

酸马奶酒中乳酸菌的分离及发酵性能研究

王伟¹, 张磊², 陶永霞¹, 傅力¹

(1.新疆农业大学食品科学学院,新疆 乌鲁木齐 830052;2.新疆农业大学教务处,新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 以酸马奶酒为原料,筛选到 1 株优良的乳酸菌 MJ3,并对该乳酸菌的形态特征、生理生化特征、培养条件、发酵性能进行了研究。结果表明,该菌为 G⁺ 短杆菌,最适生长 pH 为 7.0,最适生长温度为 35 °C,最适的分离培养基是 MRS 培养基,该菌发酵 8 h 时,酸度达到最大,为 37.6 °T,后酸化能力弱。

关键词: 微生物; 酸马奶酒; 乳酸菌; 分离; 发酵性能

中图分类号:Q93-3;TS262.4;TS261.1;TS252.1 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2009)11-0046-03

Isolation of *Lactobacillus* from Koumiss and the Fermentation Properties

WANG Wei¹, ZHANG Lei², TAO Yong-xia¹ and FU Li¹

(1.College of Food Science,Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052; 2.Academic Affairs Office, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: A quality *Lactobacillus* strain MJ3 was screened from koumiss. Its morphological features, physiological and biochemical characteristics, culture conditions, and fermentation performance were studied. The results showed that such strain was G⁺ *Brevibacterium* and the optimum pH value and temperature for its growth were 7.0 and at 35 °C respectively, the best isolation culture medium was MRS culture medium, and the acidity reached up to the highest value at 8 h after its fermentation, and then the acidity decreased gradually as time passed by.

Key words: microbe; koumiss; lactobacillus; isolation; fermentation performance

酸马奶酒是一种古老的乳酸、酒精发酵乳饮料,不仅营养价值高,风味醇香,且具有活血化瘀等保健功能。在我国,用酸马奶酒治疗疾病是蒙医学中很早就采用的重要饮食疗法之一。乳酸菌是酸马奶酒中的主要微生物类群,对酸马奶酒的风味和医疗功效起着重要的作用,新疆牧区牧民沿用古老而传统的方法制作酸马奶酒,其中的乳酸菌已经适应当地恶劣的自然环境,是传代性能好、抗逆性强、凝乳状态好和风味独特的优良乳酸菌种群^[1-3]。

本实验以新疆牧区牧民自制的酸马奶酒为原料,从中分离乳酸菌并对其培养条件、发酵性能等特性进行了研究,从而为获得传代性好、耐性强、风味独特的乳酸菌发酵剂提供选择的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

酸马奶酒:新疆乌鲁木齐南山牧场牧民自制。

1.1.2 培养基

MRS 培养基、改良 MRS 培养基、蛋白胨培养基、改

良 TJA 培养基、LBS 培养基、素琼脂培养基。

1.2 方法

1.2.1 技术路线^[3]

样品→稀释→初筛→复筛→生理生化实验→菌种确定→分离培养基的确定→菌种培养条件的确定→菌种发酵性能的测定

1.2.2 样品稀释

量取 25 mL 样品,置于装有 225 mL 灭菌生理盐水的三角瓶中,混匀,制得 10⁻¹ 的稀释液;吸取 1 mL 的 10⁻¹ 稀释液至装有 9 mL 生理盐水的试管中,制成 10⁻² 的稀释液,同理可依次制得 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释液。

1.2.3 初筛

选取 2~3 个合适的稀释度,以含钙的 MRS 培养基为分离培养基,采用混浇法进行菌种分离,挑取含钙培养基上具有明显钙溶圈的菌株待用。

1.2.4 复筛

将挑取的具有明显钙溶圈的菌株,重新进行点样培养,选择钙溶圈较大的菌株,进行革兰氏染色。

1.2.5 生理生化实验^[4-5]

选取钙溶圈较大且革兰氏染色结果为阳性的菌株进

基金项目:新疆农业大学校前期资助课题。

收稿日期:2009-08-17

作者简介:王伟(1978-),男,安徽人,讲师,研究方向:微生物发酵工程。

通讯作者:傅力(1964-),女,天津人,副教授,研究方向:微生物发酵工程。

行生理生化实验。

1.2.6 分离培养基的确定

各取 1 mL 活化好的菌液至液体 MRS 培养基、蛋白胨液体培养基、改良 TJA 液体培养基、LBS 液体培养基和蒸馏水 5 种培养基中,每隔 2 h 测一次 OD₅₄₀ 值。

1.2.7 菌种培养条件的确定

1.2.7.1 最适生长温度的确定

将活化好的菌种分别接种到等量的液体 MRS 培养基中,分别放在 30 °C、35 °C、40 °C 的恒温摇床中培养,转速为 120 r/min,每隔 2 h 测 1 次 OD₅₄₀。

1.2.7.2 最适生长 pH 的确定

将活化好的菌种分别接种到等量的不同 pH 值的液体 MRS 培养基中,放在 35 °C 恒温摇床中培养,转速为 120 r/min,每隔 2 h 测 1 次 OD₅₄₀。

1.2.8 菌种发酵性能的测定^[3]

1.2.8.1 产酸能力的测定

将活化好的菌株按 4 % 的接种量接种到灭菌的鲜牛奶中,35 °C 发酵 2 h 后,每 2 h 测定 1 次滴定酸度,以确定菌种的产酸能力。

1.2.8.2 后产酸能力的测定

将活化后的菌株按 4 % 的接种量接种到灭菌的鲜牛奶中,35 °C 发酵至凝乳后,冷却,5 °C 冷藏。酸奶在冷藏过程中每天测定 1 次滴定酸度,通过酸奶在冷藏过程中滴定酸度的变化来判断菌种后酸化能力的强弱。

1.2.8.3 产香能力的测定

将活化后的菌株以 4 % 的接种量接种到灭菌鲜牛乳中,35 °C 发酵至凝乳后,冷却,5 °C 冷藏,酸奶在冷藏过程中每天测定 1 次乙醛和双乙酰含量。

1.2.8.4 保水率的测定

将活化后的菌株以 4 % 的接种量接种到灭菌鲜牛乳中,35 °C 发酵至凝乳后,冷却,5 °C 冷藏,酸奶在冷藏过程中每 2 h 测定 1 次保水率。

2 结果与分析

2.1 菌种的复筛

按照方法 1.2.4,乳酸菌复筛结果见表 1。

表1 乳酸菌复筛结果

菌种编号	菌落直径 Dc (mm)	钙溶圈直径 Dp (mm)	Dp/Dc	G氏染色	菌体形态
MJ 1	5	6	1.2	+	短杆状, 弯曲
MJ 2	2	3	1.5	+	短杆状, 弯曲
MJ 3	3	8	2.7	+	单生, 短杆状
MJ 4	3	4	1.3	+	杆状, 细长
MJ 5	2.5	3	1.2	+	单生, 球状
MJ 6	2	3.5	1.7	+	链生球状

由表 1 可知,从马奶酒中分离到 6 株产生钙溶圈的

菌株,菌株经革兰氏染色结果都为阳性;菌株以杆状菌为主,也有少量的球状菌存在。

2.2 生理生化试验

按照方法 1.2.5,乳酸菌生理生化试验结果见表 2。

表 2 乳酸菌生理生化试验结果

项目	菌株					
	MJ1	MJ2	MJ3	MJ4	MJ5	MJ6
H ₂ O ₂ 试验	-	+	-	-	+	-
KOH 试验	+	-	-	-	-	+
明胶液化试验	-	-	-	+	-	+
葡萄糖产酸试验	-	-	-	-	-	-
葡萄糖产气试验	-	-	-	-	-	-
V-P 试验	-	-	-	-	-	-
运动性试验	-	-	+	-	-	-
产氨试验	-	+	+	+	-	-
产 H ₂ S 试验	-	-	+	-	+	-

注: “+” 表示阳性反应; “-” 表示阴性反应。

由表 2 可知,菌株 MJ1、菌株 MJ3、菌株 MJ4、菌株 MJ6 的接触酶试验为阴性;菌株 MJ2、菌株 MJ3、菌株 MJ4、菌株 MJ5 的 KOH 试验为阴性;菌株 MJ1、菌株 MJ2、菌株 MJ3、菌株 MJ5 的明胶液化试验为阴性,结合复筛结果,可以判定菌株 MJ3 为分离得到的乳酸菌。因为乳酸菌为革兰氏阳性菌;接触酶试验、KOH 试验、明胶液化试验均为阴性;在含钙的 MRS 培养基上可以产生钙溶圈。

2.3 分离培养基的确定

按照方法 1.2.6,乳酸菌 MJ3 在不同培养基上的生长情况见图 1。

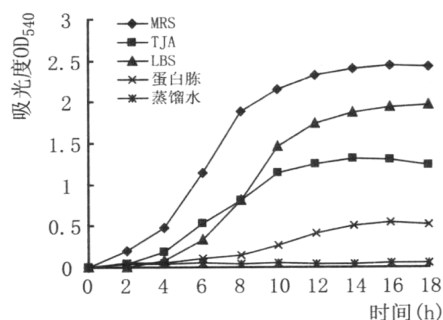


图 1 乳酸菌 MJ3 在不同培养基上的生长

由图 1 可知,菌株 MJ3 在 MRS 培养基中生长速度最快,在 TJA 和 LBS 培养基中生长速度一般,在蛋白胨中的生长速度较慢,而在蒸馏水中不生长,所以选择 MRS 培养基为最适分离培养基。

2.4 菌种培养条件的确定

2.4.1 最适生长温度的确定

按照方法 1.2.7.1 进行试验,结果见图 2。

由图 2 可知,乳酸菌 MJ3 在 35 °C 时生长速度最快,所以确定 35 °C 为乳酸菌 MJ3 的最适生长温度。

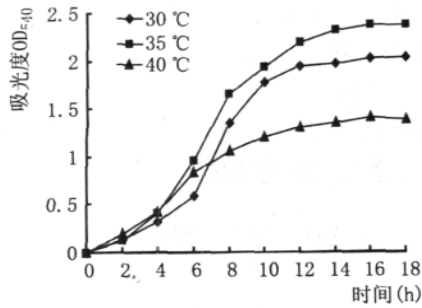


图2 乳酸菌 MJ3 的最适生长温度

2.4.2 最适生长 pH 的确定

按照方法 1.2.7.2 进行试验,结果见图 3。

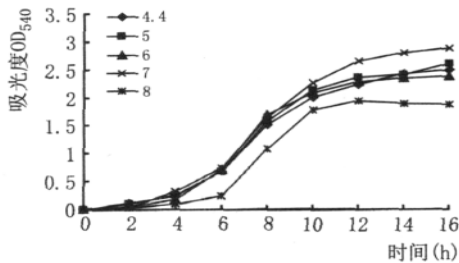


图3 乳酸菌 MJ3 的最适生长 pH

由图 3 可知,乳酸菌 MJ3 在 pH7.0 的培养基中生长速度最快。而酸性和碱性条件容易抑制该菌株的生长,所以最终确定 pH7.0 为乳酸菌 MJ3 的最适生长 pH 值。

2.5 菌种发酵性能测定

2.5.1 产酸能力的测定

按照方法 1.2.8.1 进行试验,结果见图 4。

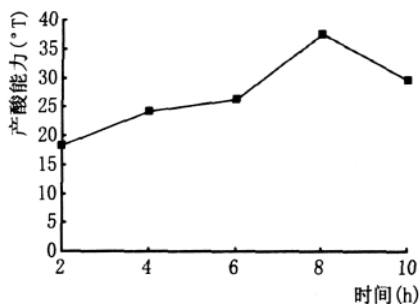


图4 发酵过程酸度变化

由图 4 可知,乳酸菌 MJ3 在发酵前 4 h 产酸速度缓慢,酸度较低;发酵 6~8 h,酸度上升很快,且到 8 h 时,酸度达到最大,达到 37.6°T,8 h 以后,酸度开始下降。

2.5.2 后产酸能力的测定

按照方法 1.2.8.2 进行试验,结果见图 5。

由图 5 可知,乳酸菌 MJ3 发酵的酸奶,经过 7 d 的冷藏,从第 2 天至第 6 天酸度呈现一定的上升趋势,变化幅度为 21.6°T,第 6 天之后酸度开始下降。

2.5.3 产香能力的测定

2.5.3.1 乙醛含量的测定

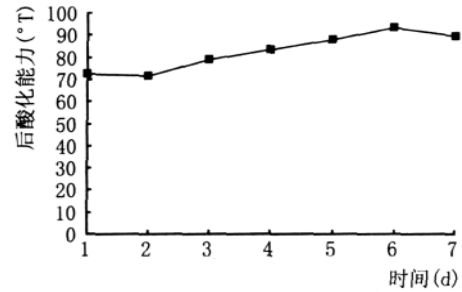


图5 冷藏过程酸度变化

按照方法 1.2.8.3 进行试验,结果见图 6。

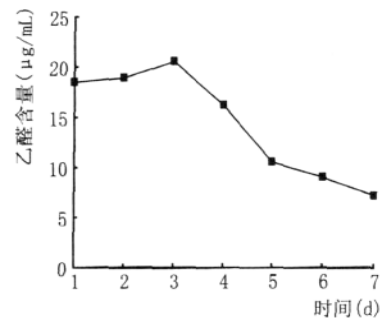


图6 冷藏过程中乙醛含量变化

由图 6 可知,乳酸菌 MJ3 发酵的酸奶,经过 7 d 的冷藏,乙醛含量在酸奶冷藏过程中不稳定,变化范围为 7.2~20.5 μg/mL,在冷藏第 3 天,乙醛含量达到最大值,之后开始下降。

2.5.3.2 双乙酰含量的测定

按照方法 1.2.8.3 进行试验,结果见图 7。

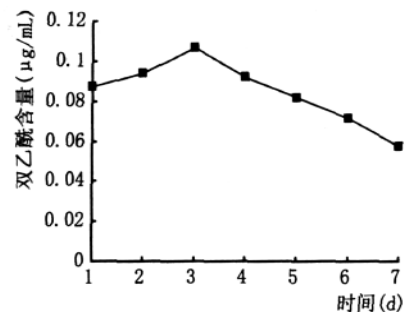


图7 冷藏过程中双乙酰含量变化

由图 7 可知,乳酸菌 MJ3 发酵的酸奶,经过 7 d 的冷藏,双乙酰的含量在酸奶冷藏过程变化较大,变化范围为 0.0573~0.1066 μg/mL,在冷藏第 3 天,双乙酰含量达到最大值,之后开始下降。

2.5.4 保水率的测定

按照方法 1.2.8.4 进行试验,结果见图 8。

由图 8 可知,乳酸菌 MJ3 发酵的酸奶,在冷藏过程中保水率随冷藏时间的延长而下降,在冷藏 4~6 h 期间

(下转第 52 页)

城市、乡村、森林、海岸不同地点空气细菌优势菌的研究一致。其中,芽孢杆菌属在3个作坊内的含量占有绝对的优势,其浓度比在营沟头、新街子和什字头分别达到43.8%、57.6%和63.5%。芽孢杆菌属在曲酒酿造过程中起着重要的作用。地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌可以产生淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等水解酶类。芽孢杆菌属在作坊外的浓度要高于一般报道水平,在芽孢杆菌浓度较高的什字头和新街子作坊,其在作坊外的浓度显著高于营沟头作坊外环境,这与作坊内高浓度的芽孢杆菌含量相关。微球菌属为常见的大气菌群,其浓度在作坊内外都占有一定的优势,作坊外环境大于作坊内,与已报道的大气中的微球菌属浓度相比,作坊外的微球菌浓度相对较高^[14]。

参考文献:

- [1] 吴衍庸. 中国泸州白酒传统工艺的微生物生态学意义[J]. 工业微生物, 1988, (6):.
- [2] 吴衍庸. 浓香型曲酒微生物技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1987.
- [3] 姚万春, 唐玉明, 廖建民, 等. 浓香型酒制曲环境空气微生物分布探讨[J]. 酿酒科技, 1999, 94(4): 21-23.
- [4] 张良, 李宗珍, 张宿义, 等. 泸州古酿酒作坊空气曲霉菌初步研究[J]. 酿酒, 2009, (2): 35-37.
- [5] 李宗珍, 张宿义, 许德富, 等. 泸州老窖古酿酒作坊夏季空气真菌分布特征研究[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(6):.
- [6] 李涛. 空气微生物采样及发展趋势[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(5): 538-539.
- [7] 周煜, 陈梅玲, 姜黎, 等. 16S rRNA 序列分析法在大气微生物检测中的应用[J]. 生物技术通讯, 2000, 11(2): 111-114.
- [8] 布坎南. 吉本斯等编. 伯杰细菌鉴定手册(第8版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [9] 车凤翔, 徐桂清, 史传英, 等. 京津地区大气细菌生态分布[J]. 中国环境科学, 1990, 10(13):.
- [10] 周晏敏, 韩梅, 陈振宇. 齐齐哈尔市不同功能区大气微生物污染研究[J]. 中国环境监测, 1994, 10(1): 49-51.
- [11] 王文义. 重庆大气微生物污染状况调查与评价[J]. 四川环境, 1997, 16(2): 38-42.
- [12] 方治国, 欧阳志云, 胡利锋, 等. 城市生态系统空气微生物群落研究进展[J]. 生态学报, 2004, 24(2): 315-322.
- [13] Shaffer B, Lighthart B. Survey of culturable airborne bacteria at four diverse locations in Oregon: urban, rural, forest and coastal [J]. Microbiol Ecology, 1997, 34(2):.
- [14] 刘志恒. 现代微生物学[J]. 北京: 科学出版社, 2002.

(上接第48页)

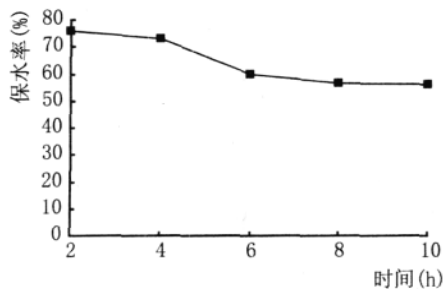


图8 冷藏过程中保水率变化

下降幅度最大,6h之后缓慢下降。

3 结论

以酸马奶酒为原料,筛选到1株优良的乳酸菌MJ3,经鉴定:该菌为G⁺短杆菌,最适生长pH为7.0,最适生长温度为35℃,最适的分离培养基是MRS培养基;该

菌产酸能力较强,发酵8h时,酸度达到最大,为37.6°T,后酸化能力弱;该菌发酵酸奶在冷藏期间乙醛含量在7.2~20.5 μg/mL范围内,双乙酰含量在0.0573~0.1066 μg/mL范围内,保水率随冷藏时间的延长而下降。

参考文献:

- [1] 关加怀. 马奶及酸马奶酒的医疗作用[J]. 中国畜产与食品, 1998, (2): 87-88.
- [2] Lozovich S. Medical uses of whole and fermented mare milk in Russia [J]. Cultured Dairy Products Journal, 1995, 30(1): 18-19.
- [3] 甘伯中, 杜宁娟, 等. 青海牧区酸奶中乳酸菌分离及发酵性能的研究[J]. 食品工业科技, 2009, (2): 174-177.
- [4] 赵兵, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社出版, 2002.
- [5] 王丽, 刘秀花, 等. 乳酸菌的筛选及生物学特性的研究[J]. 商丘师范学院学报, 2008, 24(12): 98-101.

国酒茅台上榜 2009“亚洲品牌 500 强”

本刊讯:从有关方面获悉,“亚洲品牌 500 强”在京揭晓,国酒茅台等国内共有 217 家企业入围,占总数的 43.4%。

据悉,由亚洲国际名优品牌认证监督管理中心与中国企业报社等国内相关研究机构、媒体等共同主办的“亚洲品牌 500 强排行榜”由(ABAS)亚洲品牌测评体系专家系统委员会倾力打造。该专家委员会由亚洲国际名优品牌认证监督管理中心联合国务院国有资产监督管理委员会研究中心、中国人民大学发起组织,并邀请亚洲和欧美国家的著名品牌专家和经济学家共 30 多人出任委员。(小凡)