

奶酒中乳酸菌的分离与筛选

翁鸿珍,成宇峰,岳泰新

(包头轻工职业技术学院,内蒙古 包头 014035)

摘要: 从内蒙古锡林郭勒牧区自然富集菌种发酵的新鲜奶酒发酵醪中分离到乳酸菌 20 株,以生产性能为指标,经过 8 次筛得到两株试验菌株。通过乳酸发酵试验,蛋白质凝固能力明显提高,产酸能力达到二次发酵要求,蛋白质与乳清分离效果良好,乳清的风味及口感均优;中试生产结果表明,奶酒质量得到明显的提高,菌种的性能达到了预期效果。(孙悟)

关键词: 奶酒; 乳酸菌; 分离; 筛选; 发酵

中图分类号:TS262.4;TS261.4;TS261.1

文献标识码:B

文章编号:1001-9286(2010)03-0043-03

Separation & Screening of *Lactobacillus* in Milk Wine

WENG Hong-zhen, CHENG Yu-feng and YUE Tai-xin

(Baotou Light Industry Vocational Techniques College, Baotou, Inner Mongolia 014035, China)

Abstract: 20 lactic acid bacteria strains were isolated from the fermented mash of fresh milk wine (produced by naturally accumulated bacteria fermentation in Xilin Guole pastoral area in inner Mongolia). Then 2 experimental strains were obtained through screening for 8 times with production performance as the index. Lactic acid fermentation test indicated that the protein coagulation capability of the two strains improved evidently, their acid-producing capability could meet the requirements of secondary fermentation, the separation effects of protein and whey were satisfactory, and whey taste was excellent. Medium-size production results indicated that the quality of milk wine produced by the two strains improved evidently and the performance of the two strains had achieved the expected effects.(Tran. by YUE Yang)

Key words: milk wine; *Lactobacillus*; separation; screening; fermentation

奶酒(Kumiss)是以鲜马奶为原料,加入含有乳酸菌、酵母菌等菌种的发酵剂,经科学方法酿制而成的活性乳饮料,马奶酒有多种具有生物活性的营养成分,在医疗保健作用方面,马奶酒具有驱寒、活血、舒筋、消食、健胃等功能^[1]。

奶酒生产中,要进行两次发酵,第一次是乳酸发酵,在乳酸发酵中要达到两个目的,一是要凝固蛋白质,二是要产酸及形成一定的香味物质。而蛋白质凝固的紧密程度、产酸量的多少及香味物质形成的程度,都与乳酸菌关系密切。所以,乳酸菌的选择在奶酒生产中显得非常重要。本实验通过对奶酒发酵醪中乳酸菌进行分离,筛选出能够明显提高奶酒质量的两株乳酸菌。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

采用收集到的锡林浩特牧民家中以自然富集菌种发酵的新鲜奶酒发酵醪,采用无菌包装,并贮存于 4℃

冰箱中。

1.1.2 培养基

MRS 培养基^[2];蛋白胨水培养基^[3](含 0.1%硝酸钾);脱脂乳培养基(含石蕊):脱脂乳,10 g;石蕊,5 mL;蒸馏水,100 mL。pH 6.8~7.0,于 110℃,10 min 灭菌。

1.1.3 仪器与设备

UV-9200 紫外可见分光光度计:北京瑞利分析仪器公司。

1.2 分析测定方法

1.2.1 乳酸菌的分离

1.2.1.1 乳酸菌分离源的采集

本次实验采用随机取样原则,共收集 10 个新鲜奶酒发酵醪样品,贮存于 4℃冰箱中备用^[4]。

1.2.1.2 菌种分离方法

将采集到的样品混匀后,用无菌接种环挑取少量样品,接入灭菌后的 MRS 液体培养基中,在 37℃恒温培养 24 h。然后采用平板划线法进行菌种的分离。挑取

收稿日期:2009-11-19

作者简介:翁鸿珍(1957-),女,副教授,教育部高等学校高职高专生物技术类专业教学指导委员会委员,主要从事食品发酵、生物技术、酒类生产及专业分析与检测的教学及科研工作。

MRS 液体培养基中的菌群在 MRS 固体培养基中进行划线,于37℃恒温箱中培养48 h。观察菌落形态,挑选形态不同的菌落进行编号,然后将各个菌落分别再进行进一步的平板划线,于37℃恒温培养。经过3代的划线纯化分离,镜检为纯种后,将纯种接入 MRS 斜面培养基中于37℃培养24 h后,移入4℃冰箱保存备用^[5]。

1.2.2 乳酸菌的筛选

1.2.2.1 革兰氏染色

1.2.2.2 过氧化氢酶试验

将筛选出来的革兰氏阳性菌在 MRS 液体培养基中进行增殖培养,步骤如下所示。选择过氧化氢酶实验结果为阴性的菌株进行下一步的筛选。

菌株培养液→离心分离(3500 r/min, 15 min)→收集菌体→灭菌生理盐水洗涤菌体→取供试菌液→在菌体上滴加1 mL 3%过氧化氢(观察2~3 min)→没有气泡产生→过氧化氢酶阴性菌株

1.2.2.3 硝酸还原试验

从生长良好的乳酸菌菌株培养液中吸取3滴培养液接种到蛋白胨水培养基中,于37℃恒温培养5 d,往培养好的试验培养基中添加检测试剂,室温下放置30 min,观察颜色的变化。选择试验结果为阴性的菌株进行下一步试验。

1.2.2.4 石蕊牛乳试验

将生长良好的乳酸菌菌株接入含有石蕊的牛乳培养基中,于37℃恒温培养5~7 d,培养结束,观察培养基的变化。选择试验结果为使牛乳凝固并变成粉红色的菌株进行下一步筛选。

1.2.2.5 生长温度试验

将保存备用的实验菌株接种在 MRS 液体培养基中,于37℃恒温培养,传代2~3次,使实验菌株恢复到良好的生长状态,然后经3500 r/min,离心15 min,弃掉上清液,收集菌体,用灭菌的生理盐水洗涤菌体,之后用灭菌吸管取少量菌体接入 MRS 培养基中,分别置于25℃、30℃、35℃和40℃条件下恒温培养,培养时间为5 d,观察菌株在各个培养温度下的生长情况。选择能够在30℃生长良好的菌株和能够在40℃时生长良好的菌株进行试验。

1.2.2.6 pH 初始发酵试验

以 MRS 液体培养基为基础,调节其 pH 为3.5、4.0、5.0、6.0和6.5,制成 pH 初始发酵实验培养基。将保存备用的实验菌株接种在 MRS 液体培养基中,于37℃恒温培养,传代2~3次,使实验菌株生长良好,然后经过3500 r/min 离心15 min,弃掉上清液,收集菌体,用灭菌的生理盐水洗涤菌体,之后用灭菌吸管取少量菌体接入实验培养基中,于37℃恒温培养3 d,观察菌体生长状

况。选择在 pH 为3.5~6.0 的范围内能够良好生长的菌株进行下一步的试验。

1.2.2.7 发酵类型试验

乳酸菌发酵葡萄糖的形式有两种类型即同型发酵与异型发酵。因此,在鉴定上必须明确属于哪种类型的发酵形式,为确定发酵类型必须测定被消耗的葡萄糖量和培养液中蓄积的产物(乳酸、乙醇、醋酸)量而查清消耗物和产生的收支程度。鉴定试验按照文献^[6]进行。

1.2.2.8 糖发酵试验

配制含蔗糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖的糖类发酵试验培养基,将生长良好的试验菌株在无菌状态下接入上述培养基中,于37℃恒温培养,3 d后观察试验结果。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌分离

按照1.2.1的方法,从收集的新鲜奶酒发酵醪中分离出纯的乳酸菌20株,为了满足实际生产中对乳酸菌的要求,对这些纯的乳酸菌进行筛选试验。

2.2 乳酸菌筛选

2.2.1 革兰氏染色镜检

分离出的20株试验菌株革兰氏染色均呈阳性,所以对这些菌进行下一步试验。

2.2.2 过氧化氢酶试验

7号、10号菌株试验结果为阳性,因此选择其他试验结果为阴性的菌株进行下一步的筛选试验。

2.2.3 硝酸还原试验

11号、13号、14号、17号菌株试验结果呈弱阳性,弃去这4株菌,对其他菌株进行下一步的筛选。

2.2.4 石蕊牛乳试验结果

按照1.2.2.4的方法做石蕊牛乳试验,结果见表1。

表1 石蕊牛乳试验结果

试验菌号	牛乳颜色	牛乳状态
1	A	a
2	A	a
3	A	a
4	B	a
5	A	a
6	C	b
8	C	a
9	C	a
12	A	a
15	C	a
16	A	a
18	B	a
19	A	a
20	A	a

注:牛乳颜色:“A”代表粉红色;“B”代表淡紫色;“C”代表蓝色;牛乳状态:“a”代表凝固;“b”代表澄清。

从表1中可以看出,满足本试验条件的菌株为1号、2号、3号、5号、12号、16号、19号、20号菌株,对这些菌株进行下一步的筛选试验。

2.2.5 生长温度试验

按照1.2.2.5的方法做生长温度试验,结果见表2。

表2 生长温度试验结果

温度 (℃)	菌号							
	1	2	3	5	12	16	19	20
25	+	+	+	+	+	+	+	+
30	++	+	+	++	++	+	++	++
35	++	++	++	++	++	++	++	++
40	+	++	++	++	+	++	++	++

注:“+”表示菌株生长培养基浑浊度低,“++”表示菌株生长培养基浑浊度高。

从表2结果可以看出,1号、5号、12号、19号、20号菌株在30℃条件下生长较好,2号、3号、5号、16号、19号、20号菌株在40℃条件下生长良好,其中5号、19号、20号菌株在30℃、40℃两个温度下均能生长旺盛。因此,选择以上菌株进行下一步的筛选试验。

2.2.6 pH初发酵试验结果

按照1.2.2.5的方法做pH初发酵试验,结果见表3。

表3 pH初始发酵试验结果

pH	菌号							
	1	2	3	5	12	16	19	20
3.5	++	+	+	+	++	++	+	++
4.0	++	++	+	+	++	++	+	++
5.0	+++	++	++	++	+++	+++	+	+++
6.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
6.5	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++

注:“+”表示菌株生长培养基浑浊度低,“++”表示菌株生长培养基浑浊度高,“+++”表示菌株生长培养基浑浊度较高。

从表3结果可以看出,1号、12号、16号、20号菌株在pH值为3.5~6.0的范围内生长良好,所以选择这4株菌进行下一步的筛选试验。

2.2.7 发酵类型试验

按照1.2.2.6的方法做发酵形式试验,结果见表4。

从表4结果可以看出,符合试验要求的菌株为1号、20号菌株,对这两株菌进行下一步的筛选试验。

2.2.8 糖发酵试验

表4 发酵形式试验结果

项目	试验菌号			
	1	12	16	20
发酵形式	同型发酵	异型发酵	异型发酵	同型发酵

按照1.2.2.7的方法做糖发酵试验,结果见表5。

表5 糖类的发酵试验结果

糖类	菌号	
	1	20
蔗糖	+	+
乳糖	+	+
葡萄糖	+	+
麦芽糖	-	+

注:“+”表示发酵,“-”表示不发酵。

从表5可以看出,1号、20号菌均能发酵蔗糖和乳糖,所以选择这两株作为发酵奶酒的试验菌株。

3 结论

从自然富集菌种发酵的新鲜奶酒发酵醪中分离到乳酸菌20株,以生产需要的实际性能为指标,经过8次筛选试验,最终筛选出2株作为第一次发酵的试验菌株。通过乳酸发酵试验,蛋白质凝固能力明显提高,产酸能力也达到了二次发酵的要求,蛋白质与乳清分离效果良好,乳清的风味及口感均优。说明所选菌种性能达到了预期效果。通过中试生产,生产结果显示,奶酒质量得到了明显的提高。

参考文献:

- [1] 李少英,乌尼.马奶酒中乳酸菌的分离及其生物学特性的研究[J].内蒙古农业大学学报,2002,(12):59-66.
- [2] A. Butenandt; H. Rembold; Hoppe-Seyler, Z. f. J. Physiol. Chem. 1957, (308): 285-289.
- [3] 沈萍.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999.
- [4] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,???
- [5] 王立平,徐杰,云月英,等.蒙古国传统发酵酸马奶中乳杆菌潜在益生特性的研究[J].中国乳品工业,2005,(4):4-5.
- [6] 内村泰,冈田早苗.乳酸菌实验手册(日文版)[M].朝仓书店,1992.

(上接第42页)

- [J].酿酒科技,2005,138(12):80-82.
- [10] 郑岩,汤庆莉,吴天祥,等.GC-MS法建立贵州茅台酒指纹图谱的研究[J].中国酿造,2008,(9):74-76.
- [11] 徐抗震,宋纪蓉,任莹辉,等.色谱指纹图谱在苹果酒质量评价中的应用[J].色谱,2007,25(1):93-95.
- [12] 王玺,王文宇,张克荣.中药HPLC指纹图谱相似性研究的探

- 讨[J].沈阳药科大学学报,2003,20(5):360-362.
- [13] 孙庆雷,林云良,祝贺.HPLC指纹图谱相似度研究[J].化学分析计量,2006,15(6):54-55.
- [14] 王龙星,肖红斌,梁鑫淼,等.一种评价中药色谱指纹谱相似性的新方法:向量夹角法[J].药学报,2002,37(9):713-717.