screening of yak milk cheese production strains and biochemical identification [J]. *Food Sci Technol*, 2016, **41** (9): 18-24]
- 8 陈孝勇, 李键, 赵欣, 蹇宇, 陈炼红, 陈娟, 索化夷. 传统发酵牦牛酸乳中益生性乳酸菌的体外筛选[J]. 食品与发酵工业, 2016, **42** (4): 85-90 [Chen XY, Li J, Zhao X, Qian Y, Chen LH, Chen J, Suo HY. Profit naturally lactic acid bacteria in traditional fermented yak yogurt in vitro screening [J]. *J Food Ferment Ind*, 2016, **42** (4): 85-90]
- 9 张俊涛, 黄熙瀛, 李蓉, 向泉桔, 张小平, 辜运富. 四川蔬菜尾菜可培养乳酸菌多样性及优良菌株筛选[J]. 应用与环境生物学报, 2019, **25** (6): 1428-1433 [Zhang JT, Huang XY, Li R, Xiang QJ, Zhang XP, Gu YF. Sichuan vegetables end food can foster diversity and good strains of lactic acid bacteria screening [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2019, **25** (6): 1428-1433]
- 10 敖晓琳, 鲁妮, 张小平, 李诚. 川西高原牧区自然发酵酸乳中优良酸乳发酵剂菌种的筛选[J]. 中国乳品工业, 2005, **4** (7): 23-26 [Ao XL, Lu N, Zhang XP, Li C. Selection of super LAB strains from natural fermented milk in Sichuan-Tibet Plateau [J]. *Chin Dai Ind*, 2005, **4** (7): 23-26]
- 11 田鸿, 蒲彪, 张小平. 川西高原牦牛酸乳子乳酸菌遗传多样性及系统发育研究[J]. 食品科学, 2012, **33** (5): 170-176 [Tian H, Pu B, Zhang XP. Genetic diversity and phylogeny of lactic acid bacteria from yak yogurt in western sichuan plateau [J]. *Food Sci*, 2012, **33** (5): 170-176]
- 12 杨洁, 张文亮, 邹建军, 胡敏, 袁雪林, 刘云国. 新疆传统酸奶中乳酸菌的筛选鉴定及菌相分析[J]. 食品工业科技, 2015, **36** (1): 324-327 [Yang J, Zhang WL, Zou JJ, Hu M, Yuan XL, Liu YG. Screening, identification and bacterial phase analysis of lactic acid bacteria in Xinjiang traditional yogurt [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2015, **36** (1): 324-327]
- 13 李志忠, 窦俊伟, 任海伟, 李金平, 孙文斌, 黄娟娟, 李梦玉. 玉米秸秆和白菜尾菜混贮料的乳酸菌多样性及耐高温优良菌株筛选[J]. 草业科学, 2017, **34** (6): 1337-1346 [Li ZZ, Dou JW, Ren HW, Li JP, Sun WB, Huang JJ, Li MY. Lactic acid bacteria diversity analysis and screening of superior thermotolerant strains from corn stover and cabbage waste mixed-silages [J]. *Pratacul Sci*, 2017, **34** (6): 1337-1346]
- 14 赵婧, 李慧, 张玉玉, 周春丽, 宋弋, 李全宏. 高产酸乳酸菌的筛选、鉴定和生长特性研究[J]. 食品工业科技, 2013, **34** (3): 173-176 [Zhao J, Li H, Zhang YY, Zhou CL, Song Y, Li QH. High acid lactic acid bacteria screening, identification and growth characteristics of the study [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, **34** (3): 173-176]
- 15 刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 梁世中. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, **3**: 110-111 [Liu DM, Li L, Yang XQ, Liang SZ. Antimicrobial activity of probiotics by Oxford Cup method [J]. *Food Res Dev*, 2006, **3**: 110-111]
- 16 万金敏, 杨丽娜, 葛武鹏, 张静, 耿炜, 李小平, 吴小勇. 西藏牦牛奶渣中优势乳酸菌产胞外多糖及其耐受性[J]. 食品科学, 2017, **38** (10): 98-103 [Wan JM, Yang LN, GE WP, Zhang J, Geng W, Li XP, Wu XY. Tibet yak milk residue in the advantage of lactic acid bacteria produce extracellular polysaccharide and its tolerance [J]. *Food Sci*, 2017, **38** (10): 98-103]
- 17 朱建宁, 曹磊, 文鹏程, 杨敏, 汪月, 张忠明, 张卫兵. 牦牛曲拉源乳酸菌的耐受性与抑菌性能比较[J]. 食品工业科技, 2020, **41** (7): 115-120+125 [Zhu JM, Cao L, Wen PC, Yang M, Wang Y, Zhang ZM, Zhang WB. Yak casein source of lactic acid bacteria tolerance and antibacterial performance comparison [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, **41** (7): 115-120+125]
- 18 杨凤环, 李正楠, 姬惜珠, 冉隆贤. BOXA1R-PCR技术在微生物多样性研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2008, **8**: 1282-1286 [Yang FH, Li ZN, Ji XZ, Ran LX. Application of BOXA1R-PCR technique in the study of microbial diversity [J]. *Microbiol Chin*, 2008, **8**: 1282-1286]
- 19 Christin ZC, Christian B, Henry M, Remo M, Monika KZ, Irina SD, Christian PK, Gabriele B. Fungal diversity in the rhizosphere of endemic plant species of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors [J]. *ISME*, 2009, **3** (1): 79-92
- 20 咸天成, 胡世成, 安逸, 赵月红, 姚怡铭, 邓莹莹, 焦迎春. 西藏灵菇中乳酸菌的分离及发酵牦牛酸乳性能研究[J]. 现代食品, 2020, **22**: 197-201+207 [Xian TC, Hu SC, An Y, Zhao YH, Yao YM, Deng YY, Jiao YC. Isolation of lactic acid bacteria from Tibetan *Lentinus lentinus* and study on the performance of yak yogurt fermentation [J]. *Mod Food*, 2020, **22**: 197-201+207]
- 21 史迪, 党娜, 武岳, 马腾, 刘文俊, 张和平. 阿尤恩地区自然发酵牛乳中乳酸菌分离鉴定及多样性研究[J]. 中国乳品工业, 2021, **49** (3): 4-9+41 [Shi D, Dang N, Wu Y, Ma T, Liu WJ, Zhang HP. Isolation, identification and diversity of lactic acid bacteria from natural fermented milk of Laayoune region [J]. *Chin Dai Ind*, 2021, **49** (3): 4-9+41]
- 22 Missotten JAM, Michiels J, Goris J, Herman L, Heyndrickx M, Smet S, Dierick NA. Screening of two probiotic products for use in

- fermented liquid feed [J]. *Livestock Sci*, 2007, **108** (1): 232-235
- 23 王蔚淼, 潘玲, 朱玮, 祁克宗. 10株乳酸菌产酸性能的研究[J]. 中国生态农业学报, 2007, **3**: 207-208 [Wang WM, Pan L, Zhu W, Qi KZ. Study on acid production of 10 lactic acid bacteria strains [J]. *Chin J Ecol Agric*, 2007, **3**: 207-208]
- 24 何杉杉, 王晓蕊, 彭禹熙, 马立娟, 杜丽平. 雪莲菌中乳酸菌的益生特性研究[J]. 食品科学, 2021, **42** (19): 1-15 [He SS, Wang XR, Peng YX, Ma LJ, Du LP. Snow lotus bacteria live lactic acid bacteria in the features research [J]. *Food Sci*, 2021, **42** (19): 1-15]
- 25 Missotten JAM, Goris J, Michiels J, Van CE, Herman L, Smet SD, Dierick NA, Heyndrickx M. Screening of isolated lactic acid bacteria as potential beneficial strains for fermented liquid pig feed production [J]. *Ani Feed Sci Technol*, 2008, **150** (1): 122-138
- 26 张蓓. 藏族传统曲拉制作过程中乳酸菌群变化及曲拉中益生性乳杆菌的筛选和功能性评价[D]. 郑州: 郑州大学, 2017 [Zhang B. Changes of lactic acid bacteria in the production process of traditional Tibetan quila and the screening and functional evaluation of the generative *Lactobacillus* in quila [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017]
- 27 刘之园, 贾俊霞, 姜昊蔚, 李志芸, 郭静, 刘志坤, 高秀珍. 耐酸耐胆盐益生菌的筛选及其益生特性研究[J]. 中国酿造, 2020, **39** (11): 103-108 [Liu ZY, Jia JX, Jiang HW, Li ZY, Guo J, Liu ZK, Gao XZ. Acid resistant bile salts screening of probiotics and live characteristics research [J]. *Chin brew*, 2020, **39** (11): 103-108]
- 28 Liu WJ, Bao QH, Jiri MT, Qing MJ, Siri GL, Chen X, Sun T, Li MH, Zhang JC, Yu J, Bilige MH, Sun TS, Zhang HP. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in eastern inner mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis [J]. *Microbiol Res*, 2012, **167** (2): 110-115
- 29 朱潇, 梁琪, 王湘竹, 刘瑛. 基于Illumina MiSeq高通量技术比较甘肃藏区传统牦牛发酵乳制品细菌菌群多样性[J]. 中国食品学报, 2021, **21** (4): 336-344 [Zhu X, Liang Q, Wang XZ, Liu Y. Comparison of bacterial diversity in traditional yak fermented dairy products based on Illumina MiSeq high-flux technology [J]. *Chin J Food Sci*, 2021, **21** (4): 336-344]
- 30 吴均, 赵晓娟, 陈佳昕, 杜木英, 阚建全. 西藏、川西青藏高原牧区自然发酵牦牛酸奶中优良乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2013, **34** (17): 150-155 [Wu J, Zhao XJ, Chen JX, Du MY, Kan JQ. Selection and identification of fine lactic acid bacteria in natural fermented yak yogurts in Tibetan plateau grazing areas of Xizang and western Sichuan [J]. *Food Sci*, 2013, **34** (17): 150-155]
- 31 肖秋颖, 王翔宇, 陈炼红. 川西高原传统发酵牦牛酸乳中高产 γ -氨基丁酸乳酸菌筛选及鉴定[J]. 食品工业科技, 2021, **42** (6): 111-117+124 [Xiao QY, Wang XY, Chen LH. Screening and identification of high yield γ -aminobutyric acid lactic acid bacteria from traditional fermented yak yogurt in western Sichuan Plateau [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, **42** (6): 111-117+124]
- 32 袁乐梅, 边名鸿, 李正涛, 杨志阳, 张雨. 川西彝族传统酸菜汁中乳酸菌的分离鉴定与特性分析[J]. 中国调味品, 2019, **44** (2): 24-28 [Yuan LM, Bian MH, Li ZT, Yang ZY, Zhang Y. Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickled cabbage juice of yi nationality in western sichuan [J]. *Chin Cond*, 2019, **44** (2): 24-28]