

文章编号:1673-1689(2010)02-0265-06

内蒙古鄂尔多斯地区酸粥发酵液中 乳酸菌的分离鉴定

王炜宏, 杜晓华, 张家超, 于洁, 刘文俊, 孙天松, 张和平*

(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: 对采集自内蒙古鄂尔多斯地区的 6 份酸粥发酵液中的乳酸菌进行了分离、鉴定和生物学特性研究。采用 15, 30, 45 ℃ 3 个分离温度共分离出 18 株乳酸菌。通过 16S rRNA 序列分析等研究将这些菌株鉴定为 *Lactobacillus* (*L.*) *casei* 8 株, *L. plantarum* 2 株, *L. brevis* 3 株, *L. fermentum* 1 株, *L. helveticus* 4 株。分析认为 *L. casei* 是鄂尔多斯地区酸粥发酵液中的优势菌群。对 30 ℃ 分离株进行传统生化鉴定, 结果与 16S rRNA 序列分析结果一致。

关键词: 乳酸菌; 分离; 鉴定; 16S rRNA 序列分析

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Isolation and Identification of LAB from Naturally Fermented Congee in Ordos Area of Inner Mongolia

WANG Wei-hong, DU Xiao-hua, ZHANG Jia-chao, YU Jie,
LIU Wen-jun, SUN Tian-song, ZHANG He-ping*

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

Abstract: Lactic acid bacteria were isolated and identified from 6 samples of fermentation broth for producing naturally fermented congee collected from different regions of Ordos area in Inner Mongolia, and then the biological characteristics of these isolates were investigated. A total of 18 lactic acid bacteria were isolated by incubating in MRS culture medium at 15, 30, 45 ℃. Based on 16S rRNA sequence analysis, all these isolates were identified as five species including *Lactobacillus* (*L.*) *casei* (8 strains), *L. plantarum* (2 strains), *L. brevis* (3 strains), *L. fermentum* (1 strains) and *L. helveticus* (4 strains). Results showed that *L. casei* was the predominant bacteria in the culture of acid-gruel. The strains isolated from incubation at 30 ℃ were also identified by physiological and biochemical test and the result of identification was consistent to the result of molecular method.

Key words: lactic acid bacteria, isolation, identification, 16S rRNA sequence analysis

收稿日期: 2009-06-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30660135; 30760156); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-06-0269); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目。

*通信作者: 张和平 (1965 -), 男, 内蒙古四子王旗人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事乳品科学方面的研究。Email: hepingdd@vip.sina.com

酸粥是内蒙古西部地区一种传统民间特色发酵食品^[1],采用自然发酵法制成。这种独特的生产方式较好地保存了当地自然环境的有益微生物(主要是乳酸菌),并赋予产品以独特的风味。糜米经过发酵液发酵后烩饭或煮粥,米粒晶亮醇香,味如酸奶,筋软爽口,有消暑、开胃作用。作者以制作酸粥的发酵液作为实验对象,分离鉴定出其中的优势乳酸菌,并对其生物学特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 2008年8月采集自内蒙古鄂尔多斯地区的酸粥发酵液样品6份。

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 培养基与试剂 MRS 液体培养基、MRS 琼脂培养基、TPY 液体培养基、BLB 液体培养基、10%脱脂乳培养基、糖类发酵基础培养基等,参照文献[2-4]制备。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的分离纯化 吸取100 μL 样品接种于5 mL 灭菌脱脂乳培养基中增菌培养后,挑取少量培养物划线接种于含有10 μg/g 放线菌酮的MRS 琼脂培养基上,置于BBL 厌氧培养罐中,分别于15,30,45 °C 厌氧培养48~72 h,观察并记录菌落形态。挑取单个菌落接种于MRS 液体培养基中,在各自分离温度下培养24 h后,显微镜中仔细观察记录革兰氏染色细胞形态特征,同时进行过氧化氢酶实验。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^[5-6],并进一步纯化培养保存。

1.2.2 乳酸菌生化特性试验与糖发酵试验 选取30 下分离纯化好的6株乳酸菌,参照文献[4]和小崎等编著的乳酸菌鉴定手册^[6],进行包括温度试验、耐酸耐盐试验、葡萄糖产气试验等在内的生化试验和糖发酵试验对其进行鉴定。参照文献[2-3,5,7]将这6株乳酸菌进行初步的种群归类。

1.2.3 乳酸菌基因组DNA 提取及16S rRNA 测序 将纯化好的菌株接种于5 mL 无菌MRS 液体培养基中,于各自分离温度下培养24 h,连续培养3代后采用CTAB 法提取总DNA^[8]。并利用PCR 扩增其16S rRNA 基因片段。扩增引物采用通用引物^[9-10],正向引物为27F:5'-AGA GTT TGA

TCC TGG CTC AG-3';反向引物为1495R:5'-CTA CGG CTA CCT TCT TAC GA-3'。

PCR 反应体系(25 μL)的配制:上下游引物各1 μL(10 μmol/μL),模板DNA 1 μL(50 ng/μL),10×PCR Buffer 2.5 μL,dNTP MIX 2 μL,超纯水17.2 μL,rTaq 酶0.3 μL。

PCR 扩增程序为:94 °C 预变性5 min;94 °C 变性1 min,58 °C 退火1 min,72 °C 延伸2 min,循环30次;72 °C 延伸10 min,4 °C 保温。

PCR 产物用1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测,片段长度约1 500 bp 的阳性产物经纯化后送上海桑尼生物技术有限公司进行测序。所得序列运用DNASTART 软件进行序列拼接和校准排齐,然后用于系统进化分析和种属鉴定。

1.2.4 16S rRNA 系统进化分析和种属鉴定 得到的序列在GenBank 数据库中进行BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)同源性比对,并利用本地软件Mega 4.0 与模式菌种进行系统进化亲缘关系研究。利用软件中的cluster W 构建系统进化发育树,以同源性大于99%为种的分界阈值将待测菌株鉴定到种。所得菌株16S rRNA 序列全部提交GenBank 数据库。

2 结果与分析

2.1 菌株分离

采集自内蒙古鄂尔多斯地区的酸粥发酵液样品6份,经分离纯化,结合革兰氏染色和过氧化氢酶试验,共分离出18株乳酸菌,全部为杆菌。其中15 °C 分出7株,30 °C 6株,45 °C 5株。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 乳杆菌生化鉴定结果 以*Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 和 *L. dellbrueckii subsp. bulgaricus* JCM1002 为参考菌株,对6株30 °C 分离出的乳杆菌进行生理生化实验和糖发酵试验,结果见表1。根据实验结果,参照《乳酸鉴定手册》^[4]和Bergey's Manual of Systematic Bacteriology^[6],菌株IMAU70081,IMAU70082 生理生化试验结果一致,革兰氏阳性,接触酶阴性,发酵葡萄糖产气,属异型乳酸发酵类型,pH 值为4.5 生长,15 °C 生长,45 °C 生长微弱。发酵核糖、葡萄糖、麦芽糖、蜜二糖等,弱发酵葡萄糖酸钠,与短乳杆菌发酵特性相似,故判定IMAU70081,IMAU70082 为短乳杆菌。

IMAU70080 革兰氏阳性,接触酶阴性,能发酵葡萄糖但不产生气体,属同型乳酸发酵类型。在15

生长,45 生长良好,pH 值 4.5 生长。发酵核糖、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、山梨醇,七叶苷、水杨苷、扁桃苷和葡萄糖酸盐产酸,与植物乳杆菌发酵特性一致,故判定为植物乳杆菌。

IMAU70083,IMAU70084,IMAU70085 均为

革兰氏阳性,接触酶阴性,不发酵葡萄糖产气,属同型乳酸发酵类型。在 15、45 均生长良好,发酵核糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、蕈糖、松三糖、甘露醇、山梨醇、七叶苷、水杨苷、扁桃苷和葡萄糖酸钠,不发酵阿拉伯糖、木糖、鼠李糖。这些菌经鉴定为干酪乳杆菌。

表 1 酸粥发酵液样品中乳酸菌鉴定结果

试验名称	菌株编号					
	IMAU70080	IMAU70081	IMAU70082	IMAU70083	IMAU70084	IMAU70085
葡萄糖产气	-	+	+	-	-	-
pH 3.0	-	-	-	-	-	-
pH 4.5	+	+	+	+	+	+
过氧化氢	-	-	-	-	-	-
2.0 g/ dL NaCl	+	+	+	+	+	+
4.0 g/ dL NaCl	+	+	+	+	+	+
6.5 g/ dL NaCl	+	+	+	-	-	-
15 生长	++	+++	+++	+++	+++	++++
45 生长	+++	-	-	++	++	++
阿拉伯糖	-	-	-	-	-	-
木糖	+w	+	+	-	-	-
鼠李糖	+ -	-	-	-	-	-
核糖	+	+	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+	+	+
甘露糖	+	-	-	+	+	+
果糖	+	-	-	+	+	+
半乳糖	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	-	-	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	-	-	+	+	+
乳糖	+	-	-	+w	+	-
蕈糖	+	-	-	+	+	+
蜜二糖	+	+	+	+w	-	-
棉籽糖	+	-	-	+w	-	-
松三糖	+	-	-	+	+	+
甘露醇	+	-	-	+	+	+
山梨醇	+	-	-	+	+	+
七叶苷	+	-	-	+	+	+
水杨苷	+	-	-	+	+	+
扁桃苷	+	-	-	+	+	+
葡萄糖酸钠	+	+w	+w	+	+	+

注: + 为阳性, + w 为弱阳性, - 为阴性。

2.2.2 16S rRNA 序列分析结果 采集自鄂尔多斯市不同地区的 6 份酸粥发酵剂样品,在 3 个温度下分离培养共得到 18 株乳杆菌。对这些分离株进行 16S rRNA 序列分析。通过 BLAST 序列比对分析和系统进化树分析可知:8 株菌与 *L. casei* ATCC334 的同源性在 99 %以上,从而将这 8 株菌归属为 *L. casei*;有 2 株菌的 16S rDNA/rRNA 序列与菌株 *L. plantarum* WCFS1 的同源性是 100 %,认为这两株菌为 *L. plantarum*;有 3 株菌与菌株 *Lactobacillus brevis* ATCC367 的同源性达 99 %以上,故判定此 3 株菌株为 *L. brevis*;另有 1 株菌与 *Lactobacillus fermentum* IFO3956 的同源性达 100 %,认为这株菌为 *L. fermentum*;与 *L. helveticus* DPC4571 的同源性都在 99 %以上的 4 株菌定为 *L. helveticus*。

采用 MEGA4.0 软件分析伊盟地区的乳杆菌和 5 株模式菌株的 16S rDNA/rRNA 序列,绘制系统进化树见图 1。从系统进化树可得:总体上乳杆

菌分为 5 个大群,第一群由 9 株菌构成,模式菌株为 *L. casei* ATCC334,剩余 8 株菌与 *L. casei* ATCC334 的同源性都在 99 %以上;第二群由 *L. plantarum* WCFS1,由 2 株中温性菌构成;第三群以 *Lactobacillus brevis* ATCC367 为参比,包括 3 株中温菌;第四群由 *L. fermentum* IFO3956 和一株高温菌构成;第五群包括模式菌株 *L. helveticus* DPC4571 和 4 株高温性乳杆菌。

其中对 30 分离菌株的同源性比对结果与传统生化鉴定结果一致。

3 讨 论

从采集自内蒙古伊盟地区的 6 份酸粥发酵液样品中分离出 18 株乳酸菌,其中 15 培养分离出 7 株,30 分离出 6 株,45 分离 5 株,全部为杆菌。鉴定结果为:干酪乳杆菌(占总分离菌株的 44.4 %),植物乳杆菌(占总分离菌株的 11.1 %),短

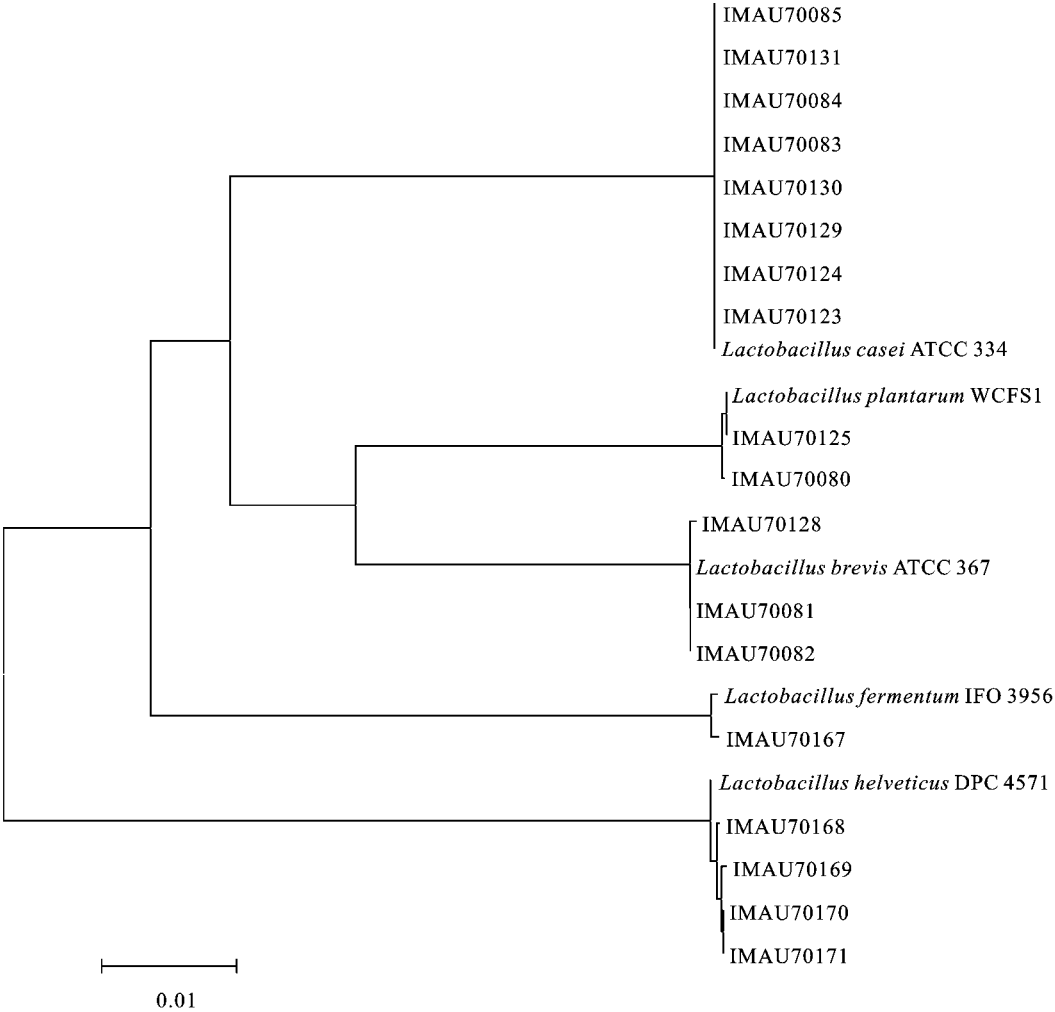


图 1 系统进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of lactic acid bacteria

乳杆菌(占总分离菌株的 16.7%),发酵乳杆菌(占总分离菌株的 5.6%),瑞士乳杆菌(占总分离菌株的 22.2%)。其中优势菌为干酪乳杆菌,此结果与王凤玲^[11]等的研究结果一致,他们研究结果同时也表明,德氏乳杆菌也为优势菌,Annamaria Ricciar-di^[12]等也有类似研究结果。其中 15 和 30 (中温)分离株中干酪乳杆菌占 61.5%,短乳杆菌占 23.1%,而 45 (高温)分离株中瑞士乳杆菌占 80%,可见中温性乳酸菌以干酪乳杆菌为优势菌,其次为短乳杆菌;高温性菌株则以瑞士乳杆菌为优势菌。

李琦^[13]等认为,植物乳杆菌为发酵糯米粘豆包中的优势乳杆菌。Ebenezer Siaw Mante^[14], Wisdom Kofi A Amo-Awua^[15], M Kostinek, I Specht^[16], Akinrele I^[17]认为,植物乳杆菌为发酵木薯中的优势乳杆菌。植物乳杆菌和发酵乳杆菌被认为是巴西酸木薯淀粉^[18]和尼日利亚发酵食品 gari^[19]中的优势菌。短乳杆菌被认为是乌干达传统发酵饮料 bushera 中的优势菌^[20]。而短乳杆菌和发酵乳杆菌被认为是尼日利亚发酵食品 fufu 和 ogi 的优势菌^[21],类似的报道也出现在 Halm 等^[22]的研究中。植物乳杆菌和短乳杆菌也在其他的蔬菜发酵制品中有较多发现。可见,不同国家和地区以及不同的发酵谷物中乳酸菌的种类及构成也有较大差异,这可能与当地的环境、气候、制作方法、发酵温度等因素有关。不同国家和地区发酵谷物中乳酸菌的生物多样性,为研究和开发乳酸菌资源奠定了良好的基础。

本研究中干酪乳杆菌和瑞士乳杆菌分别为中温性乳酸菌和高温性乳酸菌中的优势菌,与其生长特性相符^[23]。

作者还对 30 的分离株采用了传统鉴定方法进行鉴定,其结果与 16S rRNA 分析方法所得鉴定结果完全相符。表明这些表型特征、生理生化特性仍是现代乳杆菌分类的重要指标,按照它们的生化特征来划分仍是可取的,此研究结果也与 A Corsetti^[24]等一致。

4 结 语

作者以内蒙古伊盟地区采集的 6 份酸粥发酵液作为乳酸菌分离源,采用 15、30、45 3 个不同温度对乳酸菌进行了分离,采用 16S rRNA 序列分析的方法对所有菌株进行了种属鉴定,并且还对 30

分离株采用传统形态学特征和生理生化特性分析方法对其种属特性进行了进一步的分析。作者共分离出 18 株乳酸菌,其中 15 分离出 7 株,30

分离出 6 株,45 分离出 5 株,全部为乳杆菌属,干酪乳杆菌 (*L. casei*) 8 株,植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 2 株,短乳杆菌 (*L. brevis*) 3 株,发酵乳杆菌 (*L. fermentum*) 1 株,瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) 4 株。传统方法对 30 分离株的鉴定结果与其一致。

中温性乳酸菌以干酪乳杆菌为优势菌,其次为短乳杆菌;高温性菌株则以瑞士乳杆菌为优势菌。

参考文献(References):

- [1] 王凤玲,刘爱国. 糜米发酵液的研究[J]. 食品工业科技,2003,24(5):47-48.
WANG Feng-ling, LIU Ai-guo. Research on the Mimi fermented liquid[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2003, 24(5):47-48. (in Chinese)
- [2] 小崎道雄,内村泰. 乳酸菌実験 マニュアル[M]. 東京:朝倉書店,1992:29-72.
- [3] 辨野,義巳. 乳酸菌 の分類[J]. 微生物,1990,6(1):3-14.
- [4] Kandler O, Weiss N Bereys. Manual of Systematic Bactetiology[M]. Baltimore: Willianms & Wilkins, 1986:1047-1245.
- [5] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [6] 小崎道雄,内村泰,冈田早苗. 乳酸菌实验 マニュアル[M]. 東京:朝倉書店,1992.
- [7] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:289-313.
- [8] F 奥斯特伯, R 布伦特. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖,王海林,译. 北京:科学出版社,1998:37-39.
- [9] Mauro S, Diego M, Silvia C, et al. Development of genus/ species-specific PCR analysis for identification of carnobacterium strains[J]. *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[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2005.
- [11] 王凤玲,刘爱国,李娜,等. 糜米发酵液中优势乳酸菌分离鉴定[J]. 食品科学,2007,28(11):342-345.

- WANG Feng-ling , LIU Ai-guo , LI Na , et al. Isolation and identification of properties of dominant biology lactic acid bacteria form mimi fermented liquid[J]. **Food Science**,2007 ,28(11) :342 - 345. (in Chinese)
- [12] Annamaria R , Eugenio P , Paolo P , et al. Phenotypic characterization of lactic acid bacteria from sourdoughs for Altamura bread produced in Apulia (Southern Italy) [J]. **Food Microbiology** ,2005 ,98:63 - 72.
- [13] 李琦,程建军,李文鹏. 发酵糯玉米粘豆包的优选乳杆菌鉴定筛选[J]. 东北农业大学学报,2008 ,39(5) :106 - 109.
- LI Qi ,CHENG Jianjun ,LI Wen-peng. Identification and selection of the dominant *Lactobacillus* from Niandoubao made by the waxy maize[J]. **Journal of Northeast Agricultural University** , 2008 ,39(5) :106 - 109. (in Chinese)
- [14] Ebenezer S M , Esther S D , Wisdom K A A , et al. Antimicrobial interactions of microbial species involved in the fermentation of cassava dough into agbelima with particular reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria on enteric pathogens[J]. **Food Microbiology** ,2003 ,89:41 - 50.
- [15] Wisdom K A A , Francis E A , Mogens J , et al. Lactic acid fermentation of cassava dough into Agbelima[J]. **Food Microbiology** ,1996 ,31:87 - 98.
- [16] M Kostinek , I Specht. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures[J]. **Food Microbiology** ,2007 ,114:342 - 351.
- [17] Akinrele I. Fermentation studies of maize during the preparation of traditional African starch-cake food[J]. **Sci Food** , 1970 ,21:619 - 625.
- [18] Inayara C A L , Rose L M , Beatriz M B , et al. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil[J]. **Food Microbiology** ,2005 ,105:213 - 219.
- [19] F A Oguntuyinbo. Identification and functional properties of dominant lactic acid bacteria isolated at different stages of solid state fermentation of cassava during traditional gari production[J]. **World J Microbiol Biotechnol** ,2007 ,23:1425 - 1432.
- [20] C M B K Muyanja , J A Narvhus , J Treimo , et al. Isolation , characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera :a Ugandan traditional fermented beverage[J]. **Food Microbiology** ,2003 ,80:201 - 210.
- [21] Adegoke G , Babalola A K. Characteristics of microorganisms of importance in the fermentation of fufu and ogi , two Nigerian foods[J]. **Food Science** ,1988 ,46:1523 - 1526.
- [22] Halm M , Lillie A , S rensen A , et al. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize dough from kenkey production in Ghana Int[J]. **Food Microbiology** ,1993 ,19:135 - 143.
- [23] 张刚. 乳酸细菌-基础、技术和应用[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [24] A Corsetti , P Lavermicocca , M Morea , et al. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy[J]. **Food Microbiology** , 2001 ,64:95 - 104.

(责任编辑:李春丽)