

# 野生型乳酸菌的分离·筛选及鉴定

秦云, 徐国良 (保山学院资源环境学院, 云南保山 678000)

**摘要** [目的] 研究从传统乳制品中分离鉴定出乳酸菌, 并对其发酵性能进行简单筛选。[方法] 以 10 份传统自制酸乳食品为样品, 对发酵性能优良的乳酸菌进行了分离、鉴定和产酸性研究。[结果] 样品中共分离出 55 株乳酸菌, 经凝乳试验筛选出 27 株凝乳效果较好的乳酸菌, 鉴定为有乳杆菌属 13 株、乳球菌属 2 株和肠球菌属 8 株。将凝乳最快的 2 只杆菌 SC1、SC4 和 1 只球菌 EB1 以及按 1:1 复配的 SC1 + EB1 和 SC4 + EB1 5 个样品发酵复原乳, 分别测定了这 5 种发酵剂在 37 和 42 °C 下发酵 2~9 h 产酸的速率。结果表明, 分离得到的菌种 37 °C 下产酸速率都大于 42 °C 下的; 且相比单个菌种, 复配后的菌种发酵的酸乳产酸速率在 37 和 42 °C 下都属于中速, 但最终酸度最适合饮用, 口感最佳。[结论] 研究可为以后挑选出优良的野生菌种提供参考。

**关键词** 野生型乳酸菌; 分离; 鉴定; 产酸性

**中图分类号** S509.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)11-05023-04

## Isolation, Screening and Identification of Wild Lactic Acid Bacteria

QIN Yun et al (School of Resources and Environment, Baoshan University, Baoshan, Yunnan 678000)

**Abstract** [Objective] To study isolating lactic acid bacteria from traditional dairy products, and simply screening its fermentation performance. [Method] With 10 traditional indigenous dairy products as samples, lactic acid bacteria with superior fermentation properties were isolated, identified, the acid production was also studied. [Result] There are 55 lactic acid bacteria in the samples, among which, total of 27 strains of lactic acid bacteria were isolated and identified into three genera *Lactobacillus* (13 isolates), *Lactococcus* (2 isolates) and *Enterococcus* (8 isolates). After identification, 3 isolates were selected and mixed. Potential of these isolates for lactic acid production were also observed at 37 °C and 42 °C for 9hrs with one hour intervals. There were generally trend that acid production at 37 °C were faster than 42 °C. Mixed isolates were slow at acid production, but they could ferment yoghurt with better taste. [Conclusion] The study could provide reference for selecting superior wild bacteria.

**Key words** Wild lactic acid bacteria; Isolation; Identification; Acid production

传统发酵乳制品有着几千年的历史, 一直以来都被认为是具有保健治疗功效的健康食品, 而这其中起重要作用的就是作为发酵剂的野生型乳酸菌。这些乳酸菌经过漫长的驯化, 具有良好的发酵性能和营养价值, 并且保存了乳酸菌的生物特性。因此, 对其进行研究将对认识我国传统乳制品中乳酸菌的种类和性能, 以及筛选优良的菌种起到促进作用。笔者主要研究从传统乳制品中分离鉴定出乳酸菌, 并对其发酵性能做简单筛选, 为以后挑选出优良的野生菌种打下基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 试验的 10 个样品于 2011 年 3 月分别采自内蒙古和新疆市场以及牧民家里, 采集后装入密封袋中快递至无锡, 放入 4 °C 冰箱保存。试验样品分别是奶酥、酸奶豆腐 1、酸奶豆腐 2、奶球 1、奶球 2、奶疙瘩、蒙古奶酪(原味)、奶砖、奶棍、奶酪。

## 1.2 方 法

**1.2.1 乳酸菌的分离纯化** 将 10 个样品分别刮去表面一层, 取内部的一小块 (0.5 × 0.5 × 0.5 cm<sup>3</sup> 见方左右) 研磨成细小颗粒, 放入液体培养基中进行增殖。分离野生株乳酸菌所用的培养基是具有选择性的 MRS, 于 37 °C 恒温培养箱培养 24~36 h, 沾取一接种环平板划线于含有质量分数为 0.75% CaCO<sub>3</sub> MRS (W/V) 固体培养基平板, 37 °C 恒温培养箱培养 48 h。培养后挑取菌落周围形成透明圈的菌落, 进行涂片、革兰氏染色、细胞形态观察及过氧化氢酶试验。按照文献<sup>[1-2]</sup>, 凡是革兰氏染色阳性, 过氧化氢酶试验阴性的菌株初

步确定为乳酸菌。记录总结以上试验结果, 将革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性的菌用 MRS 液体培养基进行富集、纯化 3~4 次后, 直至确定为纯菌, 并记录菌落的形态特征。之后利用生理盐水使菌液控制在同个数量级, 按 8% (V/V) 的接种量接入脱脂乳培养基传代 3 次, 观察各株菌凝乳时间。挑选凝乳表现较好的一些菌于 PYG 试管斜面培养基中置 4 °C 冰箱中保存备用, 用于进行一系列生理生化反应, 进一步鉴定。

**1.2.2 乳酸杆菌属的鉴定** 将杆菌分离株经增菌培养, 做明胶液化、pH 4.5 生长、pH 9.6 生长、H<sub>2</sub>S 产生、吡啶产生、精氨酸水解、联苯胺生成、葡萄糖产气试验, 从而确定是否归于乳杆菌属。

**1.2.3 乳酸球菌属的鉴定** 将分离到的革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性的球菌做明胶液化试验、pH 4.5 生长、pH 9.6 生长、H<sub>2</sub>S 产生、6.5% NaCl (W/V) 生长、吡啶产生、葡萄糖产气、运动性等试验并结合厌氧特性, 按照文献<sup>[2-3]</sup> 进一步确定球菌的属。

**1.2.4 分离株产酸性能研究** 取鉴定好的纯分离株扩大发酵量, 分别筛选出能在短时间内凝乳的杆菌和球菌。将挑选出的杆菌、球菌和按 1:1 复配的杆菌和球菌, 以 8% (V/V) 接种到脱脂乳中, 在 42 °C 培养 2 h 后, 滴定培养物的总酸, 这就称为起始滴定酸度。以后每隔 1 h 测定一次酸度, 比较单个菌发酵过程中酸度的变化和复配菌发酵中酸度的变化。

**1.2.5 分离株发酵乳感官评价** 将产酸性能试验中挑出的菌株用于发酵酸乳, 组织 6~8 人对成品进行感官评定, 比较单个菌发酵酸奶和复配菌发酵酸奶的口感差异。评定指标为样品的奶香味和酸味, 对各样品排序并打分, 味道最淡赋值 1 分, 味道最浓赋值 5 分, 算出各样品平均分进行比较分析。

## 2 结果与分析

**2.1 疑似乳酸菌的分离纯化** 该试验共 10 个样品,分别对应编号为 A. 奶酥、B. 酸奶豆腐 2、C. 奶球 2、D. 奶疙瘩、E. 蒙古奶酪(原味)、F. 奶砖、G. 酸奶豆腐 1、H. 奶棍、I. 奶球 1、J. 奶酪。经过革兰氏染色和接触酶试验,从这 10 个样品中共分离出了 55 株疑似乳酸菌。分离菌株菌落形态多为表面光滑有光泽,边缘整齐,脐状、隆起或低凸起,黏稠的乳白色或灰白色圆形菌落,凸起的直径为 1~2 mm 或稍大。镜检结果显示,分离杆菌细胞形态为细长杆状、短粗杆状,多数呈链条

状排列。球菌呈圆形或卵圆形,一般以单个、成对或成堆分布。镜检结果见图 1。

**2.1.1 革兰氏染色、接触酶试验和镜检结果。**分离到的革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性的 55 株菌细胞形态分类如下:球菌有 EA1、EA2、EA3、EB1、EB4、ED1、ED3、ED4、EE2、EE3、EE4、EF1、EF2、EF3、EF4、EI1、EI2、EI3、EI4、EJ2、EJ3、EJ4、SA1、SA2、SF1、SF2、SF3、SF4;杆菌有 EG1、EG2、EH1、EH2、EH4、SB2、SB4、SC1、SC4、SD1、SD2、SD3、SD4、SE1、SE4、SG4、SH1、SH2、SH3、SH4、SI2、SI3、SI4、SJ1、SJ2、SJ3、SG3。

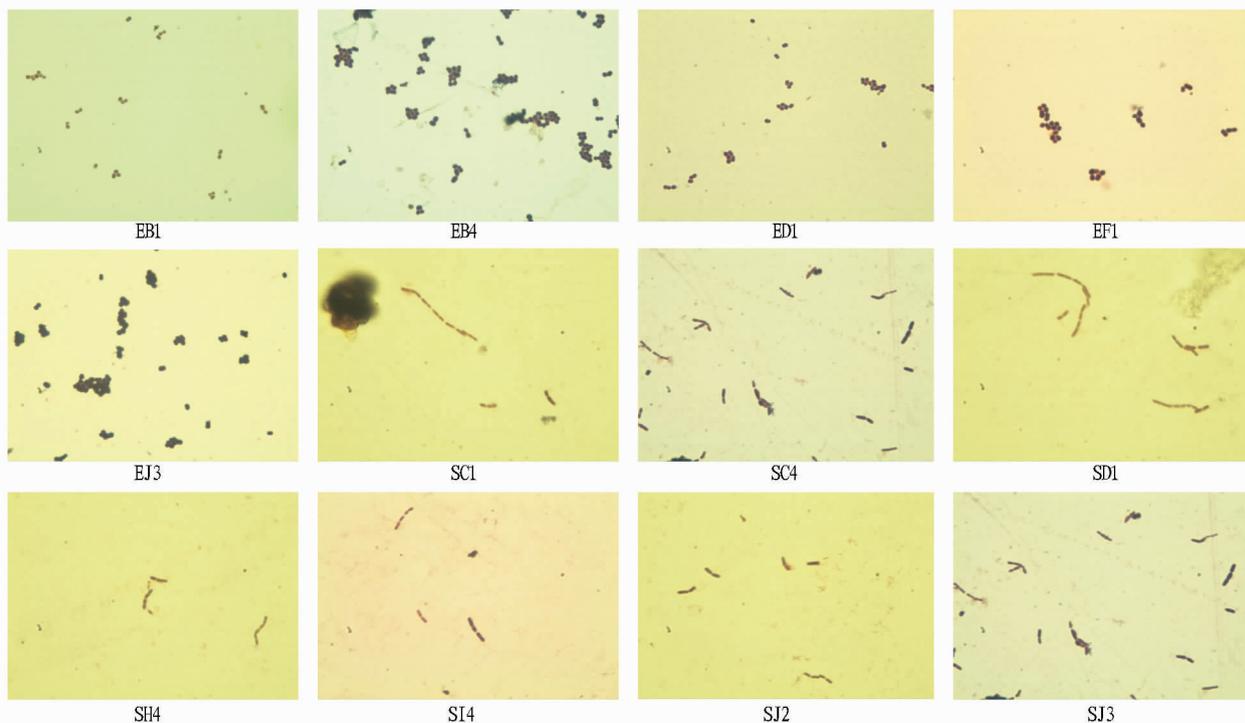


图 1 分离纯菌株的细胞形态(放大倍数 1 000 ×)

图 1 为 12 个具有代表性的纯分离株的细胞形态。如图 1 所示,球菌一般成对,偶尔有四联出现,聚集成堆是因为染色时没有在玻片上将菌涂开;杆菌一般成对或者成链状排布。

**2.1.2 牧区乳制品中疑似乳酸菌的凝乳效果。**用以上分离出的 55 株疑似乳酸菌在脱脂乳培养基中传代 3 次,记录每代的凝乳时间,从中得到 27 只情况较好的。具体凝乳时间见表 1。

表 1 野生型疑似乳酸菌凝乳驯化时间 h

编号	形态	1代	2代	3代	编号	形态	1代	2代	3代
SB4	杆	6.0	5.5	5.5	EB1	球	5.0	4.5	4.5
SC1	杆	4.5	4.0	3.5	EB4	球	5.0	4.5	4.5
SC4	杆	4.0	3.5	3.5	ED1	球	6.0	5.0	5.0
SD1	杆	6.0	5.0	5.0	ED3	球	6.5	6.5	6.5
SD2	杆	5.5	4.5	3.5	ED4	球	9.0	7.0	6.0
SD3	杆	4.5	4.5	4.0	EF1	球	5.0	5.0	4.5
SD4	杆	6.0	6.0	6.0	EF2	球	6.5	6.5	6.5
SE1	杆	5.0	4.5	4.5	EF3	球	10.0	8.0	7.0
SE4	杆	6.0	6.0	6.0	EH1	杆	9.0	8.0	7.0
SH2	杆	6.0	5.0	5.0	EJ2	球	7.5	6.0	5.0
SH4	杆	6.0	5.0	5.0	EJ3	球	9.0	7.0	5.0
SI4	杆	5.0	5.0	4.5	EJ4	球	7.5	6.0	5.0
SJ1	杆	6.0	5.5	5.5					
SJ2	杆	5.5	5.0	5.0					
SJ3	杆	6.0	5.0	4.5					

由表 1 可知,有些菌经过 3 代培养,凝乳时间有明显缩短,如 SD2、SJ3、ED4、EF3、EJ3,时间缩短达 2~3 h;有些菌凝乳时间缩短不明显,如 SC1、SD1、SH2、SH4、ED1 等,缩短时间不超过 1 h;还有些菌凝乳时间基本无变化,如 SB4、SC4、SE4、SJ1、EF2。各分离株对培养基的适应能力差异较大。

从表 1 中还可以发现,球菌的凝乳时间普遍比杆菌要长。根据文献<sup>[4-5]</sup>可知,球菌产酸能力比杆菌强,而产粘系数与产酸系数是成反比的,因此杆菌的产粘能力比球菌更强,凝乳时间自然较短。

**2.2 疑似乳酸菌分离株的种属鉴定** 初步挑选出的 27 只凝乳性能好的菌中包括杆菌 16 只:SB4、SC1、SC4、SD1、SD2、SD3、SD4、SE1、SE4、SH2、SH4、SI4、SJ1、SJ2、SJ3、EH1;球菌 11 只:EB1、EB4、ED1、ED3、ED4、EF1、EF2、EF3、EJ2、EJ3、EJ4。通过生理生化试验对杆菌和球菌进行鉴定到属。

**2.2.1 疑似乳酸杆菌的鉴定结果。**根据文献<sup>[2-3]</sup>,对分离出的杆菌做接触酶、石蕊牛奶、产 H<sub>2</sub>S、pH 4.5 生长、葡萄糖产气等试验以鉴定到属。根据试验结果可知,所有分离株都无运动性,不产硫化氢,吡啶试验阴性,葡萄糖产气试验阴性。个别菌在其他试验中表现出不同反应,如 SE1、SH4、EH1 不

能使石蕊牛奶凝固,SE1、SH2、EH1 明胶液化试验呈阴性,SE1、EH1 在 pH 4.5 不能生长,这 3 株菌试验结果不符合乳酸菌的标准。根据以上试验结果,对比文献<sup>[3-6]</sup>,得出 SB4、SC1、SC4、SD1、SD2、SD3、SD4、SE4、SH4、SI4、SJ1、SJ2、SJ3 为乳杆菌属。其他 3 株菌未鉴定其属。

**2.2.2 分离杆菌糖发酵试验结果。**选取了 10 种糖对以上挑选出的 13 株分离株进行糖发酵试验。根据文献<sup>[3]</sup>,对比糖发酵试验结果,SB4、SC1、SD1、SE4 这 4 株菌表现一致,能利用葡萄糖、麦芽糖、D-半乳糖、糊精、 $\alpha$ -乳糖、蔗糖和 D-果糖,但不能分解可溶性淀粉、棉子糖和 L-山梨糖;SH2、SI4、SJ1、SJ2、SJ3 这 5 株菌表现一致,且与上述 4 株极为相似,唯一不同就是可以利用可溶性淀粉;SC4 不能分解蔗糖,其他表现与 SC1 一致;SD2 不能利用糊精和棉子糖,SD4 不能利用蔗糖和棉子糖,而 SD3 除了棉子糖其他糖类都可以分解。

**2.2.3 疑似乳酸球菌的鉴定结果。**根据文献<sup>[2-3]</sup>,分离出的球菌接触酶、运动性、耐盐试验、pH 9.6、温度试验等已鉴定到属。根据试验结果可知,所有分离株都无运动性,不产硫化氢,吡啉试验阴性,葡萄糖产气试验阴性,能在 15 °C 生长,美兰还原试验为阳性。但个别菌在其他试验中表现出不同反应,如 ED1、ED4 不能使石蕊牛奶凝固,ED4 明胶液化试验呈阴性,耐盐试验中,除了 EF1 和 EF3 只能耐受含 3% NaCl (W/V) 的培养基外,其他分离株都能耐受含 6.5% NaCl (W/V),所有菌株在含 10% NaCl (W/V) 的培养基中不能生长。EF1、EF2、EF3 在 pH 9.6 不能生长,而其他菌株长势良好。在 45 °C 生长试验中,除了 EF1、EF3 这 2 株菌,其他分离株都能生长。根据以上试验结果,对比文献<sup>[3-6]</sup>,得出 EF1 和 EF3 为乳球菌属,EB1、EB4、ED1、ED3、ED4、EJ2、EJ3、EJ4 为肠球菌属,EF2 试验结果不符合任何一种乳酸球菌,未对其进行鉴定。

**2.2.4 分离球菌糖发酵试验结果。**选取了 10 种糖对以上挑选出的 10 株分离株进行糖发酵试验。根据糖发酵试验结果,EF1 和 EF3 2 只乳球菌不能利用棉子糖,能生长于 0.1% 甲烯蓝牛奶 (W/V),对比文献<sup>[3]</sup>,排除是棉子糖乳球菌和乳球菌乳脂亚种的可能;EJ2、EJ3 和 EJ4 这 3 株菌糖发酵试验

结果一致,除了不能利用棉子糖、山梨糖,还不能发酵可溶性淀粉,剩下 5 株 EB1、EB4、ED1、ED3 和 ED4 不能分解棉子糖和山梨糖,但可以利用淀粉和其他糖类。根据文献<sup>[3-7]</sup>,这 8 株肠球菌可能属于粪肠球菌、屎肠球菌或肠道肠球菌中的任一种。

**2.3 野生型乳酸菌发酵产酸性能分析** 根据糖发酵试验结果,结合分离株的鉴定试验和凝乳时间,挑选出 10 只凝乳较好的乳酸菌在脱脂乳中扩大发酵,扩大发酵量以后的凝乳时间如图 2。扩大发酵规模以后,凝乳时间明显延长。这与容器大小有一定关联,在试管中由于空间小,更容易形成酸凝。10 只菌中有菌都是 37 °C 下的凝乳时间要短于 42 °C,可能是应为这些菌所来自的乳制品都来自北方,适应北方气候,较低的温度下更有利于菌的生长。挑取在 2 个温度下都能在较短时间内 ( $\leq 5$  h) 凝乳的菌株 SC1 (杆)、SC4 (杆)、EB1 (球) 进行下一步产酸能力分析。

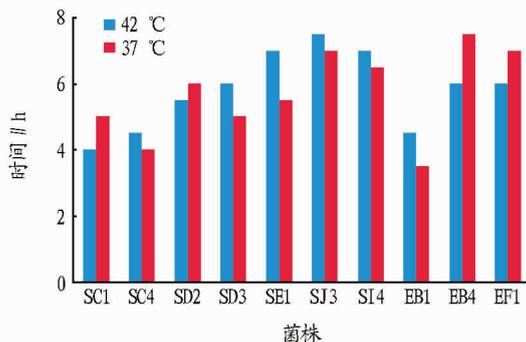
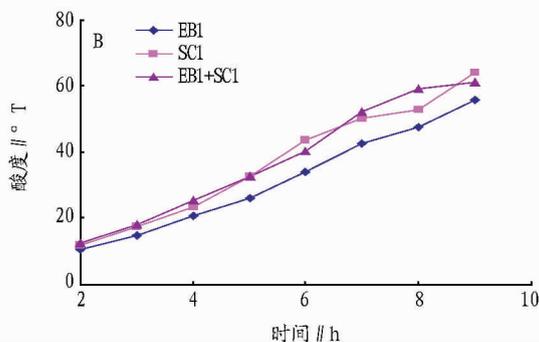
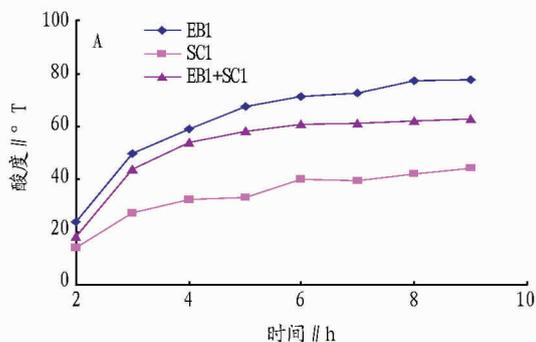


图 2 扩大培养后的凝乳时间

**2.3.1 产酸能力分析。**将挑选出的杆菌 SC1、SC4、球菌 EB1 和按 1:1 复配 SC1 + EB1、SC4 + EB1,以 8% (V/V) 接种到脱脂乳中,在 37 和 42 °C 培养 2 h 后,滴定培养物的总酸,这就称为起始滴定酸度。以后每隔 1 h 测定 1 次酸度,比较单个菌发酵过程中酸度的变化和复配菌发酵中酸度的变化。

酸度测定采用酸碱滴定法。取 10 ml 培养物、20 ml 水、0.5% (W/V) 酚酞指示剂 0.5 ml,用 0.1 mol/L NaOH 标准液滴定到微红色 30 s 不褪色,求出酸度。同一样品连测 3 次,取平均值处理,测定结果见图 3~4。

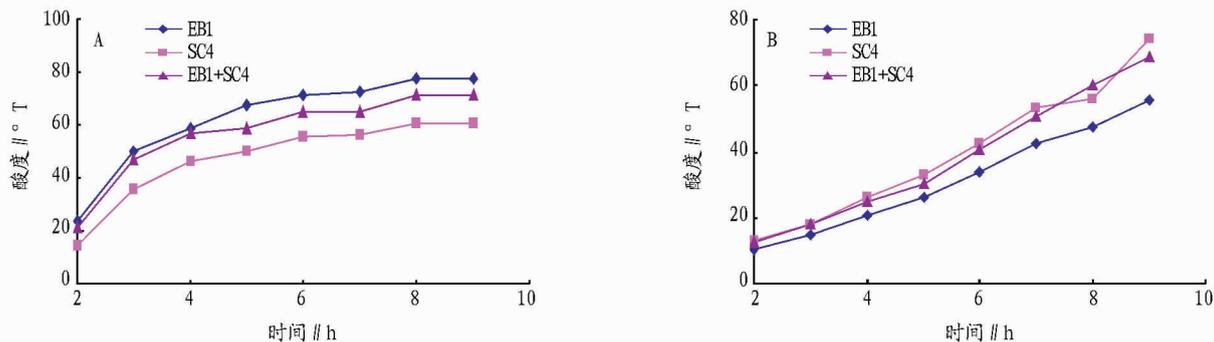


注:A 为 37 °C,B 为 42 °C。

图 3 EB1、SC1 和 EB1 + SC1 发酵产酸趋势

对比 37 和 42 °C 下的菌株发酵的产酸曲线,可以得出球菌 EB1 在 42 °C 下产酸能力比 37 °C 下强很多,而杆菌 SC1、

SC4 则刚好相反;复配后的 EB1 + SC1 和 EB1 + SC4 发酵时在 37 或 42 °C 下产酸能力都较好。整体来看,所有发酵剂 37



注:A为37℃,B为42℃。

图4 EB1、SC4和EB1+SC4发酵产酸趋势

℃下产酸在前4h速度很快,4h后产酸减慢,而42℃下产酸速度几乎保持不变;不同温度下复配菌发酵开始时酸度相差较多(37℃下起始酸度较高),但最后酸度几乎持平。

对比SC1+EB1和SC4+EB1的曲线发现,SC4+EB1不论在哪个温度下发酵,产酸的速度都比SC1+EB1快,最终酸度也相对较高。

**2.3.2 感官评定。**用EB1、SC1、SC4、EB1+SC1(1:1)、EB1+SC4(1:1)5种发酵剂制备酸乳,在酸乳制成后冷藏的第5天进行感官评定。请感官评定员对各个样品奶香味、酸味进行打分和排序,由高到低对其进行赋值,味道强度最强的赋值5分,最弱的赋值1分,以此类推,得到如表2、3的结果。

表2 奶香味感官评定结果

评定员	SC1	SC4	EB1	SC1+EB1	SC4+EB1
1	4	2	3	5	1
2	4	3	5	1	3
3	4	5	1	2	3
4	5	1	3	2	4
5	5	4	1	2	3
6	5	4	3	1	2
7	4	5	1	3	2
平均分	4.4	3.4	2.4	2.3	2.6

表3 酸味感官评定结果

评定员	SC1	SC4	EB1	SC1+EB1	SC4+EB1
1	1	4	5	2	3
2	1	4	5	2	3
3	1	4	5	3	2
4	1	4	5	2	3
5	1	4	5	3	2
6	1	5	4	3	2
7	1	4	5	2	3
平均分	1.0	4.1	4.9	2.4	2.6

由表2可知,2株杆菌SC1、SC4的奶香味得分最高,球菌EB1和复配菌香味得分较低。初步分析是因为球菌和杆菌的复配比例不合适,导致复配菌产香能力差。由表3可知,球菌EB1发酵的酸乳酸味最强,复配菌酸味居中,杆菌SC1发酵成品酸味很低,而SC4很高。可以得出结论,复配菌的酸味适中,口感最佳。

### 3 结论

从10个传统酸乳制品的样品中共分离出了55株疑似乳酸菌,筛选出了27株发酵时凝乳较快的分离株。对这27株做种属鉴定,得到乳杆菌属13株、乳球菌属2株、肠球菌属8株。

SC1(杆)、SC4(杆)和EB1(球)这3株乳酸菌进行复配后发酵酸乳,结果表明,无论单菌还是复配菌在37℃下产酸速率都大于42℃,但最终酸度达到一致。球菌的最终酸度最高,杆菌最低,复配菌位于两者之间。

复配菌发酵的酸乳酸度适中,适合饮用,口感最佳,但复配菌发酵酸乳的奶香味很差,可能是由于杆菌和球菌的复配比例不合适所导致。

### 参考文献

- [1] YUJI N, AKLYOSHI H. Function of Fermented Milk[M]. London and New: Elsevier Applied Science, 1995: 110-210.
- [2] 雷霞. 伊敏河和海拉尔河两岸牧区乳及乳制品中益生菌的分离鉴定及其体外筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005: 7-30.
- [3] 凌代文, 东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 82-25.
- [4] 王琦, 周雨霞, 李少英, 等. 内蒙古地区乳制品中乳酸菌的分离、鉴定[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1997, 18(2): 1-6.
- [5] R E 布坎南. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [6] 孟和毕力格, 敖墩格日勒, 李少英, 等. 内蒙古双峰驼乳及乳制品中乳杆菌的分离及其生物学特性的研究[J]. 内蒙古农业大学学报, 2001, 22(2): 80-85.
- [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: 354-399.