

DOI: 10.13376/j.cbils/2015116

文章编号: 1004-0374(2015)07-0837-10



张和平, 博士, 教授, 博士研究生导师。现任内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室主任, 国家奶牛产业技术体系乳制品加工功能研究室主任, 农业部东北区域农业微生物资源利用科学观测实验站站长, 乳酸菌与乳品发酵剂内蒙古自治区工程实验室主任。国家杰出青年科学基金获得者, 长江学者奖励计划特聘教授, 国家百千万人才工程, 并获“有突出贡献中青年专家”称号。以第一作者或通讯作者在 *The ISME Journal* (IF=9.267)、*Molecular and Cellular Proteomics* (IF=8.79) 等 SCI 收录期刊发表论文 109 篇; 主编 *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice* (Springer 出版社, 2014) 和《现代乳品工业手册》等论著 19 部。

## 自然发酵乳制品中乳酸菌的生物多样性

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, 呼和浩特 010010)

**摘要:** 近年来, 关于自然发酵乳制品中乳酸菌生物多样性的研究备受关注。结合内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室的研究工作, 对自然发酵乳制品中乳酸菌的生物多样性进行综述, 从基于传统纯培养方法和宏基因组技术研究的角度, 讨论了不同自然发酵乳制品中乳酸菌的物种多样性和遗传多样性。

**关键词:** 自然发酵乳制品; 乳酸菌; 生物多样性

**中图分类号:** Q939.11\*8      **文献标志码:** A

## Biodiversity of lactic acid bacteria in naturally fermented dairy products

ZHANG He-Ping

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

**Abstract:** In recent years, the study on biodiversity of lactic acid bacteria (LAB) in naturally fermented dairy products has become a hot topic. In this paper, the biodiversity of LAB in the naturally fermented dairy products was reviewed based on research results by the Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, at Inner Mongolia Agriculture University. Meanwhile, species diversity and genetic diversity of LAB in the naturally fermented dairy products were discussed based on traditional culture method and metagenomic techniques.

**Key words:** naturally fermented dairy products; lactic acid bacteria; biodiversity

收稿日期: 2014-12-31

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(31025019)

\*通信作者: E-mail: hepingdd@vip.sina.com; Tel: 0471-4319940

自然发酵乳制品是指以乳为原料,经微生物自然发酵主要产物为乳酸的产品。我国发酵乳制品的制作历史悠久,据记载,北方游牧民族早在2000多年前就有制作和食用自然发酵乳制品的习俗<sup>[1]</sup>。乳制品的发酵最初是作为一种保存鲜乳、防止变质的手段,游牧民族将鲜乳装在羊皮袋里经依附在器具和环境中的细菌自然发酵形成酸乳,之后在长期的生产实践中,逐渐摸索出了生产各种发酵乳制品的方法<sup>[2]</sup>。主要包括酸牛乳、酸马乳、酸牦牛乳、酸驼乳、酸山羊乳、曲拉、乳饼以及乳扇等。

自然发酵乳制品的制作和食用历经数千年的传承,加之不同的气候环境、地理因素以及不同的制作工艺,使得其中蕴藏的乳酸菌生物多样性极为丰富。这些乳酸菌经过长期的自然选择和驯化,不乏具有优良益生特性和生产特性的菌株,如益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang<sup>[3]</sup> 和 *L. helveticus* H9<sup>[4]</sup>、酸乳发酵剂菌株 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02<sup>[5]</sup> 和 *Streptococcus thermophilus* ND03<sup>[6]</sup> 等均分离自我国内蒙古自然发酵乳制品。尽管自然发酵乳制品中的乳酸菌资源珍贵且物种丰富,但关于其中乳酸菌的生物多样性直到近年来才得到较为充分的研究。本文以内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室的研究结果为基础,结合国内外研究学者的报道,从物种多样性和遗传多样性角度对自然发酵乳制品中乳酸菌的生物多样性进行综述。

## 1 基于纯培养技术的乳酸菌多样性分析

目前,在我国内蒙古、新疆、西藏、青海、四川、甘肃、云南省的少数民族聚居地区以及蒙古国和俄罗斯仍沿用着从欧亚大陆游牧民族流传下来的传统方法来制作各种乳制品,这使得传统发酵乳制品中珍贵的乳酸菌资源得以传承。近年来,随着乳酸菌应用的不断升温,国内外研究人员对自然发酵乳中的乳酸菌生物多样性进行了大量的研究。

酸马乳(Koumiss)是以新鲜马乳为原料,经乳酸菌和酵母菌等微生物共同自然发酵形成的酸性、低酒精含量乳饮料,主要在东欧和中亚地区,即俄罗斯东南、蒙古国以及中国的内蒙古、新疆等地区制作和饮用<sup>[1]</sup>。其中乳酸菌的多样性极为丰富,早在1997年,Ishii等<sup>[7]</sup>就对我国内蒙古地区酸马乳样品中的乳酸菌多样性进行了研究。作者对分离自蒙古国酸马乳中的43株乳酸菌进行了鉴定,指出在这些样品中乳酸菌组成以鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)和干酪乳杆菌副干酪亚种(*L. casei* subsp.

*paracasei*)为优势菌群。Burentegusi等<sup>[8]</sup>从内蒙古地区10份酸马乳中分离鉴定出258株乳酸菌,归属于6个属11个种,其中屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、肠膜明串珠菌葡聚糖亚种(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*)和植物乳杆菌(*L. plantarum*)为优势乳酸菌。2004年,An等<sup>[9]</sup>也从内蒙古地区采集6份酸马乳,分离鉴定出117株乳酸菌,分析发现植物乳杆菌(*L. plantarum*)、戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)和乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lc. lactis* subsp. *cremoris*)为优势菌群。其中戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)首次高频率地从酸马乳中分离到。2009年,Wu等<sup>[10]</sup>对内蒙古地区自然发酵酸马乳中乳酸菌多样性的研究指出,干酪乳杆菌(*L. casei*)、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)和植物乳杆菌(*L. plantarum*)为该地区酸马乳中的优势乳酸菌。从以上研究结果可以看出自然发酵马乳中蕴藏着丰富的乳酸菌资源和复杂的菌群结构。

2008年,Watanabe等<sup>[11]</sup>对蒙古国中央省、乌兰巴托、东戈壁等6个地区的自然发酵乳制品中乳酸菌多样性进行了较为系统的研究。他们采集了自然发酵马乳、驼乳、牦牛乳、山羊乳、牛乳等样品53份,运用纯培养和分子生物学方法对其中乳酸菌多样性和群落结构进行了分析,指出瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)为蒙古国中央省酸马乳中的优势乳酸菌,而德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、发酵乳杆菌(*L. fermentum*)和嗜热链球菌(*S. thermophilus*)在其他乳源乳制品中的分离频率要显著高于酸马乳。Takeda等<sup>[12]</sup>关于蒙古国中央省、库苏古尔和东戈壁等地区自然发酵马乳、牛乳中乳酸菌多样性的研究也指出,瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)和德氏乳杆菌乳酸亚种(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*)是优势菌群,同时发现德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)、发酵乳杆菌(*L. fermentum*)和嗜热链球菌(*S. thermophilus*)为自然发酵牛乳的优势菌群。这些研究与Uchida等<sup>[13]</sup>研究结果一致,均认为瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)是蒙古国酸马乳中的优势菌群。2014年, Ring等<sup>[14]</sup>采用传统纯培养、16S rRNA克隆建库和DGGE相结合的方法分析蒙古国乌兰巴托地区酸马乳中乳酸菌的多样性,不仅再一次验证了瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)是蒙古国地区酸马乳中优势菌群的结论,同时发现了少量不动杆菌属(*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、拉乌尔菌属(*Pseudomonas*)

和瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*) 等细菌曾在发酵马乳中存在过。

2010年, Sun等<sup>[15]</sup>从我国内蒙古、新疆、青海等地区采集酸马乳样品48份, 系统分析了我国不同地区自然发酵马乳中乳酸菌多样性。该研究共分离到171株乳杆菌, 发现瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) 为新疆地区优势菌群, 干酪乳杆菌 (*L. casei*)、瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) 和植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 等3种乳杆菌在内蒙古地区的酸马奶中出现频率较高, 而青海地区酸马奶的优势菌群为植物乳杆菌 (*L. plantarum*)。这与Hao等<sup>[16]</sup>采用DGGE和种属特异性引物PCR的方法对新疆地区酸马乳中乳酸菌多样性研究结果吻合, 认为瑞士乳

杆菌 (*L. helveticus*) 为新疆地区酸马乳中的优势乳酸菌。

比较不同地区自然发酵马乳中乳酸菌组成 (表1), 其中瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) 为主要的优势乳酸菌, 不同地域的乳酸菌组成有着丰富的多样性, 如我国新疆地区酸马乳中发酵乳杆菌 (*L. fermentum*) 和马乳酒样乳杆菌 (*L. kefiranofaciens*) 分离频率相对较高, 而内蒙古地区屎肠球菌 (*E. faecium*)、肠膜明串珠菌葡聚糖亚种 (*Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum*) 分离频率相对较高; 蒙古国地区中干酪乳杆菌 (*L. casei*)、马酒样乳杆菌 (*L. kefiranofaciens*) 和肠膜明串珠球菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 也是主要的乳酸菌。

表1 不同自然发酵乳制品中的优势乳酸菌

地区	酸牛乳 Tarag	酸马乳 Koumiss	酸牦牛乳 Kurut	Qula	乳扇 Dairy Fan
内蒙古	<i>L. helveticus</i> <i>Lc. lactis</i> <i>L. casei</i>	<i>L. helveticus</i> <i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>E. faecium</i> <i>Leuc. mesenteroides</i>	-	-	-
中国 新疆	<i>L. fermentarum</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. delbrueckii</i>	<i>L. helveticus</i>	-	-	-
青海	-	<i>L. plantarum</i>	<i>S. thermophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. plantarum</i> <i>Lc. lactis</i>	-	-
西藏	<i>L. casei</i> <i>L. fermentarum</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. delbrueckii</i>	-	<i>L. fermentum</i> <i>L. helveticus</i> -	<i>Leuc. mesenteroides</i>	-
甘肃	-	-	<i>S. thermophilus</i> <i>Leuc. mesenteroides</i> <i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i> <i>Leuc. mesenteroides</i>	-
四川	-	-	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. helveticu</i> <i>Leuc. mesenteroides</i> <i>E. durans</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. parecasei</i>	-
云南	-	-	-	-	<i>L. helveticus</i>
蒙古国	<i>L. fermentum</i> <i>L. helveticus</i> <i>S. thermophilus</i> <i>L. delbrueckii</i>	<i>L. helveticus</i> <i>L. delbrueckii</i>	-	-	-
俄罗斯	<i>L. helveticus</i>	-	-	-	-

2010年, Airidengcaicike等<sup>[17]</sup>从西藏藏南和藏北地区采集的44份自然发酵酸牛乳(Tarag)中分离乳酸菌171株,并鉴定为4个属,12个种和亚种。分析表明在寒冷的藏北那曲、拉萨地区以发酵乳杆菌(*L. fermentum*)和干酪乳杆菌(*L. casei*)为优势菌群,在相对温暖的藏南日喀则地区以干酪乳杆菌(*L. casei*)和植物乳杆菌(*L. plantarum*)为主。Shuangquan等<sup>[18]</sup>的报道则指出,内蒙古地区自然发酵牛乳中植物乳杆菌(*L. plantarum*)、干酪乳杆菌(*L. casei*)和棉籽糖乳球菌(*Lactococcus raffinolactis*)为优势菌群。2012年, Liu等<sup>[19]</sup>对我国内蒙古东部地区198份自然发酵牛乳中乳酸菌的多样性进行了系统的研究,发现瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)、乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lc. lactis* subsp. *lactis*)和干酪乳杆菌(*L. casei*)是内蒙古东部地区自然发酵酸牛乳中的优势乳酸菌。为了更系统全面地探知自然发酵牛乳中乳酸菌的多样性,2012~2013年内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室从我国西藏、新疆以及俄罗斯布里亚特、图瓦、卡尔梅克等地区采集自然发酵牛乳制品301份,分离鉴定乳酸菌1537株(数据未发表),其中西藏、新疆地区的优势乳酸菌为发酵乳杆菌(*L. fermentum*)、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)和德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*),而俄罗斯地区优势乳酸菌仅为瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)。这些研究结果表明了不同地区自然发酵牛乳中存在着复杂的乳酸菌群落结构,且具有特定的优势菌群,这可能是由于不同地区的海拔、温度等气候特征因素导致的。

2010年, Sun等<sup>[20]</sup>从蒙古国戈壁阿拉泰、东戈壁等地区采集自然发酵牛乳样品20份,从中分离鉴定出74株乳酸菌,其中发酵乳杆菌(*L. fermentum*)和瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)为该地区自然发酵牛乳的优势乳酸菌。2011年, Yu等<sup>[21]</sup>对蒙古国18个省市采集189份自然发酵乳(其中173份自然发酵牛乳制品)的乳酸菌多样性研究指出,嗜热链球菌(*S. thermophilus*)、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)和德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)为优势菌群。与Watanabe等<sup>[11]</sup>和Takeda等<sup>[12]</sup>的研究结果一致的是,都认为德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)是蒙古国自然发酵牛乳的优势乳酸菌菌群。区别在于Watanabe等<sup>[11]</sup>的研究中马酒样乳杆菌(*L. kefiranofaciens*)和瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)分离频率较高, Takeda等<sup>[12]</sup>则认为瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)、发酵乳杆菌(*L.*

*fermentum*)和嗜热链球菌(*S. thermophilus*)是优势菌群。这也进一步表明不同地区的自然发酵牛乳,因其地理位置、气候因素等差异,形成多样的乳酸菌菌相。

酸牦牛乳(Kurut)是青藏高原地区少数民族,特别是藏族人民最常食用的乳制品,还可制作为奶豆腐、奶皮子、曲拉等自然发酵乳制品。2009年, Yu等<sup>[22]</sup>采用16S rRNA-RFLP技术对分离自西藏地区酸牦牛乳的乳酸菌多样性进行研究,不仅提供了一种快速的乳酸菌分类鉴定技术,同时揭示了西藏地区自然发酵牦牛乳中存在着丰富的乳酸菌,指出发酵乳杆菌(*L. fermentum*)和瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)为优势菌群。2012年, Liu等<sup>[23]</sup>采用16S rRNA克隆建库的方法从非培养的角度也发现瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)为西藏地区酸牦牛乳中的优势乳酸菌,但发酵乳杆菌(*L. fermentum*)检出频率较低,而德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)出现频率较高,同时有近1/3的克隆被认定为未知细菌,表明在这些传统发酵乳中仍有大量的未知细菌存在。

2010年, Sun等<sup>[24]</sup>从青海海南州、海西州和海北州等地区采集自然发酵牦牛乳43份,通过生理生化和16S rRNA序列分析的方法将148株乳酸菌归属为5个属、13个种和亚种。发现嗜热链球菌(*S. thermophilus*)、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、植物乳杆菌(*L. plantarum*)和乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lc. lactis* subsp. *lactis*)为优势菌群,该结果与之前西藏地区自然发酵牦牛乳中乳酸菌的多样性存在着较大的差异。

为了进一步研究自然发酵牦牛乳中乳酸菌的多样性,内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室研究人员从甘肃省甘南地区和四川省红原草原的牧民居住区采集自然发酵牦牛乳和曲拉等样品,对其中的乳酸菌多样性进行系统分析。2012年, Bao等<sup>[25]</sup>对采集自甘肃省甘南藏族居住地区的39份酸牦牛乳样品和31份曲拉样品中的乳酸菌多样性进行分析,分离鉴定出252株乳酸菌。指出嗜热链球菌(*S. thermophilus*)、肠膜明串珠菌肠膜亚种(*Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*)和瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)为甘南地区酸牦牛乳的优势菌群,而曲拉样品中的优势菌群仅为瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)。同年, Bao等<sup>[26]</sup>报道了四川红原草原20份酸牦牛乳和28份曲拉(其中10份为制作曲拉的酸乳清)样品的乳酸菌多样性,认为嗜热链球菌(*S.*

*thermophilus*) 是酸牦牛乳中的优势菌群, 瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) 和肠膜明串珠菌肠膜亚种 (*Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) 为曲拉样品中的优势菌群。但与 Ao 等<sup>[27]</sup> 对四川红原草原酸牦牛乳中乳酸菌多样性研究结果不同, 后者发现耐久肠球菌 (*E. durans*)、发酵乳杆菌 (*L. fermentum*) 和副干酪乳杆菌 (*L. parecasei*) 为主要的乳酸菌, 显示出同一地区不同家庭制作的自然发酵牦牛乳也具有不同的乳酸菌生物多样性, 且乳酸菌的群落结构差异较大。

2010年, Tan 等<sup>[28]</sup> 对青海、甘肃和西藏地区的曲拉样品的乳酸菌多样性进行分析, 指出曲拉样品中优势乳酸菌是肠膜明串珠菌 (*Leuc. mesenteroides*)。比较这几个地区的自然发酵牦牛乳中乳酸菌多样性 (表 1), 其中嗜热链球菌 (*S. thermophilus*) 是青海、甘肃、四川等地区酸牦牛乳的优势菌群, 并且德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) 以及肠膜明串珠球菌 (*Leuc. mesenteroides*) 的分离频率也较高, 可能为自然发酵牦牛乳的主要乳酸菌。而曲拉中主要的乳酸菌以瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) 和肠膜明串珠菌 (*Leuc. mesenteroides*) 为优势菌群, 这些研究结果进一步表明了自然发酵乳因地域、环境以及加工工艺等因素产生了丰富的乳酸菌多样性。

乳扇是云南省大理市白族地区的一种自然发酵乳制品, 也称邓川乳扇, 有着 500 多年的悠久历史。乳扇的传统制作方法主要是利用酸乳清凝乳, 然后经揉搓、拉伸等工艺制作。2009年, Liu 等<sup>[29]</sup> 对云南省大理市白族地区 20 份乳扇 (酸乳清) 样品的乳酸菌多样性进行研究, 共分离鉴定出 85 株乳杆菌和 9 株球菌, 其中瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) 56 株, 为乳扇制品的优势乳酸菌。由于乳扇制作过程有加热、蛋白质变性的工艺, 酸乳清中残留的乳酸菌偏向于高温型的瑞士乳酸菌 (*L. helveticus*)。该研究表明不同的加工工艺也是影响自然发酵乳中乳酸菌多样性的一个主要原因。因此不难看出, 不同地域、种类繁多的自然发酵乳因其多样的环境、加工差别以及不同乳源等因素, 势必造就了极为丰富的乳酸菌多样性。

## 2 基于焦磷酸测序技术的乳酸菌多样性分析

基于传统纯培养技术虽然可以从样品中培养出活体微生物, 但由于传统纯培养技术研究方法的局限性和片面性, 很难全面了解样品中微生物真实的多样性, 包括在样品中曾经存活但难以分离的部分

微生物更是检测不到<sup>[23]</sup>。为了系统深入地了解自然发酵乳制品中未知乳酸菌的分布、乳酸菌的真实多样性以及细菌的存活史, 内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室研究团队采用宏基因组策略, 以采集自中国、蒙古国和俄罗斯等国家不同乳源的 86 个自然发酵乳制品为研究对象, 从非培养的角度系统揭示了自然发酵乳制品的乳酸菌多样性。

早在 2012 年, 孙志宏等<sup>[30]</sup> 采用 454 高通量测序技术从宏基因组角度对西藏地区自然发酵牦牛乳中微生物多样性进行探索性研究, 以细菌 16S rRNA 的 V3 区为扩增、测序靶点, 分别获得 2 058 和 1 030 条高质量序列, 结果表明在门的水平上, 细菌主要由硬壁菌门 (Firmicutes) 组成, 同时还检测到变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的存在, 在属的水平上细菌的优势菌主要为乳杆菌属 (*Lactobacillus*), 与传统纯培养方法得出的结论一致。2014 年, Sun 等<sup>[31]</sup> 采用同样的方法对采集自中国内蒙古、甘肃、四川以及蒙古国的 17 个自然发酵乳样品进行分析, 共获得 54 986 条有效序列, 平均每个样品 3 234 条, 分别归属于 47 个细菌的属, 其中乳杆菌为绝对的优势菌群 (图 1)。所有样品中都共同存在乳球菌属 (*Lactococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 等 14 个常见的细菌属, 同时在个别样品中检测到埃希氏菌属 (*Escherichia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 等细菌存活过。

2015 年, Xu 等<sup>[32]</sup> 以细菌 16S rRNA 的 V3 区为扩增、测序靶点, 采用焦磷酸测序技术对采集自中国新疆的 22 个自然发酵乳样品进行多样性研究, 共获得 245 423 条有效序列, 归属于 6 个门、69 个细菌属。除了常见的硬壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和放线菌门 (Actinobacteria), 还检测到疣微菌门 (Verrucomicrobia) 和 TM7。69 个属中不仅存在着大量的乳酸菌, 乳杆菌属为绝对的优势菌群, 同时也检测到部分稀有细菌, 如醋酸菌属 (*Acetobacter*)、克吕沃尔氏菌属 (*Kluyvera*) 等, 大大丰富了自然发酵乳的细菌多样性。同年, Liu 等<sup>[33]</sup> 采用同样的方法, 对采集自中国西藏的 16 个自然发酵牦牛乳样品进行分析, 共获得 112 173 条有效序列, 归属为 11 个门, 其中硬壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和放线菌门 (Actinobacteria) 占总数的 99% 以上。与新疆、内蒙古等地区自然发酵乳样品研究相似, 乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 为

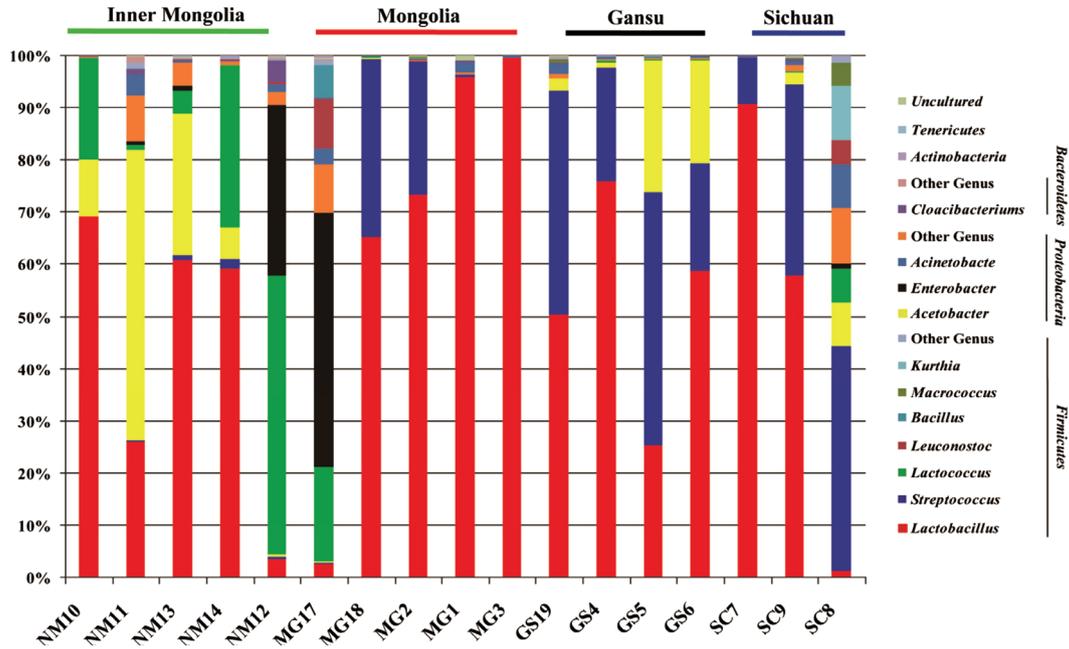


图1 自然发酵乳制品中细菌相对含量<sup>[31]</sup>

优势菌群。

2014年, Oki等<sup>[34]</sup>以16S rRNA基因V1-V2区为靶点的焦磷酸测序技术, 分析了蒙古国中央省、乌兰巴托、东戈壁等6个地区53份自然发酵乳中细菌多样性, 共获得192 888条有效序列, 归属于3个门21个属。其中乳杆菌属为核心组成, 瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)为酸马乳的优势菌群, 而马酒样乳杆菌(*L. kefiranoferiens*)是酸牛乳中主要菌群。

总之, 中国、蒙古国自然发酵乳制品中细菌组成基本相似(图2), 主要菌群依次为乳杆菌(*Lactobacillus*)、乳球菌(*Lactococcus*)、链球菌(*Streptococcus*)和醋酸杆菌(*Acetobacter*), 主要区别在于中

国发酵乳制品中醋酸杆菌(*Acetobacter*)的含量显著高于蒙古国样品, 不动杆菌(*Acinetobacter*)显著少于蒙古国样品。俄罗斯自然发酵乳中主要菌群依次为乳杆菌(*Lactobacillus*)、链球菌(*Streptococcus*)、乳球菌(*Lactococcus*)和醋酸杆菌(*Acetobacter*), 且乳杆菌(*Lactobacillus*)的含量显著低于中国和蒙古国自然发酵乳, 乳球菌(*Lactococcus*)和链球菌(*Streptococcus*)含量显著高于中国和蒙古国样品。

通过Chao1指数和Observed species分析发现, 俄罗斯自然发酵乳中细菌的丰度最高, 而中国样品中细菌丰度最低。从不同乳源角度分析发现自然发酵乳酪样品中细菌的丰度最高, 发酵牛乳、发酵牦

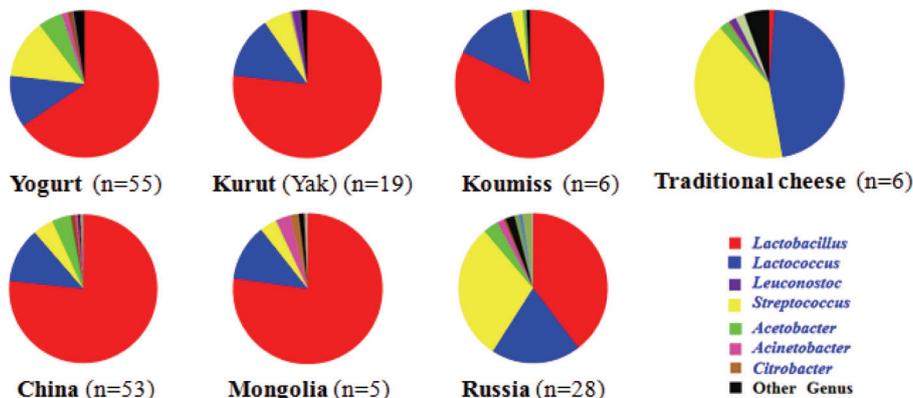


图2 自然发酵乳制品中乳酸菌相对含量

牛乳次之，发酵马乳样品中细菌丰度最低。同样地，通过 Shannon 和 Simpsons 分析也发现，俄罗斯自然发酵乳中的细菌多样性最高。从不同乳源角度也分析发现自然发酵酸马乳样品细菌多样性最低，乳酪样品中细菌多样性最高。

### 3 自然发酵乳中乳酸菌的遗传多样性

乳酸菌和其他细菌一样，为了快速适应新环境，通过基因水平转移、基因漂移等手段从环境中交换遗传物质以获得某些特性而生存。在乳酸菌基因组中可以看到基因水平转移 (HGT) 是个普遍的进化事件<sup>[35]</sup>，如乳球菌为了适应牛乳的生长环境，其基因组获得了具有特定功能的质粒 DNA 片段，使得增加或增强了乳糖代谢、水解蛋白、产生表面多糖、噬菌体抗性能力<sup>[36]</sup>。因此，自然发酵乳制品中的乳酸菌经历数千年的自然选择和驯化，势必会保留丰富的遗传多样性。随着分子生物学的不断发展，遗传学家已经发展了很多技术用于细菌种群结构的研究，其中多位点序列分型技术 (Multi-locus Sequence Typing, MLST)<sup>[37]</sup> 以其高通量、重复性强和易于交流、比较的特点<sup>[38]</sup>，在乳酸菌的遗传多样性和微进化研究中也得到了广泛地应用。

2015 年，Chen 等<sup>[39]</sup> 采用 *groEL*、*clpX*、*recA*、*rpoB* 和 *pepC* 等 5 个持家基因为靶点的 MLST 技术，对分离自我国内蒙古、青海和西藏自然发酵乳中的 39 株屎肠球菌 (*E. faecalis*) 进行微进化研究，共识别出 23 个序列型 (STs)，形成 4 个克隆复合体以及 12 个单体的序列型。通过重组预测和连锁不平衡分析表明，这些屎肠球菌 (*E. faecalis*) 存在着高度的种内基因重组；系统发育分析发现相同分离源的菌株呈明显的聚类关系 (图 3)，且这种聚类关系不受分离的影响。他们提出不同乳源的自然发酵乳中的屎肠球菌，为适应特异的生境而发生相应进化事件的假说。

2015 年，Xu 等<sup>[40]</sup> 采用 *carB*、*clpX*、*dnaA*、*groEL*、*murC*、*murE*、*pepN*、*pepX*、*pyrG*、*recA*、*rpoB* 和 *pheS* 等 12 个持家基因为靶点的 MLST 技术，对分离自我国内蒙古、青海、云南、西藏和甘肃等地区自然发酵乳中 197 株乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lc. lactis* subsp. *lactis*) 的遗传多样性进行分析。共识别出 72 个序列型，形成 14 个克隆复合体，显示出极为丰富的遗传多样性。进一步分析发现所选持家基因正处于负向选择，且伴随大量的种内同源重组事件。系统发育分析也表明大部分乳酸乳球菌乳酸亚

种 (*Lc. lactis* subsp. *lactis*) 分离株的序列型与其分离地有着直接的关系 (图 3)，表明相同生境的分离株为适应特殊生境发生了相似的进化历程。2015 年，Dan 等<sup>[41]</sup> 和 Zhang 等<sup>[42]</sup> 对乳酸明串珠球菌 (*Leuc. lactis*) 和肠膜明串珠菌 (*Leuc. mesenteroides*) 遗传多样性研究也显示出分离株有着丰富的遗传多样性，且亲缘关系与菌株分离源有直接的关系。

2015 年，Yu 等<sup>[43]</sup> 采用 10 个持家基因的 MLST 方法对分离自中国内蒙古、青海、西藏、云南、新疆及蒙古国、俄罗斯等地区的传统发酵奶制品中的 239 株嗜热链球菌 (*S. thermophilus*) 进行了遗传多样性研究，共识别出 117 个不同的序列型，形成 16 个亚群和 32 个单一的序列型，指出所选基因经历负选择的进化。结合分离地等信息构建 117 个 ST 型的最小生成树 (图 3)，显示出分离地与菌株亲缘关系有着显著的相关性，表明相同分离地的菌株经历了相同的进化历程。

2015 年，Song 等<sup>[44]</sup> 采用 8 个持家基因的 MLST 策略，对 298 株分离自中国、蒙古国及俄罗斯等地的传统发酵乳制品中的德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 菌株进行微进化分析。研究发现 119 个 ST 型，其中包括 13 个克隆复合体以及 64 个单独序列型，显示出自然发酵乳中不同分离株具有较高的遗传多样性。最小生成树分析 (图 3) 也显示出不同分离地的菌株 ST 型亲缘关系较近，也就是说不同的 ST 型之间具有较好的地域相关性。为了进一步分析这些菌株之间的种群结构和系统发育关系，研究人员基于联合序列进行了 Structure 分析，119 个 ST 型共形成 7 个谱系 (Lineage)，其中绝大多数的 ST 型来自于单一祖先，且每个地区都有自己独特的基因型，证实了乳酸菌分离株适应环境而发生特定进化的假说。但不同区间的菌株存在不同程度的基因交流传播，这很有可能是由于基因重组事件而导致的，ClonalFrame 分析也印证了这一推测。

2015 年，Sun 等<sup>[45]</sup> 采用 MLST 技术分析了 245 株分离自我国不同少数民族地区以及蒙古国地区瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*) 的遗传多样性，也指出分离株的聚类与分离乳源有关，即分离自酸牛奶、酸牛乳菌株和酸马乳均形成单独的类群，且分别有对应的祖先群体，显示出这些分离株为适应特定生境而发生的进化历程。为了系统分析自然发酵乳中乳酸菌分离株的遗传多样性，完成了 240 株干酪乳杆菌 (*L. casei*)<sup>[46]</sup>、209 株发酵乳杆菌 (*L. fermentium*)<sup>[47]</sup>

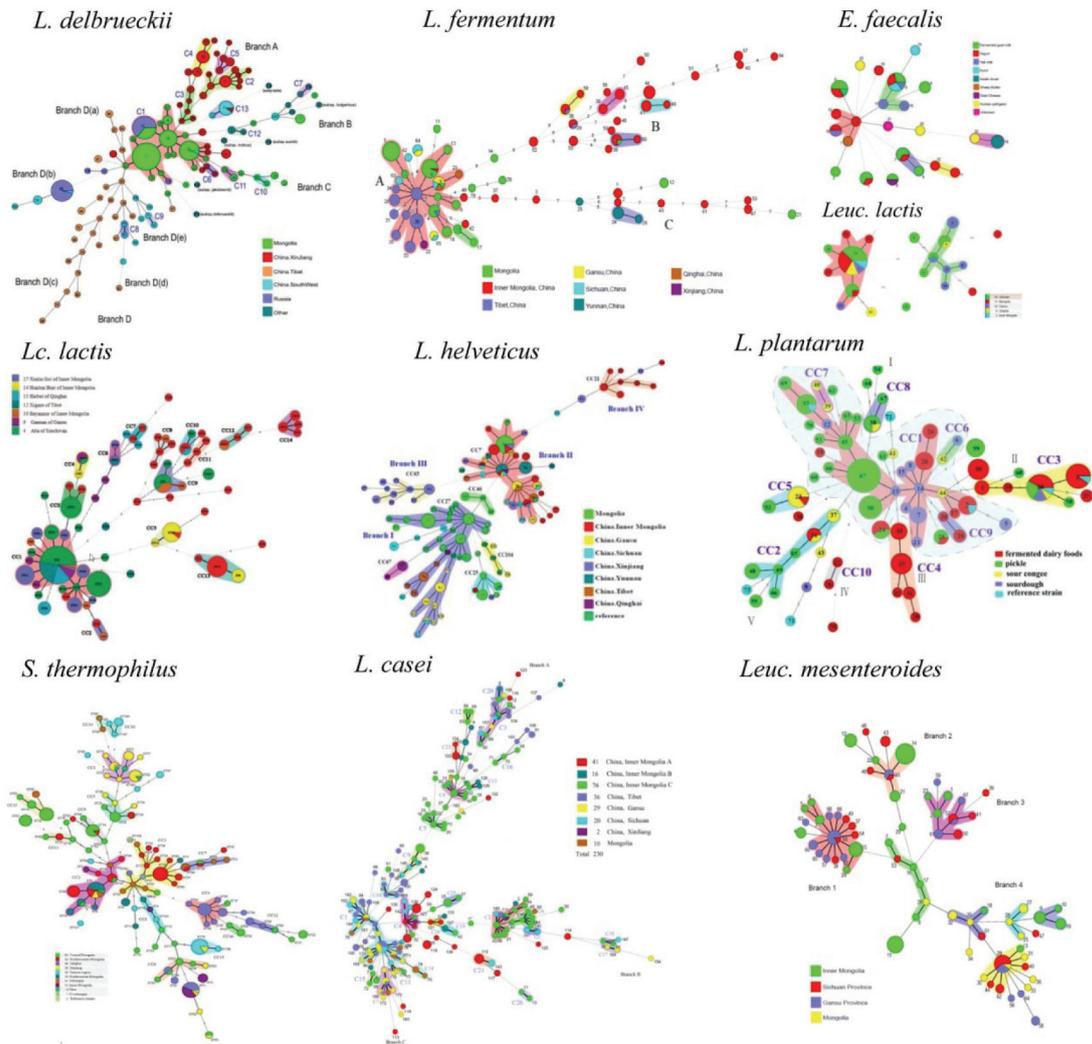


图3 乳酸菌分离株MLST最小生成树分析

和 192 株植物乳杆菌 (*L. plantarum*)<sup>[48]</sup> 的 MLST 分型研究, 结果表明大部分乳酸菌分离株的序列型与其分离源、分离地有着直接的关系, 即相同生境的分离株为适应特殊生境发生了相似的进化历程。

通过分析乳酸菌分离株的遗传多样性, 不仅从分子水平上认识了菌种基因水平上的进化过程, 同时揭示了不同分离地、分离源乳酸菌的系统发育关系, 演化其为适应不同环境而发生的进化过程, 从而为后续的研究、开发和利用奠定坚实的遗传学基础。

#### 4 展望

自然发酵乳制品中蕴藏着生物多样性极为丰富的乳酸菌资源, 遗憾的是, 随着现代经济和工业文明的发展, 自然发酵乳制品的制作在少数民族日常

生活中的地位越来越显得不重要。伴随着自然发酵乳制品的日渐式微, 其中珍贵的乳酸菌资源也必将会减少, 甚至最终消失。内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室多年来一直从事乳酸菌的物种多样性以及遗传多样性研究, 从中国、蒙古国、俄罗斯、巴拉圭等国家不同地区采集自然发酵乳制品等样品 2 048 份, 系统揭示自然发酵乳制品中乳酸菌的物种多样性, 从中分离乳酸菌 6 447 株, 包括乳酸菌的 8 个属, 68 个种及亚种, 建成中国最大的乳酸菌菌种资源库。但相对于其中蕴藏的乳酸菌资源, 目前的研究工作远远不够, 因此, 建立可行的研究方法, 以期真实地再现乳酸菌的生物多样性, 最大程度地挖掘、收集和保藏这些已知和未知乳酸菌, 对今后乳酸菌资源可持续利用及乳品工业的核心技术的提升有着重要的意义。

## [参 考 文 献]

- [1] Zhang H, Chen X, Dan T, et al. Traditional Chinese fermented dairy foods[M]//Zhang H, Cai Y, eds. Lactic acid bacteria fundamentals and practice. New York: Springer, 2014: 493-535
- [2] Zhang HP, Xu J, Wang JG, et al. A survey on chemical and microbiological composition of kurut, naturally fermented yak milk from Qinghai in China. *Food Control*, 2008, 19(6): 578-86
- [3] Wu R, Wang W, Yu D, et al. Proteomics analysis of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic bacterium isolated from traditional home-made koumiss in Inner Mongolia of China. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(10): 2321-38
- [4] Chen Y, Liu W, Xue J, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9. *J Dairy Sci*, 2014, 97(11): 6680-92
- [5] Sun Z, Chen X, Wang J, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain ND02. *J Bacteriol*, 2011, 193(13): 3426-7
- [6] Sun Z, Chen X, Wang J, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03. *J Bacteriol*, 2011, 193(3): 793-4
- [7] Ishii S, Kikuchi M, Takao S. Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts from "chigo" in Inner Mongolia, China. *Anim Sci Technol*, 1997, 68(3): 325-9
- [8] Burentegusi, Miyamoto T, Nakamura S, et al. Identification of lactic acid bacteria isolated from fermented mare's milk "Chigee" in Inner Mongolia, China. *Nihon Chikusan Gakkaiho*, 2002, 73: 441-8
- [9] An Y, Adachi Y, Ogawa Y. Classification of lactic acid bacteria isolated from chigee and mare milk collected in Inner Mongolia. *Anim Sci J*, 2004, 75: 245-52
- [10] Wu R, Wang L, Wang J, et al. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. *J Basic Microbiol*, 2009, 49(3): 318-26
- [11] Watanabe K, Fujimoto J, Sasamoto M, et al. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24: 1313-25
- [12] Takeda S, Yamasaki K, Takeshita M, et al. The investigation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Mongolian dairy products. *Anim Sci J*, 2011, 82(4): 571-9
- [13] Uchida K, Hirata M, Motoshima H, et al. Microbiota of 'airag', 'tarag' and other kinds of fermented dairy products from nomad in Mongolia. *Anim Sci J*, 2007, 78(6): 650-8
- [14] Ring E, Andersen R, Sperstad S, et al. Bacterial community of koumiss from Mongolia investigated by culture and culture-independent methods. *Food Biotechnol*, 2014, 28: 333-53
- [15] Sun Z, Liu W, Zhang J, et al. Identification and characterization of the dominant lactobacilli isolated from koumiss in China. *J Gen Appl Microbiol*, 2010, 56(3): 257-65
- [16] Hao Y, Zhao L, Zhang H, et al. Identification of the bacterial biodiversity in koumiss by denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific polymerase chain reaction. *J Dairy Sci*, 2010, 93(5): 1926-33
- [17] Airidengcaিকে, Chen X, Du X, et al. Isolation and identification of cultivable lactic acid bacteria in traditional fermented milk of Tibet in China. *Int J Dairy Technol*, 2010, 63(3): 437-44
- [18] Shuangquan, Burentegusi, Yu B, et al. Microflora in traditional starter cultures for fermented milk, hurunge, from Inner Mongolia, China. *Anim Sci J*, 2006, 77(2): 235-41
- [19] Liu W, Bao Q, Jirimutu, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiol Res*, 2012, 167(2): 110-5
- [20] Sun ZH, Liu WJ, Zhang JC, et al. Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk in Mongolia. *Folia Microbiol*, 2010, 55(3): 270-6
- [21] Yu J, Wang WH, Menghe BL, et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *J Dairy Sci*, 2011, 94(7): 3229-41
- [22] Yu J, Sun Z, Liu W, et al. Rapid identification of lactic acid bacteria isolated from home-made fermented milk in Tibet. *J Gen Appl Microbiol*, 2009, 55(3): 181-90
- [23] Liu WJ, Sun ZH, Zhang YB, et al. A survey of the bacterial composition of kurut from Tibet using a culture-independent approach. *J Dairy Sci*, 2012, 95(3): 1064-72
- [24] Sun Z, Liu W, Gao W, et al. Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria from kurut: the naturally fermented yak milk in Qinghai, China. *J Gen Appl Microbiol*, 2010, 56(1): 1-10
- [25] Bao Q, Liu W, Yu J, et al. Isolation and identification of cultivable lactic acid bacteria in traditional yak milk products of Gansu Province in China. *J Gen Appl Microbiol*, 2012, 58(2): 95-105
- [26] Bao Q, Yu J, Liu W, et al. Isolation and identification of predominant lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk products in Sichuan province of China. *Dairy Sci Technol*, 2012, 92(3): 309-19
- [27] Ao X, Zhang X, Shi L, et al. Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products. *J Dairy Sci*, 2012, 95(3): 1073-84
- [28] Tan Z, Pang H, Duan Y, et al. 16S ribosomal DNA analysis and characterization of lactic acid bacteria associated with traditional Tibetan Qula cheese made from yak milk. *Anim Sci J*, 2010, 81(6): 706-13
- [29] Liu W, Sun Z, Zhang J, et al. Analysis of microbial composition in acid whey for dairy fan making in Yunnan by conventional method and 16S rRNA sequencing. *Curr Microbiol*, 2009, 59(2): 199-205
- [30] 孙志宏, 刘文俊, 张和平. 基于宏基因组方法对西藏传统发酵牦牛奶中微生物多样性的研究. *北京工商大学学报(自然科学版)*, 2012, 30(4): 19-24
- [31] Sun Z, Liu W, Bao Q, et al. Investigation of bacterial and fungal diversity in tarag using high-throughput sequencing. *J Dairy Sci*, 2014, 97(10): 6085-96
- [32] Xu H, Liu W, Gesudu Q, et al. Assessment of the bacterial

- and fungal diversity in home-made yoghurts of Xinjiang, China by pyrosequencing. *J Sci Food Agric*, 2015, 95(10): 2007-15
- [33] Liu W, Xi X, Sudu Q, et al. High-throughput sequencing reveals microbial community diversity of Tibetan naturally fermented yak milk. *Ann Microbiol*, 2015: 1013
- [34] Oki K, Dugersuren J, Demberel S, et al. Pyrosequencing analysis of the microbial diversity of airag, khoormog and tarag, traditional fermented dairy products of mongolia. *Biosci Microbiota, Food Health*, 2014, 33(2): 53-64
- [35] Zhang W, Zhang H. Genomics of lactic acid bacteria[M]// Zhang H, Cai Y, eds. *Lactic acid bacteria fundamentals and practice*. New York: Springer, 2014: 205-48
- [36] 张文羿, 孟和, 张和平. 乳酸菌基因组学研究进展. *微生物学报*, 2008, 48(9): 1270-5
- [37] Feil EJ, Maiden M, Achtman M, et al. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(11): 1496-502
- [38] Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol*, 2003, 11(10): 479-87
- [39] Chen X, Song Y, Xu H, et al. Genetic relationship of *Enterococcus faecalis* from different sources revealed by multilocus sequence typing. *J Dairy Sci*, 2015, [Epub ahead of print]
- [40] Xu H, Sun Z, Liu W, et al. Multilocus sequence typing of *Lactococcus lactis* from naturally fermented milk foods in ethnic minority areas of China. *J Dairy Sci*, 2014, 97(5): 2633-45
- [41] Dan T, Liu W, Sun Z, et al. A novel multi-locus sequence typing (MLST) protocol for *Leuconostoc lactis* isolates from traditional dairy products in China and Mongolia. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 150
- [42] Zhang W, Liu W, Song Y, et al. Multilocus sequence typing of dairy-associated *Leuconostoc mesenteroides* population reveals clonal structure with intragenic homologous recombination. *J Dairy Sci*, 2015, 98: 2284-93
- [43] Yu J, Sun Z, Liu W, et al. Multilocus Sequence Typing of *Streptococcus thermophilus* from Naturally Fermented Dairy Foods in China and Mongolia. *BMC Microbiol*, 2015, [Inpress]
- [44] Song Y, Sun Z, Zhang H, et al. Genetic diversity and population structure of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* isolated from Naturally Fermented Dairy Foods in China, Mongolia, Russia according to MLST analysis. *Sci Rep*, 2015, [Inpress]
- [45] Sun Z, Liu W, Song Y, et al. Population structure of *Lactobacillus helveticus* isolates from naturally fermented dairy products based on multilocus sequence typing. *J Dairy Sci*, 2015, 98: 2962-72
- [46] Bao Q, Song Y, Xu H, et al. Multilocus sequence typing (MLST) of *Lactobacillus casei* strains isolated from naturally fermented foods in China and Mongolia. *Microbiol*, 2015, [Inpress]
- [47] Dan T, Sun Z, Song Y, et al. A new perspective on *Lactobacillus fermentum* evolution and population structure according to multilocus sequence typing (MLST). *BMC Microbiol*, 2015, 15: 107
- [48] Xu H, Liu W, Zhang W, et al. A new multilocus sequence typing scheme for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *J Appl Microbiol*, 2015, [Inpress]