

云南省乳品中乳杆菌的鉴定

刘荫武 张以芳 赵本杨

(云南农业大学牧医系, 昆明 650201)

摘要 从云南省各种乳制品的88份样品中, 共分离鉴定出29种、217株乳杆菌。检查了我省乳制品及其自然发酵剂中乳杆菌的种类, 其中许多菌株产酸、产香等性能良好, 有一定开发应用价值。

关键词 乳制品; 乳杆菌; 鉴定

我国历来有用乳酸发酵加工乳品和酸菜等食品的传统习惯, 现在更广泛应用于发酵工业、食品加工、乳品制造、医药卫生和饲料生产等诸多方面。近年来, 也用乳杆菌生产乳酸、丙酮酸盐、L-赖氨酸、天冬氨酸激酶和维生素B₁₂等生物制品^[1-7]。乳杆菌还能维持动物体内正常菌群, 调理生物体的生理机能和增强机体的免疫力^[8,9]。近年来还发现其它许多保健与治疗因子, 如维生素的合成、乳酸菌素的产生和干扰素的诱导等与乳杆菌有关^[10,11]。

我省幅原辽阔, 民族众多, 乳品加工业历史悠久, 方法各异, 品种繁多, 尤其是邓川的乳扇, 中甸的酥油、奶渣, 路南的乳饼等, 工艺独特,

别具风味, 早已驰名中外。可是微生物方面的系统研究尚属空白。为开发利用这一宝贵的生物资源, 我们首先对我省乳品中乳杆菌进行了分离与鉴定。^①

材料与方 法

1. 样品: 从中甸、邓川和路南等地, 按采样单的要求, 无菌采取酥油、奶渣、乳扇、乳饼和酸乳清(发酵剂)置无菌容器内, 尽快送到实验

① 中国科学院微生物研究所凌代文副研究员曾予指导; 我校黄文忠、张伟、施春雄、刘旭川、熊继李、和丽芬、山会芬等同志参加部分工作, 在此一并致谢。

本研究为云南省自然科学基金资助课题。

室,若当天不能检验,则必须冷藏。

2. 培养基:乳杆菌要求复杂的营养物质和多种生长因子,因此必须选用适宜的增菌、分离和鉴定培养基^[12]。

(1) 增菌培养基:按样品种类选用 Mrs、BL 或乳清葡萄糖液体培养基^[13]。培养基中加入 100mg/L 的放线菌酮。

(2) 分离培养基:用 Mrs、BCP 乳清及 M₁₇ 琼脂培养基^[14],并增加 2% 碳酸钙。

(3) 鉴定培养基:包括石蕊牛乳、淀粉水解、糖发酵试验和半固体培养基^[15]。在半固体培养基中增加酵母膏 0.5g/100ml,琼脂用 0.25g/100ml。

3. 培养方法:

(1) 增菌培养:用于陈旧、污染或镜检发现乳杆菌很少的样品。样品与增菌培养基的比例为 1:10,置 37℃ 温箱,培养 18—24h,然后进行分离培养。

(2) 分离培养:将新鲜样品的 1:10 悬液或增菌液稀释后,分别用 Mrs、BCP 乳清琼脂或 M₁₇ 琼脂做倾注培养 48h (少数为 3—4 天)。

4. 培养条件:接种后的培养基置多功能培养箱内,同时放入厌氧及 CO₂ 指示管,抽真空后,按容积输入 90% H₂ 及 10% CO₂。培养温度为 25℃ 和 30℃。生长温度试验采用 15 及 45℃。

5. 鉴定程序:按有关文献的方法进行鉴定^[15-18]。分离的可疑菌落移植到 Mrs 琼脂平皿上,进行纯度检查,同时观察、记录菌落形态,作 H₂O₂ 酶,联苯胺等试验。菌体形态与大小用革兰氏染色后,按常规方法检查。运动检查用悬滴法和半固体培养基两种方法。若以上检查结果符合乳杆菌特征时,再作其它培养特性和生理、生化试验。不符合乳杆菌特性时,给予淘汰。生化反应一般在 2、4、6 和 8 天观察记录四次。最后综合以上特性鉴定到种和亚种。

6. 乳酸定性试验:纸层析法^[15]。

结 果

从上述 88 份样品中分离出 217 株乳杆菌 (*Lactobacillus*), 其中除 7 株未能定种以外, 210

株分别鉴定为 29 种乳杆菌 (包括亚种, 以下同)。样品种类及乳杆菌分布情况如表 1。

由表 1 可见, 本研究由 25 份酥油奶渣中分离到 17 种, 共 44 株乳杆菌; 由 45 份乳扇中分离出 24 种, 共 126 株乳杆菌; 由 9 份乳饼中分离出 16 种共 32 株乳杆菌; 而由 9 份其它乳品中只分离到 6 种共 15 株乳杆菌。其中以乳扇中乳杆菌的种类最多, 酥油与奶渣中较少, 而其它乳品中更少。

在乳制品的乳杆菌中, 以植物乳杆菌的分离率为最高, 达 20.27% (44/217), 其它乳杆菌的分离率依次为德氏乳杆菌, 为 15.66% (34/217), 发酵乳杆菌为 10.59% (23/217), 干酪乳杆菌为 9.67% (21/217), 棒状乳杆菌为 7.83% (17/217)。其余的乳杆菌则只有 1—10 株, 分离率较低。

因为分离的乳杆菌种类多, 数量大, 而且均为同属的细菌, 性状相似, 在此只作综合描述。

1. 形态特征: 上述乳杆菌均为长短不同的杆菌。分离菌的大小均在标准范围之内, 宽度在 0.6—1.2μm 之间, 长度变化较大, 一般在对数生长期, 许多菌株可见到菌链。除弯曲乳杆菌和棒状乳杆菌的扭曲亚种以外, 菌体均比较平直。菌端钝圆, 只是短乳杆菌两端比较平切。在所分离的乳杆菌中, 均未见到芽胞与荚膜。除敏捷乳杆菌和梭乳杆菌以外, 均不运动。染色均为革兰氏阳性。

2. 培养特性: 菌落一般为圆形, 边缘整齐, 表面平滑, 中度隆起, 灰白色不透明。但发酵乳杆菌和短乳杆菌有的菌株, 菌落呈淡黄色, 德氏乳杆菌乳酸亚种的菌落呈石灰样白色。菌落大小直径一般在 0.5—3mm, 但是嗜酸乳杆菌、希氏乳杆菌和弯曲乳杆菌的菌落比较小, 直径 0.3—1mm, 边缘不太整齐, 扁平, 灰白色半透明。

在倾注培养时, 多为深层菌落, 菌落周围有透明环; 有的菌落可呈枣核形或大小不同的辣椒籽状。

在液体培养基中, 生长良好, 无菌膜。在含糖的液体培养基中生长更好, pH 值可降到 4—5 左右。

48h后,产酸凝固,pH值可降到3.5—5之间,有不同程度的芳香气味。

以上分离的所有菌株, H₂O₂酶和联苯胺试

验均为阴性, F-O 试验为 F 型。吲哚试验 (除 LP5-6)、H₂S 试验 (除 LP3-3以外)、淀粉水解

表1 各种乳制品乳样分离乳杆菌 (*Lactobacillus*) 统计

样 品 种 类 菌 种 名 称	菌 种 名 称				菌株数
	酥油奶渣	乳 扇	乳 饼	其 它	
德氏乳杆菌德氏亚种 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	2	4	2	3	11
德氏乳杆菌乳酸亚种 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	4	13			17
德氏乳杆菌保加利亚亚种 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		3		3	6
棒状乳杆菌棒状亚种 <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	3	6	1		10
棒状乳杆菌扭曲亚种 <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	3	3	1		7
干酪乳杆菌干酪亚种 <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	1	1			2
干酪乳杆菌耐受亚种 <i>L. casei</i> subsp. <i>tolerans</i>		8			8
干酪乳杆菌鼠糖亚种 <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>		2			2
干酪乳杆菌假植物亚种 <i>L. casei</i> subsp. <i>pseudo plantarum</i>	1	8			9
嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	3	3		4	10
瑞士乳杆菌 <i>L. helveticus</i>		3		1	4
唾液乳杆菌 <i>L. salivarius</i>	2	2	4		8
敏捷乳杆菌 <i>L. agilis</i>	2	4	1		7
弯曲乳杆菌 <i>L. curvatus</i>	1	2			3
麦芽香乳杆菌 <i>L. maltaromicus</i>			7		7
鼠乳杆菌 <i>L. murinus</i>	1	1	1		3
植物乳杆菌 <i>L. plantarum</i>	7	35	1		43
短乳杆菌 <i>L. brevis</i>	4	3	1	1	9
布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i>	1	1			2
混淆乳杆菌 <i>L. confusus</i>			1		1
发酵乳杆菌 <i>L. fermentum</i>	5	15	2	1	23
食果糖乳杆菌 <i>L. fructivorans</i>	2	1			3
希氏乳杆菌 <i>L. hilgardii</i>		1	3		4
牛粪乳杆菌 <i>L. vaccinostercus</i>		1	1		2
绿色乳杆菌 <i>L. viridescens</i>		2	2		4
糠乳杆菌 <i>L. vitulinus</i>		2			2
动物乳杆菌 <i>L. animalis</i>	1				1
戈氏乳杆菌 <i>L. gasserii</i>			1		1
詹氏乳杆菌 <i>L. jensenii</i>			1		1
未鉴定菌株	1	2	2	2	7
样 品 数	25	45	9	9	(88)
合计: 菌种数/株数					

试验(除 Y5-1 以外)也都呈阴性。

3. 生长温度试验: 在 45℃ 培养时, 专性同型发酵的乳杆菌均可生长; 而兼性与专性异型发酵的乳杆菌(敏捷乳杆菌例外)则均未生长。在 15℃ 培养时, 专性同型发酵的乳杆菌均未生长, 而兼性异型发酵的乳杆菌(鼠乳杆菌例外)与专性异型发酵的乳杆菌(发酵乳杆菌和绿色乳杆菌例外)则均可生长。

4. 糖发酵试验: 分离乳杆菌的所有菌株的糖发酵试验结果, 除个别菌株的 1-2 种糖以外, 均与文献符合^[17]。

5. 乳酸定性结果: 以上所鉴定乳杆菌的葡萄糖发酵液纸层析结果, 黄斑位置与 2% 乳酸对照点接近, 而培养液空白对照则无黄斑出现。

讨 论

乳杆菌属细菌的生境十分广泛, 种类很多, 现在正式记载的有 44 种。Reddy 等 (1986) 由东欧的 12 份乳品样品中分离出 4 种 (7 株) 乳杆菌^[18]。本研究只以乳品中就分离到 29 种乳杆菌, 这说明我省乳杆菌资源丰富, 同时也与采用大量样品, 每个样品又用两种培养基, 在不同温度下同时分离培养, 部分样品还采用增菌培养等措施有关。

Kring^[16] (1986) 在细菌鉴定一文认为: 细菌种的鉴定与分类鉴定不同, 前者可以不考虑系统进化关系, 方法应力求简便可靠。本研究主要采用表型鉴定的方法。可是在鉴定过程中, 仍有 7 个菌株尚未定种, 因此正在采用其它方法进行鉴定。

在所分离的乳杆菌中, 敏捷乳杆菌, 鼠乳杆菌, 混淆乳杆菌, 食果糖乳杆菌, 动物乳杆菌, 希氏乳杆菌, 牛粪乳杆菌和梭乳杆菌等 8 种乳杆菌, 尚未见到在乳制品中分离鉴定的报道。按文献记载, 乳品并不是它们的自然生境, 这可能与我省乳品加工方式和采用多种自然发酵剂有关。

我省乳品生产, 一直沿用传统方法, 并且采用自然发酵剂。自然发酵剂就是上次生产留下

的酸乳清。若第一次生产, 则用其它植物或蔬菜自然发酵产生的酸浆水。这种发酵剂来源不同, 保存时间长短不一, 微生物组成复杂, 有污染有害微生物的危险等, 有许多缺点。这种发酵剂也是产品优劣与质量不稳定的主要原因。

本研究已基本查清我省乳品及自然发酵剂的乳杆菌组成。同时发现许多乳杆菌菌株的产酸、产香等优良生产性能, 这就为筛选优良乳杆菌, 开发乳杆菌资源, 生产人工发酵剂和改善与提高乳品生产工艺奠定了科学的基础。

参 考 文 献

1. 马启: 应用微生物, 2: 1-14, 1978.
2. Benito de Cardenas I L: *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 7 (4): 383-387, 1990.
3. 廖福荣译: 应用微生物, 5: 51-54, 1986.
4. 陈 瑾译: 应用微生物, 4: 32-34, 1985.
5. Atton D: *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (7): 1717-1723, 1989.
6. 马耀凤译: 应用微生物, 1: 5-8, 1979.
7. Rollon G C: *Microbiologie - Aliments - Nutrition*, 6 (3): 263-268, 1988.
8. 关世斌等: 中国乳品工业, 18 (5): 205-208, 1990.
9. Klanhamer T R: *Biochemic.*, 70 (3): 337-349, 1988.
10. 马桂华: 食品导报, 1: 10-12, 1989.
11. 铃木富士夫: 日本细菌学杂志, 43(4): 175-179, 1988.
12. Carl A Batt: *Food Technology*, 10: 95-112, 1986.
13. 板崎利编: 细菌、真菌、原虫用培地 (4版), 东京, 日本株式会社, p. 134-207, 1987.
14. De Man J C: *J. Appl. Bact.*, 23 (1): 103-105, 1960.
15. 中国科学院微生物研究所: 一般细菌常用鉴定方法, 北京, 科学出版社, p. 135-179, 1978.
16. Peter H A Sneath: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams & Wilkins, London, p. 1209-1235, 1986.
17. Skinner F A: *Identification Methods for Microbiology*, 2Ed, Lalimer Trend Co. Ltd., p. 246-259, 1979.
18. Alcamo L E: *Fundamentals of Microbiology*, London, Addisonwesley Publishing Co., p. 112-116, 1983.
19. Reddy N S: *Japanese J. Dairy and Food Science*, 35 (1): 5-12, 1987.

(1992-05-05收稿)