

新疆传统酸马奶中肠球菌的分离鉴定与益生特性评价

朱昊毅, 刘庆玲, 张 喆, 张婧瑜, 牛丝瑜, 李 涛, 李 静*

(塔里木大学动物科学与技术学院, 新疆兵团塔里木动物疫病诊断与防控工程实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘 要: 为深入挖掘酸马奶中益生菌, 以新疆南山地区酸马奶为研究对象, 从中分离筛选肠球菌, 并评估筛选菌株的安全性及生物学特性, 基于21项指标, 采用主成分分析与Z-score综合评分对各菌株的益生性能进行综合评价。结果表明, 共从酸马奶中成功分离鉴定出10株乳酸菌, 其中菌株7879鉴定为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*), 其他菌株鉴定为乳肠球菌 (*Enterococcus lactis*)。安全性评价显示, 10株肠球菌均为 γ -溶血, 且对多数临床常用抗生素敏感。生物学特性显示, 各菌株碳源利用谱一致, 生长与产酸性能稳定, 在40~50 °C条件下耐热性良好。综合评价结果表明, 菌株7876综合评分最优, 其细胞表面疏水性为85.83%, 8 h自凝集率为58.05%, 60 °C、pH 4.0条件下存活率分别为62.77%、59.37%, 耐酸、耐胆盐能力优良, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌具有抑菌作用, 具有较强的肠道定植潜力及体外抑菌能力。综上, 本研究筛选的肠球菌菌株安全性良好, 益生特性优异, 可为益生菌制剂开发提供优质候选菌种资源。

关键词: 新疆传统酸马奶; 肠球菌; 分离鉴定; 益生特性

Isolation, Identification and Evaluation of Probiotic Property of Enterococci from Traditional Koumiss in Xinjiang

ZHU Haoyi, LIU Qingling, ZHANG Zhe, ZHANG Jingyu, NIU Siyu, LI Tao, LI Jing*

(Tarim Animal Disease Diagnosis and Prevention Engineering Laboratory of Xinjiang Production and Construction Corps, College of Animal Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, China)

Abstract: To further explore probiotics in koumiss, traditional koumiss collected from the Nanshan area of Xinjiang was taken as the research material. *Enterococcus* strains were isolated and screened therefrom, and their safety and biological characteristics were assessed. Based on 21 indicators, principal component analysis (PCA) and Z-score comprehensive scoring were applied for the comprehensive evaluation of probiotic properties of all tested strains. The results showed that a total of 10 lactic acid bacteria were successfully isolated and identified. Among them, a strain 7879 was identified as *Enterococcus faecium*, and the remaining strains were classified as *Enterococcus lactis*. Safety evaluation revealed that all 10 *Enterococcus* strains presented γ -hemolytic activity and were susceptible to the most commonly used clinical antibiotics. Biological characteristics revealed that the strains had consistent carbon source utilization profiles, stable growth and acid production patterns, and heat resistance at 40–50 °C. Comprehensive evaluation results demonstrated that the strain 7876 obtained the optimal comprehensive score. Its cell surface hydrophobicity was 85.83%, and the autoaggregation rate reached 58.05% after 8 h of cultivation. The survival rates were 62.77% at 60 °C and 59.37% at pH 4.0, respectively. This strain exhibited excellent acid resistance and bile salt tolerance, and presented inhibitory effects against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae*, with strong potential for intestinal colonization and *in vitro* antibacterial capacity. In conclusion, the screened *Enterococcus* strains had favorable safety and

收稿日期: 2026-01-16

基金项目: 塔里木大学大学生创新创业训练计划项目 (202410757010)

第一作者简介: 朱昊毅 (2003—) (ORCID: 0009-0008-0889-9301), 男, 本科生, 研究方向为动物食品微生物检疫。

E-mail: 1390512018@qq.com

*通信作者简介: 李静 (1991—) (ORCID: 0000-0002-4413-8197), 女, 副教授, 博士, 研究方向为动物群发病防治。

E-mail: xiaoshouyij@163.com

superior probiotic properties, which can provide high-quality candidate strain resources for the development of probiotic preparations.

Keywords: Xinjiang traditional koumiss; *Enterococcus*; isolation and identification; probiotic property

DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.06.021

中图分类号: TS252.1; TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 0254-5071 (2026) 06-0166-08

引文格式:

朱昊毅, 刘庆玲, 张喆, 等. 新疆传统酸马奶中肠球菌的分离鉴定与益生特性评价[J]. 中国酿造, 2026, 45(6): 166-173.

DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.06.021. <http://www.chinabrewing.net.cn>

ZHU Haoyi, LIU Qingling, ZHANG Zhe, et al. Isolation, identification and evaluation of probiotic property of enterococci from traditional koumiss in Xinjiang[J]. China Brewing, 2026, 45(6): 166-173. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.06.021. <http://www.chinabrewing.net.cn>

酸马奶是古代游牧民族将马乳装入皮囊随身携带, 在骑马颠簸的机械搅拌与人体体温协同作用下, 经乳酸菌与酵母菌自然发酵形成的含乳酸、乙醇及二氧化碳的发酵乳饮料^[1]。酸马奶风味独特, 具有增强机体免疫力、缓解氧化应激损伤、维持肠道菌群结构稳态等多种功能^[2-3]。在酸马奶发酵体系中, 乳酸菌是发挥益生作用的核心功能菌群, 也是目前酸马奶相关研究的重点方向与热点内容^[1,4]。

乳酸菌是一类能分解碳水化合物生成乳酸的无芽孢革兰氏阳性细菌, 广泛存在于发酵食品中, 多数菌株具备益生功能^[5]。在酸马奶中, 乳酸菌组成具有地域差异: 欧洲酸马奶以乳球菌属 (*Lactococcus*) 为优势菌群, 亚洲酸马奶以乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 为主^[1]。新疆是亚洲传统发酵乳制品的重要产区, 不同产地酸马奶的微生物群落结构存在明显的地域差异, 本土乳酸菌资源丰富, 为具有地域特色的优良功能菌株筛选提供了天然的研究材料^[6]。传统酸马奶中分离鉴定出的乳酸菌有嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)^[7]、耐肠球菌 (*Enterococcus durans*)^[8]、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)^[9]等, 且诸多菌株被证实具备优良益生功能。其中, 肠球菌菌株对金黄色葡萄球菌、李斯特菌等常见食源性致病菌具有广谱抑菌活性, 其代谢分泌的细菌素还兼具耐热、耐酸等优良特性^[9], 且与植物乳杆菌混合发酵可改善酸马奶风味^[10]。然而, 关于新疆乌鲁木齐南山地区酸马奶中具有益生潜力的肠球菌的系统性研究报道仍较为鲜见, 尤其在菌株资源挖掘、安全性评价及益生特性系统分析方面存在不足^[2,11-12]。

本研究以采自新疆乌鲁木齐南山牧场、经传统自然发酵工艺制备的酸马奶为研究对象, 采用溶钙圈法筛选乳酸菌, 结合形态学观察与分子生物学进行鉴定; 评估筛选菌株安全性、生物学特性及益生特性, 并结合主成分分析 (principal component analysis, PCA)、层次聚类

分析及Z-score综合评分筛选优良菌株, 以期工业化发酵剂及益生菌制剂的开发提供优质菌种资源, 并为其在食品、医药等领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酸马奶 乌鲁木齐县南山地区某农户; 金黄色葡萄球菌ATCC 29213标准株、大肠杆菌ATCC 25922标准株、肺炎克雷伯菌ATCC 700603标准株 上海保藏微生物有限公司; 牛胆盐 广东环凯生物科技有限公司; 二甲苯 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 羊血 塔里木大学动物实验中心; 药敏纸片 北京拜尔迪生物技术有限公司; DL2000 DNA Marker 北京金沙生物科技有限公司; 细菌微量生化鉴定管SHBG13 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯或生化试剂。

MRS固体培养基、MRS液体培养基、LB固体培养基、LB液体培养基、MH固体培养基、MH液体培养基、胰蛋白胨大豆肉汤 (tryptic soy broth, TSB) 固体培养基、TSB液体培养基、脑心浸出液琼脂 (brain heart infusion agar, BHIA) 培养基 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

FE28 pH计、ME104E电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司; MicroScreen实时微生物生长分析系统 杰灵仪器制造 (天津) 有限公司; E200厌氧工作站 美国Gene Science公司; TFD-1D-95+高速冷冻干燥机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; DYY-12C电泳仪 北京六一生物科技有限公司; MINI Space 1000凝胶图像分析系统 上海天能科技有限公司; ZWYR-240恒温摇床 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌的分离与纯化

将酸马奶以4 000 r/min离心3 min, 分别收集乳脂层、菌体沉淀, 分别取乳脂层、菌体沉淀及全酸马奶3种样品, 采用无菌生理盐水进行梯度稀释, 取100 μL 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释液涂布于MRS固体培养基, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧工作站(2% O_2 、10% CO_2 、88% N_2)中培养48 h^[13]。培养结束后, 挑取形态、大小、颜色各异单菌落, 连续划线转接培养3次, 直至获得形态一致的纯培养物。

1.3.2 乳酸菌的筛选与鉴定

1.3.2.1 菌株的筛选

采用溶钙圈法对乳酸菌进行初筛。挑取平板上呈白色、不透明或半透明、边缘整齐、表面光滑湿润、中央微凸起且周围具有明显透明溶钙圈的菌落。将初筛获得的单菌落连续划线纯化3代, 直至获得形态均一的纯培养菌株, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.2.2 菌株的鉴定

形态学观察: 挑取菌落特征为白色、部分透明、边缘规整、中部突起、表面湿润或粗糙的单菌落, 结合菌落形态特征与革兰氏染色显微镜观察结果, 进行形态学鉴定。

分子生物学鉴定: 采用十六烷基三甲基溴化铵法提取菌株基因组DNA, 以基因组DNA为模板, 采用细菌16S rDNA通用引物27F和1492R进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增^[2]。PCR扩增体系(25 μL): 2 $\times$ PCR Mix 12.5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 正反向引物各0.5 μL 、DNA模板1 μL 、无菌去离子水10.5 μL 。PCR扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸90 s, 共34个循环, 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后送至新疆有康生物科技有限公司进行测序。将获得的原始正反向序列经SeqMan软件拼接后, 提交至NCBI GenBank数据库, 利用BLAST工具进行序列比对。选取同源性较高的模式菌株16S rDNA序列, 采用MEGA 12软件以邻接法构建系统发育树, 根据菌株间亲缘关系确定其分类学地位。

1.3.3 安全性评价

溶血试验^[14]: 配制血平板(100 mL TSB固体培养基+5 mL羊血), 常规划线接种肠球菌, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养24 h, 观察菌落周围是否出现溶血环, 并记录其溶血类型(α -溶血、 β -溶血、 γ -溶血), 以金黄色葡萄球菌为阳性对照。

药敏试验^[14]: 菌株经5 mL LB液体培养活化基活化, 取300 μL 菌液加入5 mL MH液体培养基, 充分混匀后调整至麦氏比浊度0.5; 取100 μL 菌液均匀涂布于MH固体培养基, 待培养基表面干燥后, 将12种药敏纸片放置于培

养基表面, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养12 h后测量抑菌圈直径, 依据抑菌圈直径评价药敏特性。

1.3.4 生物学特性评价

1.3.4.1 碳水化合物利用能力测定

挑取乳酸菌单菌落, 用2 mL无菌生理盐水重悬, 参照细菌微量生化鉴定管说明书进行测定, 取100 μL 菌悬液分别添加至含有七叶苷、纤维二糖、麦芽糖、甘露醇、水杨苷、山梨醇、蔗糖、棉子糖、菊糖及乳糖的微量生化鉴定管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养24 h。乳酸菌若能利用七叶苷, 则鉴定管的培养基颜色会由紫色变为黑色, 即为阳性结果, 不变色则为阴性; 菌株若利用糖或糖醇类物质产酸, 鉴定管的培养基颜色则会由紫色变为黄色, 即为阳性结果, 不变色则为阴性, 记录菌株对10种碳水化合物的利用情况。

1.3.4.2 生长曲线测定

将纯化后的乳酸菌接种于MRS液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养48 h, 定期取样测定 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值, 以培养时间为横坐标, $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值为纵坐标绘制生长曲线^[15]。

1.3.4.3 耐热特性测定

将活化后的乳酸菌接种于MRS液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养48 h, 按2%接种量接入5 mL MRS液体培养基, 分别置于37、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中静置处理20 min; 取出后转移至37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床150 r/min继续培养10 h, 测定 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值, 以37 $^{\circ}\text{C}$ 处理为对照组, 存活率按式(1)计算^[15]:

$$\text{存活率}/\% = \frac{\text{处理组OD}_{600\text{ nm}}}{\text{对照组OD}_{600\text{ nm}}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.4.4 产酸性能测定

将纯化后的乳酸菌接种于MRS液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧静置培养12 h; 按1%接种量转接至MRS液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧静置培养24 h, 每隔2 h取样, 测定培养液的pH值; 以培养时间为横坐标, pH值为纵坐标绘制产酸曲线^[16]。

1.3.5 益生特性分析

1.3.5.1 表面疏水性测定

将纯化后的乳酸菌接种于MRS液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养16 h后, 4 000 r/min离心10 min, 弃上清液, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)重悬调整 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值至0.6~0.8(记为 A_0); 取1 mL菌悬液与333 μL 二甲苯混合, 漩涡振荡后室温静置30 min, 测定下层水相 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值(记为 A_s)^[2], 疏水性按式(2)计算:

$$\text{疏水性}/\% = \left(1 - \frac{A_s}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

1.3.5.2 自凝集能力测定

取4 mL $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值为0.6~0.8的菌悬液, 振荡混匀后于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养8 h, 分别于4、6、8 h取上层菌液测定 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 值(记为 A_t), 自凝集率按式(3)计算:

$$\text{自凝集率}/\% = (1 - \frac{A_t}{A_0}) \times 100 \quad (3)$$

1.3.5.3 酸及胆汁耐受性测定

乳酸菌经活化、离心洗涤3次后,将洗涤后的菌液分别接入pH 2.0、3.0、4.0的MRS液体培养基(加稀盐酸调节)及含0.3%、0.5% (m/m)牛胆盐的MRS液体培养基,37℃培养4 h;分别取培养0、4 h菌液10 μL接种于MRS固体培养基,37℃培养16 h后采用平板菌落计数法检测活菌数,以存活率评价其酸耐受性与胆盐耐受能力,按式(4)计算:

$$\text{存活率}/\% = \frac{\text{处理后4 h活菌数}}{\text{初始0 h活菌数}} \times 100 \quad (4)$$

1.3.5.4 抑菌活性测定

乳酸菌经扩大培养后离心,上清液冷冻干燥,复溶后经0.22 μm滤膜过滤获得无细胞发酵上清液;3种食源性致病菌培养18 h后稀释至 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL,取100 μL涂布于LB固体培养基,等距离放置灭菌牛津杯,加入200 μL无细胞发酵上清液,以无菌MRS培养基作为空白对照;4℃扩散6 h后,37℃培养24 h,观察并测定抑菌圈直径。

1.3.6 潜在益生菌筛选

参照赵志霞等^[13]的方法,采用R语言对筛选菌株的安全性、生物学特性、益生特性共21项指标进行标准化数据处理,结合Z-score进行综合评分与排序。

1.4 数据处理

所有实验均独立重复3次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用Excel 2021进行数据整理,采用GraphPad Prism 9.0绘图;采用R 4.3.1软件进行PCA、层次聚类分析及Z-score综合评分,其中PCA载荷图、得分图及雷达图使用ggplot2和factoextra包绘制,聚类树状图使用pheatmap包绘制。采用SPSS 26.0软件进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间差异显著性检验采用LSD法,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离与鉴定

酸马奶样品中共分离筛选出10株菌(编号分别为7866、7870、7871、7872、7874、7876、7877、7878、7879、7958)。筛选菌株的菌落形态多为白色或半透明的乳白色,边缘整齐,呈圆形凸起或扁平状,表面光滑湿润,易于挑起。由图1A可知,分离株7866菌落呈乳白色,边缘完整,表面光滑,有光泽;由图1B可知,菌体呈球形,多以短链或长链状排列,经革兰氏染色后呈紫色(革兰氏阳性),与乳酸菌的典型形态特征一致。

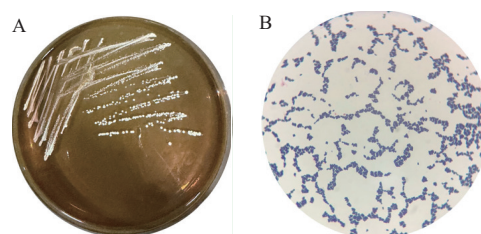


图1 代表菌株7866菌落(A)及细胞(B)形态
Fig. 1 Morphology of colonies (A) and cells (B) of the representative strain 7866

2.2 分子生物学鉴定

由图2可知,9株菌(7866、7870、7871、7872、7874、7876、7877、7878、7958)与乳肠球菌(*Enterococcus lactis*)模式菌株聚为一支,序列同源性 $\geq 97\%$,鉴定为乳肠球菌;菌株7879与屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) CDCP1447聚为一支,序列同源性 $\geq 99\%$,鉴定为屎肠球菌。

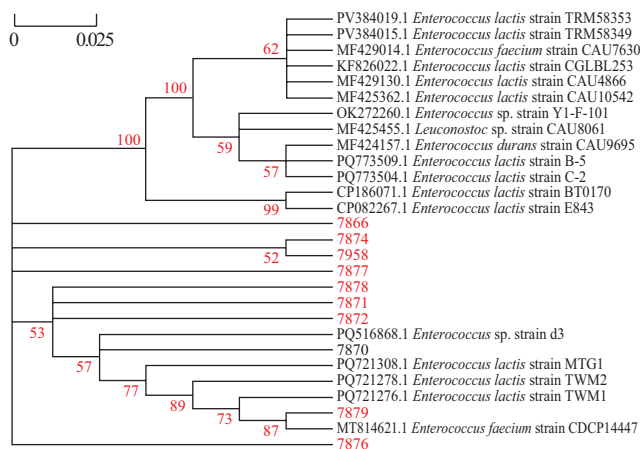


图2 基于16S rDNA基因序列构建的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree constructed based on 16S rDNA gene sequences

2.3 肠球菌的安全性评价

2.3.1 溶血性

若微生物产生溶血素,会对血细胞、有核细胞及血小板造成损伤,影响机体健康^[11]。由图3可知,10株菌在血平板上均未出现 α -溶血环和 β -溶血环,菌落周围无透明圈、无绿色褪色区,全部表现为 γ -溶血(无溶血性),表明这些菌株在溶血性方面符合益生菌安全应用的基本要求。



图3 代表菌株7866的溶血试验结果
Fig. 3 Hemolysis test results of the representative strain 7866

2.3.2 药敏性

菌株对抗生素的敏感性是评价益生菌安全性的关键^[17]。由表1可知, 10株肠球菌对氟苯尼考、多西环素、万古霉素、磷霉素、氨苄西林等常用抗生素敏感, 仅对四环素、红霉素、氯霉素、环丙沙星等少数抗生素呈中介耐药, 未检测到完全耐药菌株, 整体安全性良好。综上, 肠球菌分离株对抗生素的敏感性具有菌株特异性。

表1 酸马奶中分离肠球菌抗生素敏感性
Table 1 Antibiotic susceptibility test results of *Enterococcus* isolated from koumiss

抗生素	菌株编号									
	7866	7870	7871	7872	7874	7876	7877	7878	7879	7958
四环素 (30 µg/片)	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
氟苯尼考 (30 µg/片)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
多西环素 (30 µg/片)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
红霉素 (15 µg/片)	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
万古霉素 (30 µg/片)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
氯霉素 (30 µg/片)	I	I	S	S	S	S	I	I	S	S
磷霉素 (50 µg/片)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
环丙沙星 (5 µg/片)	I	I	I	S	S	I	I	S	S	S
利福平 (5 µg/片)	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
克林霉素 (2 µg/片)	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
青霉素 (10单位)	S	I	I	I	S	S	S	I	I	S
氨苄西林 (10 µg/片)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

注: I.中介; S.敏感。

2.4 肠球菌基础生物学特性评价

2.4.1 碳水化合物发酵能力

表2 酸马奶中分离肠球菌的碳水化合物发酵能力
Table 2 Carbohydrate fermentation capabilities of *Enterococcus* isolated from koumiss

项目	菌株编号									
	7866	7870	7871	7872	7874	7876	7877	7878	7879	7958
七叶苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
水杨苷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
山梨醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
棉子糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
菊糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: +.阳性, 微生物具备代谢能力; -.阴性, 不具备代谢能力。

乳酸菌对碳水化合物的利用能力直接决定其在不同发酵基质中的生长、定植及最终产物的形成^[18]。由表2可

知, 肠球菌可代谢二糖(纤维二糖、麦芽糖、乳糖)、三糖(棉子糖)、多糖(菊糖)及糖苷类(七叶苷、水杨苷), 符合肠球菌典型生化特性, 能有效利用酸马奶中天然碳水化合物, 为其在发酵体系定植与代谢提供物质基础^[19]。

2.4.2 生长性能及产酸性能

由图4A可知, 10株菌在MRS培养基中生长趋势一致, 0~6 h为延迟期, 6 h左右进入对数生长期, 8~9 h时OD_{600 nm}值达到峰值, 随后进入稳定期与衰亡期。菌株生长曲线高度相似, 结合碳源利用谱与系统发育分析结果, 推测其遗传背景较为接近^[20]。由图4B可知, 各菌株产酸过程与生长进程同步。培养初始pH值约为5.70, 0~6 h阶段快速产酸, pH值下降幅度为1.11~1.35; 6 h后产酸速率趋缓, 12 h后pH值趋于稳定, 最终维持在4.00~4.30之间。培养结束时, 各菌株pH值存在一定差异, 其中菌株7872 pH值最低(4.00), 菌株7876 pH值相对较高(4.15)。肠球菌产酸符合“生长驱动产酸、产酸反馈抑制生长”的代谢模式^[21-22], 表明各菌株整体呈现典型的生长-代谢协同特征。

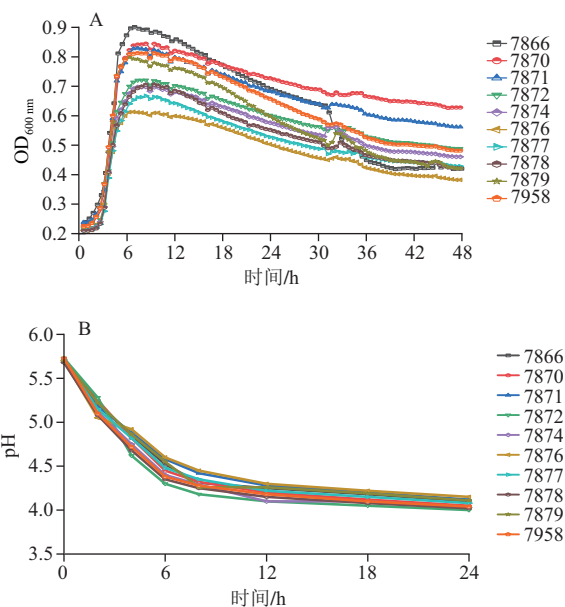


图4 酸马奶中分离肠球菌的生长曲线(A)及产酸性能曲线(B)
Fig. 4 Growth curves (A) and acid production performance curves (B) of *Enterococcus* isolated from koumiss

2.4.3 耐热性能

由表3可知, 10株肠球菌耐热性随温度升高呈下降趋势, 40 °C与50 °C条件下存活率较高, 60 °C条件下存活率明显降低。40 °C处理后菌株存活率为96.61%~117.40%, 菌株7877存活率最高(117.40%), 菌株7871的存活率最低(96.61%); 50 °C处理后肠球菌存活率为85.20%~121.21%, 菌株7878存活率最高(121.21%), 菌株7870的存活率最低(85.20%); 60 °C处理后存活率均低于62.77%, 其中菌株7876存活率

最高（62.77%），菌株7879存活率最低（11.74%），表现出明显的菌株特异性。各温度条件下，各菌株存活率均无显著差异（ $P>0.05$ ）。

表3 酸牛奶中分离肠球菌的耐热性能
Table 3 Thermal resistance characteristics of *Enterococcus* isolated from koumiss

温度/℃	存活率/%									
	7866	7870	7871	7872	7874	7876	7877	7878	7879	7958
40	105.14	100.04	96.61	112.49	108.71	99.75	117.40	107.02	100.74	99.43
50	115.37	85.20	93.66	105.90	106.52	109.35	101.49	121.21	92.83	119.51
60	25.22	19.37	14.92	16.65	37.66	62.77	31.52	20.69	11.74	19.41

2.5 肠球菌益生特性

2.5.1 表面疏水性与自凝集能力

益生菌在肠道黏膜表面的黏附与定植能力是其发挥益生功能的重要前提与生理基础。益生菌通过自身表面结构黏附于肠道上皮细胞及黏液层，能够有效抵抗肠道蠕动、食物推送及肠道内容物的冲刷清除作用，进而在肠道内形成稳定菌群并长期定植^[23]。如图5A所示，10株菌细胞表面疏水性存在差异，菌株7876、7872及7874疏水性较高，分别达85.83%、82.53%和70.98%，菌株7878、7958、7877疏水性处于中间水平（53.30%~67.47%），菌株7870、7866、7879疏水性处于较低水平（22.59%~32.16%），菌株7871疏水性最低（18.61%）。

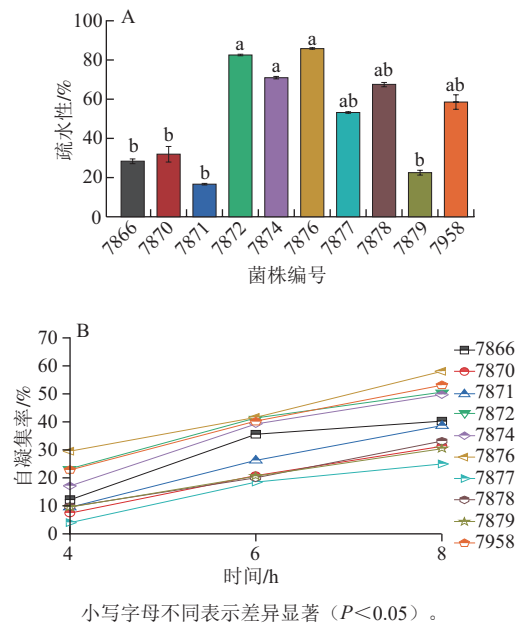


图5 酸牛奶中分离肠球菌疏水性（A）与自凝集率（B）
Fig. 5 Hydrophobicity (A) and autoaggregation (B) of *Enterococcus* isolated from koumiss

菌株自凝集能力与其肠道定植潜力及抑菌功能密切相关，自凝集率数值越高，代表菌株自身聚集黏附能力越强，越有利于在肠道环境中形成聚集，提升

定植稳定性与益生作用发挥效果^[24]。各菌株自凝集率随时间延长逐渐升高，如图5B所示，4 h时，各菌株自凝集率为3.89%~29.51%，其中菌株7876自凝集率最高（29.51%），菌株7877自凝集率最低（3.89%）；6 h时，各菌株的自凝集率为18.45%~41.58%，其中菌株7876自凝集率最高（41.58%），菌株7877自凝集率最低（18.45%）；8 h时，各菌株自凝集率为24.94%~58.05%，菌株7872、7876、7958均超过50%，其中菌株7876自凝集率最高（58.05%），显著高于其他菌株（ $P<0.05$ ），肠道黏附定植潜力最佳，而菌株7877自凝集率最低（24.94%），定植潜力相对较弱。

综上，菌株7876细胞表面疏水性黏附定植潜力最优。

2.5.2 酸及胆汁耐受性

耐酸与耐胆盐特性是肠球菌发挥益生功能的核心基础，该特性依赖菌体自身的应激响应调控系统^[25]，可经外源性益生元进一步增强^[26]。由表4可知，菌株耐酸、耐胆盐能力呈显著的环境依赖性与菌株特异性。pH 2.0时，各菌株存活率普遍偏低（0%~43.23%），pH值升至4.0时，菌株存活率明显提升，菌株7874、7876存活率分别达58.09%、59.37%，菌株7870仅为31.52%，差异显著（ $P<0.05$ ）。胆盐胁迫条件下，0.3%胆盐处理后，仅菌株7879、7958存活率超50%，其他菌株存活率均低于32%；胆盐质量分数增至0.5%时，整体存活率进一步下降，仅菌株7879、7958分别维持在较高水平（41.54%、43.22%）。结果表明，菌株7879、7958具备良好的胃酸与胆盐耐受能力，可在消化道内存活并发挥益生作用。

表4 酸牛奶中分离肠球菌的耐酸与耐胆盐特性
Table 4 Acid-resistant and bile salt-resistant characteristics of *Enterococcus* isolated from koumiss

环境	存活率/%									
	7866	7870	7871	7872	7874	7876	7877	7878	7879	7958
pH 2.0	10.11	0	0	23.52	33.20	43.23	12.51	33.91	13.85	21.54
pH 3.0	31.62	13.31	22.53	31.26	51.28	49.71	33.18	39.81	42.10	31.87
pH 4.0	51.81 ^a	31.52 ^b	32.80 ^b	33.82 ^b	58.09 ^a	59.37 ^a	49.16 ^{ab}	49.26 ^{ab}	50.18 ^a	32.44 ^b
0.3%胆盐	21.21 ^{bc}	11.95 ^c	31.23 ^b	22.50 ^b	31.52 ^b	31.88 ^b	22.03 ^b	13.51 ^{bc}	51.58 ^a	52.32 ^a
0.5%胆盐	11.54	10.70	21.74	21.46	21.56	10.54	20.15	10.51	41.54	43.22

注：同行小写字母不同表示差异显著（ $P<0.05$ ）。表5同。

2.5.3 抑菌活性

肠球菌可产生细菌素、有机酸、过氧化氢、挥发性化合物等多种抗菌代谢物，对食源性临床致病菌具有广谱抑菌活性^[27-29]。由表5可知，不同菌株对3种致病菌的抑菌效果差异显著，菌株7870对金黄色葡萄球菌的抑菌圈最大（29.94 mm），其次为7878（29.48 mm）；菌株7879对大肠杆菌的抑菌圈最大（27.40 mm）；所有菌

株对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及肺炎克雷伯菌的抑菌作用较强,表现出明显的菌株特异性与靶标依赖性。综上,菌株7870、7878、7879有广谱抑菌性。

表5 肠球菌对指示致病菌的抗菌活性
Table 5 Antibacterial activity of *Enterococcus* against indicator pathogenic bacteria

菌株编号	抑菌圈直径/mm									
	7866	7870	7871	7872	7874	7876	7877	7878	7879	7958
金黄色葡萄球菌 ATCC 29213	22.67 ^b	29.94 ^a	26.84 ^a	24.20 ^{ab}	22.68 ^b	20.32 ^b	24.13 ^{ab}	29.48 ^a	25.55 ^{ab}	19.41 ^b
大肠杆菌 ATCC 25922	21.16	23.63	24.51	23.99	23.79	23.23	24.24	25.44	27.40	22.73
肺炎克雷伯菌 ATCC 700603	21.50	23.52	25.17	26.46	22.25	21.09	20.82	23.12	24.74	22.91

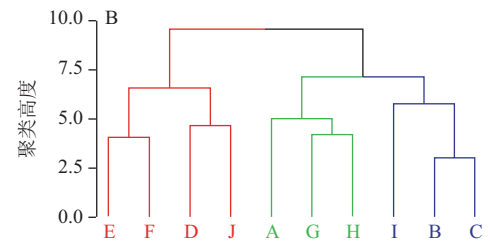
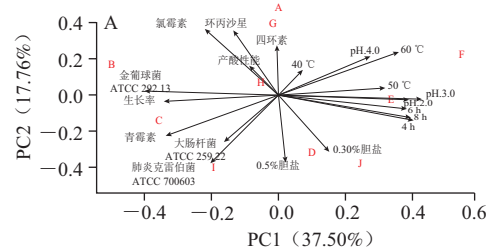
2.6 潜在益生菌筛选

为筛选综合益生性能优良的菌株,本研究对10株肠球菌的21项指标进行PCA与Z-score综合评分。由表6可知,前4个PC累计方差贡献率达81.31%,可有效反映原始数据信息:PC1表征胃肠道存活与定植能力,PC2体现胁迫耐受与加工适应性,PC3、PC4分别对应抑菌活性与产酸性能。其中菌株7876、7874、7866在定植与耐受性方面表现突出,菌株7870、7871综合性能较弱。

表6 PC载荷矩阵、特征值和方差贡献率
Table 6 PC loading matrices, eigenvalues, and variance contribution rates

指标	PC1	PC2	PC3	PC4
疏水性	0.31	0.06	0.13	0.28
4 h自凝集率	0.31	-0.23	-0.11	0.10
6 h自凝集率	0.29	-0.23	-0.22	0.15
8 h自凝集率	0.30	-0.25	-0.18	0.12
40 °C存活率	0.06	0.29	0.24	0.24
50 °C存活率	0.25	0.00	0.02	0.20
60 °C存活率	0.28	0.23	-0.17	-0.17
金黄色葡萄球菌ATCC 29213 抑菌圈直径	-0.29	0.18	0.16	0.15
大肠杆菌ATCC 25922 抑菌圈直径	-0.13	-0.04	0.52	-0.20
肺炎克雷伯菌ATCC 700603 抑菌圈直径	-0.16	-0.33	0.20	0.22
pH 2.0存活率	0.34	0.08	0.20	0.06
pH 3.0存活率	0.30	0.08	0.26	-0.22
pH 4.0存活率	0.22	0.30	0.11	-0.31
0.3%胆盐存活率	0.09	-0.40	0.12	-0.36
0.5%胆盐存活率	-0.01	-0.42	0.23	-0.20
生长曲线	-0.27	-0.19	-0.26	0.14
产酸曲线	-0.07	0.04	-0.30	-0.52
四环素	0.00	0.04	-0.11	0.00
氯霉素	-0.09	0.23	-0.07	0.08
环丙沙星	-0.06	0.15	-0.27	-0.09
青霉素	-0.14	-0.03	0.10	0.09
特征值	7.00	3.31	2.57	2.29
方差贡献率/%	37.50	17.76	13.77	12.28
累计方差贡献率/%	37.50	55.26	69.04	81.31

由图6和表7可知,菌株间益生潜力差异显著。菌株7876的综合得分最高(2.70),整体特性均衡;菌株7874(1.07)与7866(1.05)次之,表现出优良的耐酸与耐热性能。综上所述,菌株7876、7874、7866在耐酸耐胆盐、肠道定植、抑菌活性及安全性方面表现优异,可作为发酵剂及益生菌制剂开发的优质候选菌株。



A.菌株7866; B.菌株7870; C.菌株7871; D.菌株7872; E.菌株7874; F.菌株7876; G.菌株7877; H.菌株7878; I.菌株7879; J.菌株7958。

图6 10株肠球菌21项指标的PCA双标图(A)及层次聚类树状图(B)

Fig. 6 PCA biplot (A) and hierarchical clustering dendrogram (B) for 21 probiotic indicators of 10 *Enterococcus*

表7 因子得分及综合得分排序
Table 7 Factor scores and ranking of comprehensive scores

菌株编号	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	Z-score	排名
7876	4.70	1.34	0.67	1.39	2.70	1
7874	2.89	-0.24	-0.86	0.14	1.07	2
7866	0.00	3.26	2.11	-0.75	1.05	3
7958	2.07	-2.33	2.05	-0.86	0.60	4
7877	-0.77	2.45	-1.65	1.09	0.10	5
7872	0.78	-2.20	-0.75	-2.56	-0.67	6
7878	-0.49	0.38	-3.36	-1.05	-0.88	7
7879	-1.70	-2.69	-0.60	2.86	-1.13	8
7871	-3.09	-0.99	1.78	0.66	-1.18	9
7870	-4.33	1.02	0.60	-0.92	-1.67	10

3 结论

本研究从新疆南山传统酸马奶中分离鉴定出10株肠球菌,其中9株为乳肠球菌,1株为屎肠球菌。所有菌株均为γ-溶血,对多数临床常用抗生素敏感,碳源利用谱一致,生长与产酸性能稳定,40~50 °C耐热性良好。基于21项指标的综合评分显示,菌株7876综合益生性能最优,

其表面疏水性、自凝集能力、耐酸耐胆盐能力及抑菌活性均表现突出。本研究丰富了新疆酸马奶益生菌资源库,为益生菌制剂开发提供了优质候选菌种。后续可开展候选菌株的体内益生效果验证及工业化生产工艺研究。

参考文献:

- [1] 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. DOI:10.13684/j.cnki.splkj.2022.01.046.
- [2] 国立东, 毛吾丽旦·米吉提, 王丽群, 等. 新疆传统酸马奶源乳酸菌的分离、鉴定及其益生特性研究[J]. 中国酿造, 2025, 44(6): 100-108. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2025.06.015.
- [3] MARTUZZI F, FRANCESCHI P, FORMAGGIONI P. Fermented mare milk and its microorganisms for human consumption and health[J]. Foods, 2024, 13(3): 493. DOI:10.3390/foods13030493.
- [4] 努丽扎提·木拉提别克, 温彩霞, 徐丽, 等. 新疆酸马奶中酵母菌分离鉴定及安全性研究[J]. 食品工程, 2024(1): 15-17. DOI:10.3969/j.issn.1673-6044.2024.01.005.
- [5] 蔡宏宇, 刘文俊, 沈玲玲, 等. 基于三代测序技术分析新疆鲜马奶和酸马奶中乳酸菌菌群结构[J]. 中国食品学报, 2022, 22(2): 291-300. DOI:10.16429/j.1009-7848.2022.02.031.
- [6] 孙天松, 王俊国, 张列兵, 等. 中国新疆地区酸马奶中乳酸菌生物多样性研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 451-454. DOI:10.13344/j.microbiol.china.2007.03.013.
- [7] 吴敬, 芒来, 王英丽, 等. 马奶酒中产抑菌物质乳杆菌的筛选及鉴定[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2011, 32(1): 17-22.
- [8] 黎杰, 韩磊, 殷文政. 一株产细菌素乳酸菌的筛选及细菌素特性研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(22): 225-227; 230. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2015.22.086.
- [9] 吴敬, 芒来, 贺银凤. 马奶酒中抗单增李斯特氏菌细菌素产生菌的筛选及鉴定[J]. 中国酿造, 2011, 30(4): 119-122. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2011.04.036.
- [10] RAKHMANOVA A, WANG T, XING G, et al. Isolation and identification of microorganisms in Kazakhstan koumiss and their application in preparing cow-milk koumiss[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(1): 151-166. DOI:10.3168/jds.2020-18527.
- [11] 郭欢欢, 苟永桢, 李婕, 等. 酸马奶变温发酵工艺优化及其品质分析[J]. 中国酿造, 2024, 43(11): 224-230. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2024.11.035.
- [12] 孟岳成, 毕建喆, 孙哲航, 等. 传统酸马奶优势菌群互作及与风味物质的关联性[J]. 中国食品学报, 2024, 24(9): 194-204. DOI:10.16429/j.1009-7848.2024.09.018.
- [13] 赵志霞, 罗峻渲, 朱涵予, 等. 新疆传统谷物发酵饮料中乳酸菌的分离鉴定及其益生特性分析[J]. 食品工业科技, 2026, 47(11): 1-10. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2025060194.
- [14] 杨振, 闫晓阳, 张素辉, 等. 川渝地区羊源溶血性曼氏杆菌分离株的流行特征、耐药性、毒力基因与致病性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2026, 53(4): 2167-2180. DOI:10.16431/j.cnki.1671-7236.2026.04.048.
- [15] 褚鑫龙, 马轲, 高鹏程, 等. 羊肠道蒙氏肠球菌和屎肠球菌的分离鉴定及益生特性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2546-2562. DOI:10.13344/j.microbiol.china.231049.
- [16] 袁先铃, 周莺茹, 郑连强, 等. 酸菜中乳酸菌生长曲线、产酸性能力及抑菌性能探究[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(14): 199-203. DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2022.14.025.
- [17] HARANAHALLI NATARAJ B, BEHARE P V, YADAV H, et al. Emerging pre-clinical safety assessments for potential probiotic strains: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(23): 8155-8183. DOI:10.1080/10408398.2023.2197066.
- [18] LIANG Z W, ZHENG K, XIE G F, et al. Sugar utilization-associated food-grade selection markers in lactic acid bacteria and yeast[J]. Polish Journal of Microbiology, 2024, 73(1): 3-10. DOI:10.33073/pjm-2024-011.
- [19] YU X, SUN Y R, SHEN X, et al. Effect of different isolation sources of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on volatile metabolites in fermented milk[J]. Food Chemistry: X, 2024, 21: 101224. DOI:10.1016/j.fochx.2024.101224.
- [20] 郭欣雨. 中国传统发酵乳制品来源乳酸乳球菌的筛选及发酵特性分析[D]. 无锡: 江南大学, 2025. DOI:10.27169/d.cnki.gwqgu.2025.002311.
- [21] WANG Y, CHAN K L, ALI ABDEL-RAHMAN M, et al. Dynamic simulation of continuous mixed sugar fermentation with increasing cell retention time for lactic acid production using *Enterococcus mundtii* QU 25[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13(1): 112. DOI:10.1186/s13068-020-01752-6.
- [22] 何江波, 姚志芳, 吴国芳, 等. 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. DOI:10.3969/j.issn.1006-267x.2021.06.038.
- [23] MALDONADO-GALDEANO C, CAZORLA S I, FULLER R, et al. Probiotic-intestinal epithelium crosstalk: mechanisms of adhesion, signalling, and immunomodulation[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2025, 76(8): 784-797. DOI:10.1080/09637486.2025.2582569.
- [24] FU J J, LIU J, WEN X P, et al. Unique probiotic properties and bioactive metabolites of *Saccharomyces boulardii*[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2023, 15(4): 967-982. DOI:10.1007/s12602-022-09953-1.
- [25] WEI Y H, PALACIOS ARAYA D, PALMER K L. *Enterococcus faecium*: evolution, adaptation, pathogenesis and emerging therapeutics[J]. Nature Reviews Microbiology, 2024, 22(11): 705-721. DOI:10.1038/s41579-024-01058-6.
- [26] TOUPAL S, COŞANSU S. Effects of freeze-dried banana and watermelon peel powders on bile salt resistance, growth kinetics, and survival of probiotic bacteria[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2024, 16(5): 1762-1772. DOI:10.1007/s12602-023-10131-0.
- [27] FUGABAN J I I, HOLZAPFEL W H, TODOROV S D. Probiotic potential and safety assessment of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* strains with antibacterial activity against *Listeria* and vancomycin-resistant enterococci[J]. Current Research in Microbial Sciences, 2021, 2: 100070. DOI:10.1016/j.crmicr.2021.100070.
- [28] FUJII A, KAWADA-MATSUO M, LE M N, et al. Comprehensive analysis of bacteriocins produced by clinical enterococcal isolates and their antibacterial activity against enterococci including VRE[J]. Scientific Reports, 2025, 15: 4846. DOI:10.1038/s41598-025-89518-8.
- [29] 陈凌宇, 程媛, 刁文涛, 等. 1株产L-乳酸脲肠球菌菌株的分离鉴定、培养条件优化及益生性能研究[J]. 饲料研究, 2025, 48(10): 74-79. DOI:10.13557/j.cnki.issn1002-2813.2025.10.013.