

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240217002

新疆哈萨克酸马奶中功能性乳酸菌株的 筛选、鉴定及功能评价

马新森, 魏敏敏, 张左利, 张轶腾, 牛希跃, 李雨鑫, 李 婕*, 许 倩*

(塔里木大学食品科学与工程学院/新疆特色农产品深加工兵团重点实验室, 阿拉尔 843300)

摘 要: **目的** 从新疆哈萨克传统发酵酸马奶中筛选和鉴定益生性乳酸菌, 并探究其胃肠道消化耐受性和抗氧化潜力。**方法** 通过稀释涂布平板法和生理生化鉴定来分离纯化乳酸菌属, 利用耐酸性和耐胆盐性筛选出潜在的胃肠道消化耐受性强的候选菌株, 采用体外模拟消化、硫酸铁铵比色法和甘油三酯(triglyceride, TG)试剂盒评估候选菌株的胃肠道存活率、降胆固醇能力和降甘油三酯能力。同时, 通过 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除能力、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS]阳离子自由基清除能力和铁还原能力测试候选菌株的抗氧化潜力, 并与德式乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)进行比较分析。最后, 采用 16S rRNA 高通量测序对候选菌株进行精确鉴定。**结果** 从新疆哈萨克传统发酵酸马奶中分离纯化出 96 株菌株, 40 株被鉴定为乳酸菌属。10 株候选菌株表现出较高的耐酸性和耐胆盐性, 并被鉴定为鼠李糖乳杆菌(*Lactocaseibacillus rhamnosus*)、植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)、戊糖乳杆菌(*Lactiplantibacillus pentosus*)和副干酪乳杆菌(*Lactocaseibacillus paracasei*)。其中, M2 菌株(*Lactocaseibacillus rhamnosus*)表现出最佳的益生特性, 胆固醇和甘油三酯降解率高, 模拟胃肠液中存活率高, 对 DPPH 和 ABTS 阳离子自由基的清除能力高于德式乳杆菌保加利亚亚种。**结论** 本研究成功从新疆哈萨克传统发酵酸马奶中筛选鉴定出高耐受性、高抗氧化性的 *L. rhamnosus* M2, 为发掘和利用酸马奶中的功能性益生菌提供了理论依据。

关键词: 酸马奶; 乳酸菌; 胃肠道耐受性; 抗氧化; 高通量测序

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760442)、第一师项目(2022GJJ03)、南疆乳制品创新中心项目(2022BB001)、塔里木大学一流本科课程(TDYLYKC202225)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760442), the First Division Project (2022GJJ03), Southern Xinjiang Dairy Innovation Center Project (2022BB001), and the First Class Undergraduate Courses at Tarim University (TDYLYKC202225)

***通信作者:** 李 婕, 讲师, 主要研究方向为畜产品加工及品质控制。E-mail: ljgsau@163.com

许 倩, 博士, 教授, 主要研究方向为畜产品加工及贮藏技术。E-mail: xuqiantaru@126.com

***Corresponding author:** LI Jie, Lecturer, College of Food Science and Engineering, Tarim University, No.705, Hongqiao South Road, Alar 843300, China. E-mail: ljgsau@163.com

XU Qian, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Tarim University, No.705, Hongqiao South Road, Alar 843300, China. E-mail: xuqiantaru@126.com

Screening, identification and functional evaluation of functional lactic acid bacteria strains in Xinjiang Kazakh koumiss

MA Xin-Miao, WEI Min-Min, ZHANG Zuo-Li, ZHANG Yi-Teng,
NIU Xi-Yue, LI Yu-Xin, LI Jie*, XU Qian*

(College of Food Science and Engineering, Tarim University/Production & Construction Group Key Laboratory of Special Agricultural Products Further Processing in Southern Xinjiang, Alar 843300, China)

ABSTRACT: Objective To isolate and identify functional strains of lactic acid bacteria from traditional fermented Kazakh koumiss in Xinjiang and explore their gastrointestinal tolerance and antioxidant potential. **Methods** The isolation and purification of lactic acid bacteria were conducted using dilution plate method and physiological and biochemical identification. Candidate strains with potential gastrointestinal tolerance were screened based on acid and bile salt tolerance. *In vitro* simulated digestion, ammonium iron sulfate colorimetry, and triglyceride (TG) kit were used to assess the gastrointestinal survival rate, cholesterol reduction, and triglyceride reduction capabilities of the strains. The antioxidant potential of the candidates was characterized through 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt (ABTS) cation radical scavenging, and iron-reducing abilities, and compared with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Finally, 16S rRNA high-throughput sequencing was employed for precise identification of the candidate strains. **Results** A total of 96 strains were isolated and purified from traditional fermented Kazakh koumiss in Xinjiang, and 40 strains were identified as lactic acid bacteria. The 10 candidate strains showed high acid resistance and bile salt resistance, and were identified as *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus* and *Lacticaseibacillus paracasei*. Among them, M2 strain (*Lacticaseibacillus rhamnosus*) showed the best probiotic properties, with high degradation rate of cholesterol and triglyceride, high survival rate in simulated gastrointestinal fluid, and higher scavenging ability of DPPH radical scavenging and ABTS cation radical scavenging than *Lactobacillus bulgaricus*. **Conclusion** This study successfully identifies strains of *Lactobacillus rhamnosus* M2 with high tolerance and antioxidative properties from traditional fermented Kazakh koumiss in Xinjiang, providing a theoretical basis for the exploration and utilization of functional probiotic bacteria in fermented koumiss.

KEY WORDS: koumiss; lactic acid bacteria; gastrointestinal tolerance; antioxidation; high-throughput sequencing

0 引言

酸马奶(koumiss)是由新鲜马奶在自然条件下发酵制备而成的低酒精度酸性乳制品^[1],主要分布于内蒙^[2]、新疆^[3]及青海^[4]等少数民族地区。牧民将新鲜马奶放入由动物皮囊制作成的容器中,用木棒不断搅拌完成发酵,并以发酵完成的少量酸马奶为引子留作下一次发酵^[5]。发酵酸马奶富含对人体有益的乳酸菌及代谢产物,具有独特的医疗功效和保健价值^[6-7],因而深受牧民的青睐。马奶发酵成为酸马奶的过程中,会产生众多有益的功能性化合物,其种类和数量取决于初始的微生物菌群^[8]。研究表明,传统发酵酸马奶由乳酸菌与酵母菌复合发酵而成^[9],乳酸菌为酸马奶中的优势菌群^[10-11],其在降胆固醇^[12-13]、降血脂^[14]、抗氧化^[15-17]以及对病原菌的抑制^[18]方面有突出成效。但酸马奶目前的发酵工艺仍以传统发酵方式为

主,传统酸马奶是在露天条件下进行发酵,存在菌种来源不明等问题,导致产品品质不稳定,而且限制了酸马奶工业化生产。酸马奶在牧区被认为是一种药食同源的佳品^[19]。因此,此前对于酸马奶的研究多集中在其营养功效及药用价值^[20-22]。以往对于酸马奶的研究集中在菌种的筛选^[2]和风味特性的分析^[23-24]上,然而对其功能性方面的探究较少,本研究在菌种筛选的基础上进而对其进行功能性验证,推动乳源功能性菌株在工业生产中的应用。此前的研究证实了乳源乳酸菌具有较高的营养及益生特性,贾燕等^[18]从内蒙古酸马奶中筛选出一株具有高抑菌活性的菌株为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*);娜日苏等^[25]从 44 份酸马奶中分离鉴定了 264 株乳酸菌,其中瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)及副干酪乳杆菌(*Lacticaseibacillus paracasei*)有较高的胃液耐受能力。

近年来,随着我国人群血脂异常病例的显著增加,特别是以高胆固醇和高血脂为特征的案例,心血管疾病的发病率也随之急剧上升^[26]。因此,从丰富的食品中发掘具有益生功能的微生物菌株,对于改善公共健康具有重要意义。本研究以新疆哈萨克传统发酵酸马奶为原料,采用稀释涂布平板法和生理生化鉴定分离纯化乳酸菌属,从中筛选出高耐酸性、高耐胆盐性的候选菌株。通过模拟体外消化存活率、胆固醇和降甘油三酯降解能力及抗氧化性能分析表征其功能特性,最终采用 16S rRNA 高通量测序鉴定出兼具高胃肠道耐受性和高抗氧化性的乳杆菌株,旨在促进发酵酸马奶作为功能性益生菌资源的开发和利用,为功能性乳酸菌的发掘提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

传统发酵酸马奶于 2022 年 7 月取自新疆维吾尔自治区阿勒泰地区、塔城地区和伊犁地区。样品放置于无菌离心管中,在冷藏环境下运到实验室并立即分离纯化菌种。

德式乳杆菌保加利亚亚种 *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (CCTCC AB 200048), 由中国典型培养物保藏中心提供。

革兰氏染色液(生化试剂,北京路桥技术股份有限公司); MRS 液体、MRS 琼脂(生化试剂,北京奥博星生物技术有限公司); 碳酸钙(分析纯,天津市福晨化学试剂场); 氧化酶试剂条(生化试剂,广东环凯微生物科技有限公司); 牛胆盐(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司); 胃蛋白酶、胰蛋白酶(分析纯,≥250 U/mg,北京索莱宝科技有限公司); 总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)试剂盒、甘油三酯(triglyceride, TG)试剂盒、总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司); 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(北京擎科生物科技股份有限公司西安分公司)。

MRS 液体培养基: 参考李玉蝶等^[27]的配制方法。

MRS 琼脂培养基: 在 MRS 液体培养基基础上添加 20 g/L 琼脂粉。

MRS-碳酸钙培养基: 在 MRS 琼脂培养基基础上添加 10 g/L 碳酸钙。

胆固醇 MRS 液体培养基: 参考陈大卫^[28]的配制方法。

甘油三酯 MRS 液体培养基: 参考刘江等^[29]的配制方法。

人工胃肠液: 人工胃液的配制参考费永涛等^[30]的配制方法。

1.2 仪器与设备

LRH-150F-1 电热恒温培养箱(中国上海一恒有限公司); Synergy H1 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);

CP224C 电子天平[精度 0.01 mg, 奥豪斯仪器(上海)有限公司]; SB-3200DTDN 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司); LDZX-50KB 高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂); JY04S-3C 凝胶成像仪、JY300C 电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司); JY92-IIDN 超声波粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); SW-CJ-2F 超净工作台(上海博讯医疗仪器有限责任公司); TGL-20Br 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); DFD-700 水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司); PSHJ-3F pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 乳酸菌的分离纯化

通过稀释涂布平板法分离纯化乳酸菌, 每个梯度进行 3 次平行实验。将不同梯度的样品与 0.9% 的无菌生理盐水完全溶解后, 按稀释浓度从低到高的顺序各取 0.2 mL 稀释液接入 MRS-碳酸钙培养基, 将平板涂布均匀后放入 37°C 的恒温培养箱中培养 24~48 h。从中挑选出形成溶钙圈的单一菌落进行划线纯化, 得到纯净的单菌落后利用甘油法进行保存, 并存放于-80°C 的超低温冰箱中以备后续使用。

1.3.2 乳酸菌生理生化鉴定

对具有溶钙圈且镜检纯化的单一菌落进行革兰氏染色、过氧化氢酶、氧化酶、明胶液化实验, 通过观察试剂的颜色变化, 根据《常见细菌系统鉴定手册》对这些菌株在属水平上的分类进行初步鉴定。

1.3.3 乳酸菌耐酸耐胆盐能力测定

耐酸和耐胆盐测定参照 MANZOOR 等^[31]的方法并略作修改。将菌液(10^8 CFU/mL)按 2% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中, 37°C 培养 18 h 后, 8000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用灭菌的生理盐水(pH 7.0)将菌体洗涤 2 次后重悬于生理盐水中。取 1 mL 菌悬液分别接种至 9 mL 的 MRS 培养基(用 1 mol/L 的盐酸调节 pH 为 3。同样的, 继续加入牛胆盐调节至终浓度为 0.3%, 37°C 培养 3 h, 分别在 0 h 和 3 h 用平板计数法测定活菌数, 设置 3 次重复。存活率计算如公式(1)所示:

$$\text{存活率}/\% = \frac{\log N_t}{\log N_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: N_0 和 N_t 分别代表菌株处理前(0 h)和处理后(3 h)的菌落数。

1.3.4 人体胃肠液体外模拟消化实验

参考 FEI 等^[32]的方法并修改。将菌株接种到 MRS 液体培养基中, 在 37°C 下培养 18 h 后, 使用无菌生理盐水洗涤 3 次。将 1 mL 菌液接种至 9 mL 模拟胃液中(pH 3.0), 37°C 处理 3 h, 分别在 0 h 和 3 h 取样, 通过平板计数法计算菌

株在模拟胃液中的耐受性, 再进行样品在肠液中的耐受性试验。首先将样品在 pH 3.0 的胃液中处理 3 h 后, 取 1 mL 混合液加入到 9 mL 模拟肠液(pH 8.0)中, 37℃放置 4 h, 于 0 h 和 4 h 通过平板计数法测定活菌数并计算存活率, 得出菌株在模拟肠转运耐受性, 存活率计算如公式(2)所示:

$$\text{存活率}/\% = \frac{\lg(\text{CFU } N_1)}{\lg(\text{CFU } N_0)} \quad (2)$$

式中: N_1 为处理后的菌落数, N_0 为处理前菌落数。

1.3.5 乳酸菌体外降胆固醇能力的测定

将分离纯化的菌种按 5% 的接种量接入胆固醇-MRS 液体培养基中, 37℃培养 18 h, 吸取培养液 0.2 mL, 加入 4.8 mL 无水乙醇振荡均匀, 静置 5 min 后再次振荡混匀, 8000 r/min 离心 5 min, 取 2 mL 上清液用于胆固醇的测定, 胆固醇的测定采用硫酸铁铵比色法^[33], 测定 $\text{OD}_{560 \text{ nm}}$ 值, 以未接菌的胆固醇培养基作为对照并计算降解率, 计算如公式(3)。

$$\text{胆固醇降解率}/\% = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样本}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (3)$$

1.3.6 乳酸菌体外降甘油三酯能力的测定

将纯化后的菌株以 4% 的接种量加入含有甘油三酯的培养基中, 37℃恒温培养 18 h, 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液测定甘油三酯含量, 根据 TG 试剂盒说明书测定甘油三酯含量^[34], 以未接菌的甘油三酯培养基作为对照并计算降解率, 计算公式如(4)、(5)所示。

$$\text{甘油三酯含量} = \frac{B_{\text{样本}}}{B_{\text{标准}}} \times \text{标准液浓度} \quad (4)$$

$$\text{甘油三酯降解率}/\% = \frac{\text{甘油三酯}_{\text{总}} - \text{甘油三酯}_{\text{残余}}}{\text{甘油三酯}_{\text{总}}} \times 100 \quad (5)$$

1.3.7 抗氧化能力测定

(1) 无细胞提取液的制备

参考 AFIFY 等^[35]的方法并稍作修改, 菌株经富集培养后, 取 5×10^6 CFU/mL 细胞加入 1 mL 提取液, 使用冰浴超声波方法对菌悬液进行破碎处理, 8000 r/min 离心 6 min, 取上清液置于冰上保存, 以备后续测试使用。

(2) DPPH 自由基清除能力测定

将提取液与乳酸菌无细胞提取液各 0.02 mL 分别与试剂盒试剂混合, 室温避光反应 20 min, 取 0.2 mL 至 96 孔板测定 515 nm 吸光值, 提取液与样本混合液分别记作 $C_{\text{空白}}$ 与 $C_{\text{测定}}$, DPPH 自由基清除率计算如公式(6)所示。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{C_{\text{空白}} - C_{\text{测定}}}{C_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (6)$$

(3) ABTS 阳离子自由基清除能力测定

将提取液与乳酸菌无细胞提取液各 1 mL 分别与工作液混合, 取 0.2 mL 至 96 孔板室温避光反应 20 min, 于 734 nm 测定吸光值, 提取液与样本混合液分别记作 $D_{\text{空白}}$ 与 $D_{\text{测定}}$,

ABTS 阳离子自由基清除率计算如公式(7)所示。

$$\text{ABTS 自由基清除率}/\% = \frac{D_{\text{空白}} - D_{\text{测定}}}{D_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (7)$$

(4) 铁还原能力测定

参考韩雪等^[36]的方法并稍微修改, 取待测液 0.2 mL, 加入 2.0 mL 2,4,6-三吡啶基-S-三嗪[2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ]工作液(由 10 mmol/L 的 TPTZ 溶液、20 mmol/L 的 FeCl_3 溶液、pH 3.6 的乙酸缓冲液组成), 混匀后 37℃反应 20 min, 在 593 nm 处测定其吸光值, 以 FeSO_4 为标准绘制标准曲线, 从而计算出乳酸菌无细胞提取液在相同吸光值下的浓度, 记为铁还原能力。

1.3.8 乳酸菌分子生物学鉴定

(1) 细菌基因组 DNA 提取

保藏的菌种通过 MRS 液体培养 24 h (37℃) 得到菌液。根据试剂盒指南提取 DNA。之后每个样品取 0.02 mL 用微量分光光度计 NanoDrop1000 测定浓度, 测定后将 DNA 保存在 4℃, 以备后用。

(2) PCR 扩增及 16SrDNA 测序

根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒的说明, 对选定的菌株 DNA 进行提取。利用这些提取的 DNA 作为模板, 并使用细菌 16S rDNA 的标准引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增, 送至北京擎科生物科技有限公司完成序列测定。测序所得的 DNA 序列数据经过组装和整理, 随后在美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的网站上进行同源性分析, 以确保菌株种属的精确识别。

1.4 数据处理

所有实验均重复 3 次, 实验数据以平均值±标准偏差表示。使用 SPSS 21 版本软件对数据进行显著性差异分析, 利用 Origin 7.5 软件绘制实验结果图表。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌生理生化反应结果

表 1 展示了筛选菌株的生理生化测试结果, 其中菌株表现为革兰氏染色阳性、过氧化氢酶及氧化酶测试为阴性、且不具备明胶液化能力。根据《常见细菌系统鉴定手册》的指导, 可以初步将这些菌株归类为乳酸杆菌属。

2.2 耐酸能力分析

乳酸菌作为肠道益生菌, 发挥益生功能的基本要求是具备良好的耐酸能力^[37]。因此, 乳酸菌能够在低 pH 条件下存活的能力, 成为评价其作为益生菌有效性的一个重要指标, 40 株菌的编号及耐酸性结果见表 2。结果表明, 40 株菌对 pH 3.0 的环境表达了不同程度的耐受性, 其中有 20 株耐受性不小于 87%, 用于接下来的实验。

表 1 菌株生理生化鉴定结果
Table 1 Physiological and biochemical identification results of strains

实验	M2	M6	M9	M13	M14	M16	S26	S29	S32	S35
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
过氧化氢	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氧化酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
明胶液化	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

注: +为阳性, -为阴性, N 为不液化明胶。

表 2 40 株乳酸菌耐酸能力比较
Table 2 Comparison the acid tolerance of the 40 strains of lactic acid bacteria

菌株编号	乳酸菌活菌数/(lg CFU/mL)		耐酸能力/%
	0 h	3 h	
M1	1.01±0.04	0.75±0.04	74.23±0.85 ^{kl}
M2※	0.94±0.02	0.88±0.03	94.29±0.61 ^{bcd}
M3	1.13±0.06	0.75±0.04	66.48±0.55 ^m
M4	1.10±0.04	0.82±0.03	74.77±1.07 ^{kl}
M5	1.15±0.03	1.08±0.03	86.37±0.20 ^{bcd}
M6※	0.94±0.02	0.88±0.03	94.12±0.62 ^{bcd}
M7※	1.30±0.02	0.95±0.01	94.28±0.61 ^{kl}
M8	0.97±0.06	0.84±0.05	73.38±1.23 ^{fgh}
M9※	0.95±0.04	0.73±0.04	87.15±1.25 ^{jk}
M10	0.94±0.04	0.86±0.03	76.15±2.52 ^{efg}
M11	1.15±0.03	0.82±0.03	85.61±3.64 ⁱ
M12	0.95±0.08	0.82±0.09	86.10±2.99 ^{gh}
M13※	1.03±0.02	0.94±0.02	91.19±0.76 ^{cde}
M14※	1.15±0.03	1.03±0.02	89.73±1.16 ^{ef}
M15	0.10±0.04	0.73±0.03	72.62±2.47 ^l
M16※	0.98±0.04	1.04±0.03	105.85±2.9 ^a
M17	1.02±0.02	0.86±0.03	84.13±2.8 ^{hi}
M18※	1.23±0.04	1.11±0.02	90.64±1.07 ^c
M19※	0.97±0.06	0.92±0.06	94.75±1.23 ^b
M20	1.07±0.08	0.88±0.05	82.27±1.94 ⁱ
S21	1.29±0.03	0.92±0.02	71.58±0.84 ^l
S22	1.15±0.03	0.70±0.01	61.05±1.66 ⁿ
S23	0.98±0.06	0.67±0.05	67.89±1.75 ^m
S24	1.08±0.03	0.73±0.04	67.25±2.55 ^m
S25※	1.09±0.06	1.02±0.05	94.36±0.98 ^{bc}
S26※	1.06±0.05	0.95±0.04	89.50±0.97 ^{ef}
S27	1.16±0.05	0.90±0.04	77.40±1.47 ^j
S28	1.12±0.04	0.92±0.02	81.96±1.49 ⁱ
S29※	1.06±0.05	1.10±0.04	103.42±0.65 ^a
S30※	0.98±0.04	0.86±0.03	87.95±1.06 ^{efg}
S31※	1.01±0.04	0.90±0.04	90.17±1.54 ^{ef}
S32※	1.12±0.04	1.01±0.04	88.91±0.75 ^{efg}
S33※	1.01±0.04	0.95±0.04	95.36±0.69 ^b
S34※	1.15±0.04	1.05±0.05	91.05±1.38 ^{de}
S35※	1.07±0.02	1.11±0.03	104.35±1.62 ^a
S36	1.08±0.03	0.82±0.03	76.30±1.83 ^{jk}
S37※	1.04±0.03	0.94±0.02	90.12±1.61 ^{ef}
S38	1.21±0.05	0.90±0.04	74.45±0.65 ^{kl}
S39	1.01±0.04	0.82±0.03	82.40±1.84 ⁱ
S40※	0.98±0.04	0.86±0.03	87.94±1.06 ^{efg}

注: ※代表重点菌株标记, 同列不同字母表示差异显著(P<0.05), 表 3~6 同。

2.3 耐胆盐能力分析

乳酸菌在肠道中的存活与定殖是其发挥益生效果的前提条件,这需要乳酸菌对胆盐具备较强的耐受性。肠道胆盐的浓度范围通常在 0.03%~0.3%之间^[38],因此本研究将乳酸菌置于含 0.3%胆盐的培养基中培养 24 h。如表 3 所示,测试的乳酸菌表现出较高的胆盐耐受性,重点标记的 10 株乳酸菌耐受率均达到或超过 70%,特别是 M16 菌株,其耐受性高达 101.45%。基于这一结果,选定这 10 株乳酸菌用于进一步的研究工作。

表 3 20 株乳酸菌耐胆盐能力比较
Table 3 Comparison the acid tolerance of 20 strains of lactic acid bacteria

菌株 编号	OD _{600 nm}		耐胆盐能力 /%
	0%牛胆盐	0.3%牛胆盐	
M2※	2.276±0.012	2.057±0.016	90.00±0.23 ^b
M6※	2.124±0.021	1.795±0.014	88.40±3.20 ^b
M7	2.172±0.014	1.253±0.029	57.68±1.24 ^k
M9※	2.137±0.013	1.521±0.317	80.87±1.96 ^c
M13※	2.205±0.010	1.925±0.014	87.30±0.73 ^b
M14※	2.141±0.013	1.506±0.082	70.35±4.93 ^{ef}
M16※	2.056±0.011	2.086±0.021	101.45±1.34 ^a
M18	2.156±0.018	1.740±0.022	63.77±1.14 ^{hij}
M19	2.048±0.040	1.237±0.030	60.44±2.32 ^{jk}
M25	2.090±0.042	1.362±0.027	65.17±2.24 ^{ghi}
S26※	2.172±0.014	1.253±0.029	78.69±3.84 ^{cd}
S29※	2.205±0.010	1.925±0.014	74.48±1.11 ^{de}
S30	2.276±0.012	2.057±0.016	50.74±0.59 ^l
S31	2.137±0.013	1.521±0.317	68.85±1.61 ^{fg}
S32※	2.056±0.011	2.086±0.021	80.05±2.76 ^c
S33	2.141±0.013	1.506±0.082	62.43±2.31 ^{ij}
S34	2.124±0.021	1.795±0.014	49.16±0.27 ^l
S35※	2.156±0.018	1.740±0.022	80.74±1.78 ^c
S37	2.048±0.04	1.237±0.030	60.27±1.84 ^{jk}
S40	2.090±0.042	1.362±0.027	67.29±1.67 ^{fgh}

表 4 10 株乳酸菌模拟胃肠液环境下耐受能力
Table 4 Tolerance of 10 lactic acid bacteria strains in simulated gastrointestinal fluid environment

菌株编号	模拟胃液中活菌数/(lg CFU/mL)		耐受能力/%	模拟肠液中活菌数/(lg CFU/mL)		耐受能力/%
	0 h	3 h		0 h	4 h	
M2	1.18±0.02	1.11±0.03	94.69±0.51 ^a	0.88±0.03	0.82±0.03	86.96±1.38 ^a
M6	1.09±0.04	0.80±0.03	73.52±1.32 ^e	1.03±0.02	0.70±0.01	68.04±1.60 ^e
M9	1.13±0.06	0.75±0.04	66.48±0.55 ^f	0.97±0.06	0.84±0.05	64.09±1.17 ^f
M13	1.10±0.04	0.82±0.03	74.77±1.07 ^c	1.04±0.06	0.75±0.04	72.49±0.66 ^d
M14	1.15±0.04	1.09±0.04	94.28±0.85 ^a	0.92±0.05	0.67±0.05	74.77±2.64 ^{cd}
M16	1.03±0.06	0.94±0.02	91.19±0.76 ^b	1.01±0.05	0.90±0.04	81.93±0.67 ^b
S26	1.25±0.02	7.66±0.01	62.03±1.19 ^g	0.94±0.02	0.88±0.03	54.12±1.63 ^g
S29	1.01±0.05	0.90±0.04	89.10±1.05 ^c	0.92±0.05	0.75±0.04	76.95±1.94 ^c
S32	1.02±0.05	0.84±0.05	82.13±1.36 ^d	0.95±0.04	0.72±0.04	76.15±2.52 ^c
S35	1.03±0.04	0.92±0.02	89.68±1.09 ^{bc}	1.06±0.08	0.80±0.07	74.99±1.51 ^{cd}

2.4 模拟胃肠液消化实验分析

菌株要发挥益生性能需要在胃肠道环境中有一定的转运及消化功能^[39]。如表 4 所示,本研究测定了乳酸菌在模拟胃肠液中的存活率。10 株菌对人工胃液的耐受性均高于 62.03%,对肠液的耐受性均高于 54.12%。综合菌株对胃液和肠液的耐受力,经过 3 h 人工胃液处理后, M2 耐受性可达 94.69%,继续经过 4 h 肠液处理,耐受性达到了 86.96%,这一结果与葛善赢等^[40]对两株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) CICC 6240 在胃液耐受性方面的研究结果相符,其存活率分别为 94.69%和 86.96%。各菌株经过 3 h 肠液处理后,相较于胃液耐受性呈现下降趋势,这可能是由于菌株的被膜被胃蛋白酶和胰蛋白酶破坏,导致菌株生长缓慢甚至死亡^[41]。总体而言, M2 对人工胃肠液具有较强的耐受性,在发酵食品中具有一定的应用潜力。

2.5 降胆固醇及甘油三酯能力分析

菌株对胆固醇及甘油三酯降解能力见表 5。10 株菌均表达了不同程度的降解能力,在胆固醇降解能力方面, M2 降解能力最强,降解率分别大于达到了 67.52%, S26 对胆固醇降解能力最弱,降解率为 42.85%。此前有学者从酸菜中分离出的乳酸杆菌对胆固醇的降解率最高可达 52.84%^[42]。由此可见, M2 为潜在益生性菌株。在甘油三酯降解能力方面, S32 对甘油三酯降解能力高达 43.79%, S29 对甘油三酯降解能力最弱,降解率为 16.88%。

2.6 抗氧化能力分析

基于菌株降解胆固醇及甘油三酯能力,进一步评估菌株的体外抗氧化能力,并与优势乳酸菌进行对比。由表 6 可知,经筛选的菌株与商业菌对 DPPH 自由基均有一定程度的清除能力,但 M2 (61.35%)和 M16 (62.94%)清除率超过了商业乳酸菌(58.88%);此外, M2 对 ABTS 阳离子自由基清除率为 76.95%,也显著超过了商业乳酸菌(65.31%);在铁还原能力方面,不同菌株与商业菌株之间的差异较小。

Fig.1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence of lactic acid bacteria strains

3 结 论

本研究从新疆哈萨克传统发酵酸马奶中分离纯化出 96 株菌株, 其中 40 株菌株经生理生化鉴定为乳酸菌属。更进一步地, 10 株候选菌株具有较高的耐酸性($\geq 87\%$)和耐胆盐性($\geq 70\%$), 通过 16S rDNA 高通量测序分别鉴定为 2 株鼠李糖乳杆菌、3 株植物乳杆菌、2 株戊糖乳杆菌和 3 株副干酪乳杆菌。其中, 1 株鼠李糖乳杆菌(候选菌株 M2)胆固醇降解率达 67.52%, 甘油三酯降解率达 34.67%, 模拟胃液(pH 3.0)存活率达 94.69%, 模拟肠液(pH 8.0)存活率达 86.96%, 对 DPPH 自由基、ABTS 阳离子自由基的清除能力均高于德式乳杆菌保加利亚亚种, 是兼具高耐受性和高抗氧化性的优异乳酸菌株。乳酸菌是食品工业中不可替代的角色, 被视为极为珍贵的微生物资源。我国在发酵食品领域有着丰富的经验和悠久的历史, 从传统发酵食品中挖掘功能性乳酸菌资源对增进民众健康和促进食品科技进步具有重要的意义。因此, 本研究为发酵酸马奶中功能性益生菌资源的开发利用提供了重要的理论依据。

参考文献

- [1] 李静, 贾佳佳, 杨艳, 等. 新疆哈萨克族传统发酵酸马奶中酵母菌的分离鉴定[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 203–207.
LI J, JIA JJ, YANG Y, *et al.* Isolation and identification of yeast in traditional fermented koumiss of Kazak nationality in Xinjiang [J]. Food Sci, 2012, 33(5): 203–207.
- [2] 布仁巴雅尔, 赵建军, 乔晓宏, 等. 马奶营养及其保健作用[J]. 当代畜禽养殖业, 2023, 43(3): 43–44, 47.
BUREN BYE, ZHAO JJ, QIAO XH, *et al.* Horse milk nutrition and its health care function [J]. Mod Anim Husb, 2023, 43(3): 43–44, 47.
- [3] 高世南, 徐志华, 李杨, 等. 新疆新源县酸马奶细菌菌群分析[J]. 中国酿造, 2021, 40(5): 65–69.
GAO SN, XU ZH, LI Y, *et al.* Analysis of bacterial flora of koumiss in Xinyuan County, Xinjiang [J]. China Brew, 2021, 40(5): 65–69.
- [4] 曹恺欣, 武俊瑞, 李煜, 等. 酸马奶中抗结核菌功效成分研究进展[J]. 中国乳品工业, 2022, 50(10): 34–40.
CAO KX, WU JR, LI Y, *et al.* Research progress on anti-tuberculosis functional components in koumiss [J]. China Dairy Ind, 2022, 50(10): 34–40.
- [5] 朱建军, 王康, 刘彦敏, 等. 酸马奶的微生物学及生产工艺研究现状[J]. 食品科技, 2022, 47(1): 13–19.
ZHU JJ, WANG K, LIU YM, *et al.* Current research status on the microbiology and production process of koumiss [J]. Cien Technol Alim, 2022, 47(1): 13–19.
- [6] 张晓旭, 葛武鹏, 梁秀珍, 等. 内蒙古和新疆牧区酸马奶中酵母菌的多样性及其优势菌发酵特性[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 156–162.
ZHANG XX, GE WP, LIANG XZ, *et al.* Diversity of yeasts and fermentation characteristics of dominant bacteria in koumiss from Inner Mongolia and Xinjiang pastoral areas [J]. Food Sci, 2016, 37(17): 156–162.
- [7] KONDYBAYEV A, LOISEAU G, ACHIR N, *et al.* Fermented mare milk product (Qymyz, Koumiss) [J]. Int Dairy J, 2021, 119: 105065.
- [8] XIA Y, YU J, MIAO W, *et al.* A UPLC-Q-TOF-MS-based metabolomics approach for the evaluation of fermented mare's milk to koumiss [J]. Food Chem, 2020, 320: 126619.
- [9] 闫彬, 贺银凤. 酸马奶中乳酸菌与酵母菌的共生发酵特性[J]. 食品科学, 2012, 33(7): 131–137.
YAN B, HE YF. The symbiotic fermentation characteristics of lactic acid bacteria and yeast in koumiss [J]. Food Sci, 2012, 33(7): 131–137.
- [10] WU R, WANG L, WANG J, *et al.* Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia [J]. J Basic Microbiol, 2009, 49(3): 318–326.
- [11] 李厚强. 具有抑菌作用乳酸菌筛选及其在红酸汤生产中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(11): 164–170.
LI HQ. Screening of lactic acid bacteria with antibacterial effect and its application in the production of red sour soup [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(11): 164–170.
- [12] 杨晴, 王荣春, 孙玥, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及其性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(3): 46–52.
YANG Q, WANG RC, SUN Y, *et al.* Screening, identification, and performance study of cholesterol-lowering lactic acid bacteria [J]. Food Ferment Ind, 2023, 49(3): 46–52.
- [13] KORCZ E, KERENYI Z, VARGA L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: Potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects [J]. Food Funct, 2018, 9(6): 3057–3068.
- [14] SALEH AA, GALIK B, ARPASOVA H, *et al.* Synergistic effect of feeding *Aspergillus awamori* and lactic acid bacteria on performance, egg traits, egg yolk cholesterol and fatty acid profile in laying hens [J]. Italian J Anim Sci, 2017, 16(1): 132–139.
- [15] XU H, FENG L, DENG Y, *et al.* Change of phytochemicals and bioactive substances in *Lactobacillus* fermented Citrus juice during the fermentation process [J]. LWT, 2023, 180: 114715.
- [16] JANG HJ, KIM JH, LEE HS, *et al.* Physicochemical analysis of non-fermented probiotic milk with probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln1 isolated from Korea traditional fermented food [J]. Food Sci Biotechnol, 2022, 31(6): 731–737.
- [17] 张家艳, 董英, 肖香, 等. 乳酸菌发酵大麦提取物增强肥胖大鼠的肝脏抗氧化能力[J]. 中国食品学报, 2017, 17(12): 19–25.
ZHANG JY, DONG Y, XIAO X, *et al.* Lactic acid bacteria fermented barley extract enhances liver antioxidant capacity in obese rats [J]. J Chin Inst Food Sci, 2017, 17(12): 19–25.
- [18] 贾燕, 宋前进, 李新培, 等. 酸马奶中一株具有高效抑菌活性的乳酸菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018, (19): 150–153, 242–243.
JIA Y, SONG QJ, LI XP, *et al.* Isolation and identification of a lactic acid bacteria strain with high antibacterial activity from koumiss [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2018, (19): 150–153, 242–243.
- [19] 王瑞珍. 酸马奶的营养成分与保健特性[J]. 养殖技术顾问, 2012, (10): 247–248.
WANG RZ. Nutritional components and health care characteristics of koumiss [J]. Breed Tech Consult, 2012, (10): 247–248.
- [20] PETROVA P, IVANOV I, TSIGORIYBA L, *et al.* Traditional Bulgarian dairy products: Ethnic foods with health benefits [J]. Microorganisms, 2021, 9(3): 480.
- [21] 红梅, 包艳青, 芒来, 等. 内蒙古地区传统发酵酸马奶不同发酵时期乳清蛋白 SDS-PAGE 分析[J]. 畜牧与饲料科学, 2023, 44(5): 83–92.
HONG M, BAO YQ, MANG L, *et al.* SDS-PAGE analysis of whey protein in different fermentation periods of traditional fermented koumiss in Inner Mongolia [J]. Anim Husb Feed Sci, 2023, 44(5): 83–92.
- [22] 乔健敏, 李子健, 成立新, 等. 内蒙古发酵酸乳制品中乳酸菌的分离鉴定[J]. 畜牧与饲料科学, 2020, 41(3): 51–55.
QIAO JM, LI ZC, CHENG LX, *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria in fermented dairy products from Inner Mongolia [J]. Anim Husb Feed Sci, 2020, 41(3): 51–55.
- [23] 于佳琦, 夏亚男, 乔晓宏, 等. 锡林郭勒牧区酸马奶天然发酵剂中风味

- 物质及微生物多样性[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 112–121.
- YU JQ, XIA YN, QIAO XH, *et al.* Flavor compounds and microbial diversity in natural fermentation starters of koumiss in the Xilingol Grassland Area [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(10): 112–121.
- [24] 何宇星. 蒙古国 Hurunge 中细菌多样性、益生特性及全基因组研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023.
- HE YX. Bacterial diversity, probiotic characteristics, and whole genome study in Mongolian Hurunge [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023.
- [25] 娜日苏, 如意, 刘文俊, 等. 中亚不同地区酸马奶中乳酸菌分离鉴定及优良菌株筛选[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(17): 120–126.
- NA RS, RU Y, LIU WJ, *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria in koumiss from different regions of Central and East Asia and screening of excellent strains [J]. *Food Ferment Ind*, 2023, 49(17): 120–126.
- [26] 郭远林, 李建军. 中国成人血脂异常防治指南(2016 年修订版)亮点解读[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2017, 9(6): 12–14.
- GUO YL, LI JJ. Highlights of Chinese guidelines for the prevention and treatment of dyslipidemia in adults (2016 Revision) [J]. *Chin J Front Med Sci (Elect Ver)*, 2017, 9(6): 12–14.
- [27] 李玉蝶, 李玖君, 汪海燕, 等. 戊糖乳杆菌发酵对花生不同蛋白组分结构的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 74–79.
- LI YD, LI WJ, WANG HY, *et al.* Effect of *Lactobacillus pentosus* fermentation on the structure of different protein components in peanuts [J]. *Food Sci*, 2023, 44(22): 74–79.
- [28] 陈大卫. 辅助降血脂益生乳酸菌的筛选及其对高脂大鼠肠道菌群的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- CHEN DW. Screening of probiotic lactic acid bacteria for lipid-lowering assistance and their effects on the intestinal flora of hyperlipidemic rats [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015.
- [29] 刘江, 程群, 王振兴, 等. 云南乳饼中乳酸菌的筛选及其功能活性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(4): 160–166.
- LIU J, CHENG Q, WANG ZX, *et al.* Screening of Lactic acid bacteria in Yunnan milk cake and their functional activities [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(4): 160–166.
- [30] 费永涛, 黄一鹤, 黄力, 等. 利用体外模型分析解淀粉乳杆菌 L6 发酵豆乳对肠道菌群和短链脂肪酸的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(18): 157–164.
- FEI YT, HUANG YH, HUANG L, *et al.* Using an *in vitro* model to analyze the effects of *Lactobacillus amylovorus* L6 fermented soy milk on intestinal flora and short-chain fatty acids [J]. *Food Sci*, 2023, 44(18): 157–164.
- [31] MANZOOR A, TAYYEB A. Functional probiotic attributes and gene encoding plantaricin among variant *Lactobacillus plantarum* strains [J]. *Microbial Pathogen*, 2019, 131: 22–32.
- [32] FEI Y, LI L, ZHENG Y, *et al.* Characterization of *Lactobacillus amylovorus* L6 as potential probiotics based on genome sequence and corresponding phenotypes [J]. *LWT*, 2018, 90: 460–468.
- [33] 吴琼, 赵昕, 杜立欣, 等. 戊糖片球菌改善高脂饮食小鼠肠道菌群机制研究[J]. 天津科技大学学报, 2023, 38(2): 28–34, 69.
- WU Q, ZHAO X, DU LX, *et al.* Study on the mechanism of pentose verrucomicrobia in improving the gut microbiota of mice fed a high-fat diet [J]. *J Tianjing Univ Sci Technol*, 2023, 38(2): 28–34, 69.
- [34] XIAO Y, GAO CQ, WU JR, *et al.* *Periplaneta americana* extract alleviates steatohepatitis in a mouse model by modulating HMGB1-mediated inflammatory response [J]. *Frontiers Pharmacol*, 2022, 13: 995523.
- [35] AFIFY AEMMR, ROMEILAH RM, SULTAN SIM, *et al.* Antioxidant activity and biological evaluations of probiotic bacteria strains [J]. *Int J Acad Res*, 2012, 4(6): 1–5.
- [36] 韩雪, 王毕妮, 张富新, 等. 不同乳酸菌发酵对红枣浆游离态酚酸及其抗氧化性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(3): 121–127.
- HAN X, WANG BN, ZHANG FX, *et al.* The effects of fermentation by different lactic acid bacteria on free phenolic acids and antioxidant activity of jujube paste [J]. *Food Ferment Ind*, 2018, 44(3): 121–127.
- [37] 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 γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria in traditional fermented yak yogurt from the Western Sichuan Plateau [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(6): 111–117, 124.
- [38] 李尧, 张羽竹, 张利, 等. 分离自传统自然发酵食品中降胆固醇乳酸菌的筛选与评价[J]. 中国食品学报, 2019, 19(6): 212–222.
- LI Y, ZHANG YZ, ZHANG L, *et al.* Selection and evaluation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria isolated from traditional naturally fermented foods [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2019, 19(6): 212–222.
- [39] BORICHA AA, SHEKH SL, PITHVA SP, *et al.* *In vitro* evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* species of food and human origin [J]. *LWT*, 2019, 106: 201–208.
- [40] 葛善赢, 张海涛, 王士佳, 等. 脉冲强光诱变选育高产乳酸植物乳杆菌及其益生特性研究[J]. 中国酿造, 2023, 42(10): 59–64.
- GE SY, ZHANG HT, WANG SJ, *et al.* Research on the breeding of high-yielding *Lactobacillus plantarum* by pulsed intense light mutation and its probiotic characteristics [J]. *Chin Brew*, 2023, 42(10): 59–64.
- [41] PATEL AK, AHIRE JJ, PAWAR SP, *et al.* Evaluation of probiotic characteristics of siderophoregenic *Bacillus* spp. isolated from dairy waste [J]. *Appl Biochem Biotech*, 2010, 160: 140–155.
- [42] 马长路, 焦梦丽, 罗红霞, 等. 传统东北酸菜中乳杆菌的分离鉴定及其降胆固醇特性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(21): 209–213.
- MA CL, JIAO ML, LUO HX, *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional northeast pickled vegetables and their cholesterol-lowering properties [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(21): 209–213.
- [43] LIU N, MIAO S, QIN L. Screening and application of lactic acid bacteria and yeasts with *L*-lactic acid-producing and antioxidant capacity in traditional fermented rice acid [J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(11): 6095–6111.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



马新森, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物。
E-mail: 13624865669@163.com



李 婕, 讲师, 主要研究方向为畜产品加工及品质控制。
E-mail: ljgsau@163.com



许 倩, 博士, 教授, 主要研究方向为畜产品加工及贮藏技术。
E-mail: xuqiantaru@126.com