

酸乳菌种分离纯化方法

伍时华, 黄翠姬, 石媛靖, 邱月葵
(广西工学院生物与化学工程系, 广西 柳州 545006)

摘要: 本文研究了在脱脂乳中保藏的发酵酸乳菌种的分离纯化方法。确定了德氏乳杆菌保加利亚亚种的分离纯化培养基为改良 MRS, 以 10^{-2} 稀释度划线分离法在烛缸中厌氧培养可以达到很好的分离效果, 添加 2% 的玉米浆后有利于纯菌株的生长; 采用涂布分离法和真空袋培养, 在链球菌基础培养基上可很好地分离出唾液链球菌嗜热亚种的纯菌株。经鉴定所分离出菌株为纯种后, 采用斜面保藏在不含乳基质的培养基上, 在 15 d 内可以保持其活力。
关键词: 德氏乳杆菌保加利亚亚种; 唾液链球菌嗜热亚种; 酸乳; 分离纯化

The Isolation and Purification of Yoghurt Bacteria

WU Shi-hua, HUANG Cui-ji, SHI Yuan-jing, QIU Yue-kui
(Department of Biological and Chemistry Engineering, Guangxi University of Technology,
Liuzhou 545006, China)

Abstract: This paper studied mainly on the isolation and purification method of yoghurt bacteria, which keep in degrease milk. The isolation and purification medium for *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* were defined as improving MRS, after streaking plate with 10^{-2} dilution degree, place in desiccator burning candle to consume its oxygen, the result showed that this method can attain its well separation. Increasing 2% corn syrup in its liquid medium, the growth of the pure strain showed the notability effect. After smearing culture using vacuum seals plastic bag, in the streptococcus basic medium could nicely separate the streptococcus salivarius subsp. *thermophilus* pure strain. Identifying the isolated strain of yoghurt and make sure it was pure strain, adopting inoculation of an agar slant conserve in medium which not containing milk source, could keep them vitality in 15 days.

Key words: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*; yoghurt; isolation and purification

中图分类号 TS252.54

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)10-0162-05

酸乳(yoghurt)是指乳与乳制品(杀菌乳或浓缩乳)在保加利亚乳杆菌(已更名为:德氏乳杆菌保加利亚亚种)和嗜热链球菌(已更名为:唾液链球菌嗜热亚种)等酸乳发酵菌种的作用下,经乳酸发酵得到的凝固乳制品,可任意添加乳粉、脱脂乳粉、乳清粉等,在最终产品中必须大量存在这些微生物^[1,2]。1900年诺贝尔生理学 and 医学奖获得者俄国科学家梅契尼柯夫指出酸奶有利于长寿,促进了酸奶的普及^[3]。

酸乳发酵菌种的功能主要是产酸、产风味物质、稳定质构,它的质量和品种在酸乳生产中起着关键性的作用。工厂使用的菌种一般均培养在脱脂牛奶中代代相传。由于传代次数多常导致菌种的退化或变异,在生产中出现产酸变慢、风味变差、产品尖酸的现象,不得不更换菌种^[4]。因此,进行酸乳菌种的分离及纯化方

法研究,对保持产品质量,开发新产品或者筛选更优菌株等方面具有一定的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 本实验采用的菌种为保藏于脱脂牛奶中的德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 以下用 L.b 表示)和唾液链球菌嗜热亚种(*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, 以下用 S.t 表示) 广西某乳业有限公司。

1.1.2 培养基 实验中用到的培养基有改良 MRS、乳糖琼脂、Y、改良 IRIE、TYC、改良 MC、链球菌基础培养基、BCG 牛乳营养琼脂培养基、牛乳琼脂培养

收稿日期: 2004-07-11

作者简介: 伍时华(1963-), 男, 副教授, 系主任, 博士, 研究方向为发酵工程。

基、菌种鉴定培养基以及各种优化培养基,按文献[5~14]所述方法配制。

1.2 实验方法

1.2.1 原菌种的活化

对活化的条件,即活化的培养基成分,培养基的灭菌条件,接种量,培养温度等4因素,以石蕊牛乳培养基被还原为乳白色的时间为指标进行正交活化试验,以找出最佳的活化条件。因素水平见表1。

表1 原菌种活化正交实验因素水平

水平	因素 A 脱脂乳浓度 (%)	因素 B 灭菌条件	因素 C 接种量 (%)	因素 D 培养温度 (°C)
1	8	121°C 15min	1	37
2	10	115°C 15min	2	40
3	12	108°C 15min	4	42
4	14	85°C 15min	6	45

1.2.2 增殖培养

将在石蕊牛乳培养基活化后的L.b菌以2%接种量接种到改良MRS、乳糖琼脂、Y等液体培养基中;接种到改良IRIE、TYC、J等液体培养基中,43°C增殖培养。

1.2.3 分离培养

取增殖培养后的L.b菌液和S.t菌液作 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释,采用倾注平板法分别在改良MRS、乳糖琼脂、Y、改良MC、BCG和改良IRIE、TYC、J、BCG、改良MC的平板上进行分离,置于43°C烛缸法厌氧培养48h,根据菌体在各培养基中生长情况选择合适的培养基;比较平板划线分离法、倾注平板分离法的分离效果;研究在大气环境、真空袋、烛缸厌氧等培养条件的分离效果。

1.2.4 纯化培养

选取疑似菌落镜检,初步确定为纯菌株后,采用单层平板划线法、双层平板划线法和试管斜面划线法进行43°C纯化培养48h后观察结果。

1.2.5 分离菌种的鉴定

用无菌水洗脱斜面菌体制成菌悬液,稀释,接种0.2ml至各种不同的生化鉴定培养基中进行鉴定试验,43°C培养48h后观察结果。分别作空白对照实验。其具体操作方法详见参考文献[15,16]。

1.2.6 纯菌株的生长培养

将分离纯化后的L.b纯菌在改良MRS、乳糖琼脂、Y和在添加2%玉米浆的改良MRS2、乳糖琼脂2、及Y2液体培养基中43°C培养,用754一紫外分光光度计在500nm波长下,每2h取样以10倍稀释测定菌液的吸光度,绘制菌体生长曲线。

将分离纯化后的S.t纯菌在改良IRIE、TYC、链球菌基础培养基、牛乳琼脂固体培养基和在添加2%玉米浆的改良IRIE2、TYC2、链球菌基础培养基2中划线培养,48h后观察菌体生长情况。

1.2.7 菌种保藏

对分离得到的酸乳菌株用定期移植保存法保藏。采用斜面与穿刺培养48h后置于冰箱中冷藏。

1.2.8 生长曲线的测定

每2h取待测菌液稀释10倍,以8000r/min离心2min,弃上清液,加少量蒸馏水与沉淀的菌体漩涡混合,定容至所需容量,用754一紫外分光光度计在500nm波长条件下测定吸光度。以培养时间为横坐标,相应的吸光度为纵坐标,绘制菌体生长曲线。

2 结果与讨论

2.1 原菌种的活化

在牛乳中保存的菌种活力不旺盛,处于维持生命的休眠状态。因而在使用前要进行活化。L.b原菌种活化正交实验方案及结果见表2,其极差分析结果见表3。

表2 L.b原菌种活化正交实验方案及结果 $L_{16}(4^5)$

试验号	因素 A	因素 B	因素 C	因素 D	其它	石蕊还原时间(min)
1	1	1	1	1	1	840
2	1	2	2	2	2	570
3	1	3	3	3	3	515
4	1	4	4	4	4	610
5	2	1	2	3	4	525
6	2	2	1	4	3	480
7	2	3	4	1	2	610
8	2	4	3	2	1	660
9	3	1	3	4	2	455
10	3	2	4	3	1	465
11	3	3	1	2	4	480
12	3	4	2	1	3	780
13	4	1	4	2	3	455
14	4	2	3	1	4	615
15	4	3	2	4	1	455
16	4	4	1	3	2	660

表3 L.b原菌种活化正交实验的极差分析结果

指标值	石蕊还原时间				
	因素 A	因素 B	因素 C	因素 D	其它
K ₁	633.8	568.8	615	711.2	605
K ₂	568.8	532.5	582.5	541.2	573.8
K ₃	545	515	561.2	541.2	557.5
K ₄	546.2	677.5	535	500	557.5
极差 R	88.8	162.5	80	211.2	47.5

根据 L.b 原菌种活化的正交试验结果可以看出, 各因素对试验指标石蕊还原时间的影响大小为: $D > B > A > C$ 。其它因素的极差 R 都低于各因素的极差, 因此可以认为试验的交互作用及误差对试验结果的影响不大。对上述结果进行验证试验, 石蕊还原时间为 335min, 与前期试验相比, 可判定 L.b 的最优活化条件为 $A_3B_3C_4D_4$, 即活化培养基脱脂乳浓度为 12%, 灭菌条件 108°C 、15min, 接种量 6%, 培养温度 45°C 。

采用相似方法得到 S.t 菌的最优活化条件为 $A_4B_1C_4D_2$, 即活化培养基脱脂乳浓度为 14%, 灭菌条件 121°C 、15min, 接种量 6%, 培养温度 40°C 。

试验根据石蕊牛乳培养基在菌种活力最旺盛时可将石蕊的兰色还原为乳白色来判断菌种活力的强弱。随活化次数增多, 菌种凝乳状态越好, 乳清析出变少, 凝乳较结实。

2.2 增殖培养

增殖培养是为使待分离的菌种处于优势生长, 便于将它们从样品中分离。

2.2.1 测定稀释度的选择 分别将待测的菌液以 0、10、20、50、100 倍的稀释度进行试验, 结果表明在 10 倍稀释度可以得到合适的吸光度。

2.2.2 测定波长的选择 将菌液以 10 倍稀释度在 200~800nm 的波长范围内扫描测定吸光度, 结果表明在 500nm 的测定波长下可以得到合适的吸光度。

2.2.3 生长曲线的测定 为了解 L.b 和 S.t 在增殖培养基中的生长情况, 从而掌握增殖培养最适收获期, 进行了生长曲线测定, 结果如图 1 和图 2 所示。

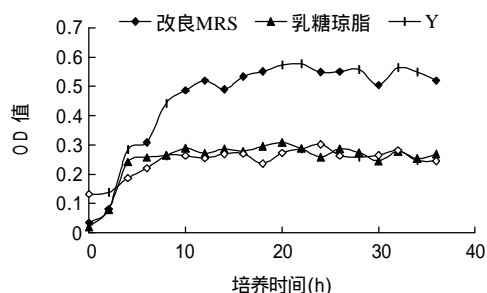


图1 L.b在不同培养基上的增殖生长曲线

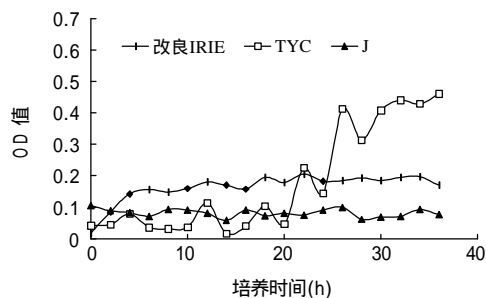


图2 S.t在不同培养基上的增殖生长曲线

由图 1 和图 2 结果, L.b 和 S.t 菌的增殖培养基分别为改良 MRS 改良 IRIE, 菌体收获时间分别为 10~12h 和 4~6h。

2.3 菌种分离

2.3.1 分离培养基的选择

将经增殖后的 L.b 和 S.t 分别在不同培养基上进行倾注平板分离, 43°C 烛缸法厌氧培养。

2.3.1.1 L.b 在改良 MC、乳糖琼脂、Y 培养基上无法分离出来, 故不适合作为其分离培养基; 分离 L.b 菌的最适培养基为改良 MRS 固体培养基, 最适稀释度为 10^{-2} 。

2.3.1.2 S.t 在 TYC、改良 MC、J 培养基上无法分离出来, 故不适合作为其分离培养基; 分离 S.t 菌最适培养基为改良 IRIE 固体培养基, 最适稀释度为 10^{-3} ; 在链球菌基础培养基上可以分离出 S.t, 采用 10^{-3} 稀释度涂布分离所得的菌落较 10^{-2} 大, 较适合作为分离时挑取菌落, 可以得到较好的分离效果。

2.3.2 培养方法的选择

根据所选择的培养基及各自的最佳稀释度, 采用倾注平板法分别在大气环境、烛缸厌氧法、0.06MPa 压力下抽真空的真空袋等条件下培养。结果如表 4。

试验表明, L.b 在烛缸法厌氧培养的环境中分离效果较好。S.t 在改良 IRIE 上用烛缸厌氧法和在链球菌基础培养基上用 0.06MPa 抽真空的真空袋法培养的分效果良好。

2.3.3 分离方法的选择

试验结果(表 5)表明, L.b 采用划线的分离方法效果较好, S.t 采用涂布分离法代替倾注分离法所获得的菌落

表4 不同分离环境的分离效果

培养环境	大气环境	烛缸厌氧法	真空袋抽真空
MRS(L.b)	无菌落生成	菌落数为 25, 菌落较大	有 3 个菌落生成
改良IRIE(S.t)	无菌落生成	菌落数为 37, 菌落较大, 形态有圆形、细长形	有 5 个菌落生成
链球菌基础培养基(S.t)	有少量菌落生成, 菌落很小, 白色, 圆形, 边缘不整齐	ND(未测定)	有较多菌落生成, 菌落较大

表6 L.b和S.t纯化培养结果

	单层平板划线法	双层平板划线法	试管斜面划线法
改良 MRS(L.b)	有菌落生长	有细小菌落生长	有较多菌落生长
改良 IRIE(S.t)	无菌落生长	无菌落生长	无菌落生长
链球菌基础培养基(S.t)	有菌落生长	大量菌落生长, 菌落细小	有较多菌落生长, 菌落较大

表5 不同分离方法的分离效果

分离法	划线分离法	倾注分离法
改良 MRS (L.b)	菌落数不多, 菌落较大	菌落数多, 菌落较小
改良 IRIE (S.t)	菌落数不多, 菌落较大	菌落数多, 菌落较小
链球菌基础培养基 (S.t)	菌落数不多, 菌落较小	菌落数多, 菌落较大

数较大, 适合分离时挑取菌落。

2.4 菌种纯化培养

L.b 菌选用从稀释度为 10^{-2} 的改良 MRS 平板上分离出的 6 个菌株, S.t 菌选用从稀释度为 10^{-3} 的改良 IRIE 平板上分离出的 5 个菌株和从链球菌基础培养基上分离出的 2 个菌株, 分别在改良 MRS、改良 IRIE 和链球菌基础培养基上采用单层平板划线法、双层平板划线法和试管斜面划线法进行纯化培养, 结果如表 6 所示。

由表 6 可知, L.b 菌在改良 MRS 培养基上、S.t 在链球菌基础培养基上采用上述三种方法均可达到纯化要求。在用橡胶塞封口的试管法中生长较好, 是因为试管中的氧气含量相对较少。试管法和单层平板法相差不大, 但试管法操作相对简便。

2.5 菌种鉴定

根据伯杰氏细菌学鉴定手册中有关乳酸菌形态和生理生化特性, 对分离纯化后的菌株进行 24 项鉴定试验。鉴定项目包括革兰氏染色, 运动性, 10°C 、 45°C 、 $\text{pH}4.5$ 、 $\text{pH}9.0$ 、 $6.5\%\text{NaCl}$ 的培养试验, 过氧化氢酶试验、石蕊牛乳试验、淀粉水解试验、硝酸盐还原试验、硫化氢试验、吲哚试验、明胶液化试验、精氨酸产氨试验、V-P 试验, 葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、山梨醇、D-果糖、D-木糖的发酵试验。

L.b 为 G^{+} 菌、单杆菌居多, 还有长杆状、短杆状、两端钝圆的, S.t 为 G^{+} 菌、圆形、卵圆形, 成对或形成长链。各项鉴定试验结果符合伯杰细菌鉴定手册(第八版)中对保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌的形态及特征描述。

2.6 纯菌种生长培养

将分离纯化后的 L.b 纯菌在改良 MRS、改良 MRS2、乳糖琼脂、乳糖琼脂 2、Y 及 Y2 液体培养基中培养, 其结果见图 3 和图 4。

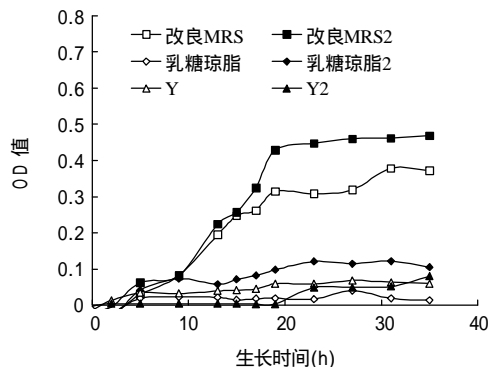


图3 L.b的菌体生长曲线

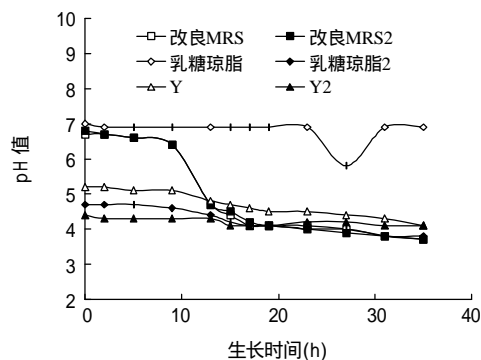


图4 L.b的培养过程pH值变化曲线

在改良 MRS、乳糖琼脂、Y 中分别添加 2% 的玉米浆后, L.b 菌体生长均比相应的培养基要好, 尤以改良 MRS2 培养基为最佳。在培养过程中随着培养时间增加, 吸光度增加, pH 值降低, 改良 MRS 和改良 MRS2 中 pH 值变化较大, 说明在这两种培养基中随着菌体的生长而产生的乳酸增多, 致使培养基酸度增加, pH 值下降。试验结果表明, 改良 MRS 可以作为 L.b 分离纯化的培养基, 也可以作为其生长培养基。

将分离纯化后的 S.t 纯菌在改良 IRIE、改良 IRIE2、TYC、TYC2、链球菌基础培养基、链球菌基础培养基 2、牛乳琼脂固体培养基中划线培养, 其结果见表 7。

由表 7 可以看出, 改良 IRIE、TYC、J 培养基不适合作为嗜热链球菌的生长培养基, 并且各自添加 0.3% 玉米浆后也是不适合作为其生长培养基。链球菌基础培养基、链球菌基础培养基 2、牛乳琼脂培养基可以作为其生长培养基, 但在链球菌基础培养基上添加 0.3% 的玉米浆后抑制了它的生长。从效果上看, 以链球菌基

表7 嗜热链球菌的生长培养结果

培养基	改良 IRIE	改良 IRIE2	TYC	TYC2	J	J2	链球菌基础培养基	链球菌基础培养基2	牛乳琼脂培养基
生长情况	不生长	不生长	不生长	不生长	不生长	不生长	生长旺盛, 有菌苔生成	有两三个菌落生成	形成薄薄的菌台

础培养基为最佳。

2.7 菌种保藏

将分离纯化后 L.b 和 S.t 分别接种到改良 MRS 和链球菌基础培养基 43℃ 培养 48h, 待菌体生长旺盛后, 放置 4℃ 冰箱保藏。于斜面保藏 7、15、22、30d 后拿出活化, 使牛乳培养基完全凝固的时间为 6、8、16、24h。因此, 利用斜面保藏方法, 每隔 15d 移植一次, 可以保持较好的菌种活力。

将分离纯化后 L.b 和 S.t 制成发酵剂, 按 L.b:S.t=2:1, 5% 接种量, 发酵温度为 45℃, 其它条件不变, 得到酸乳酸味纯正、凝块致密、口感细腻, 无乳清析出, 总体质量优于用分离纯化前菌种制备的酸乳, 达到了酸乳菌种分离纯化的目的。

3 结 论

3.1 脱脂乳中保存的酸乳菌种 L.b 和 S.t 活化条件分别为: 脱脂乳 12%, 108℃ 灭菌 15min, 接种量 6%, 45℃ 培养和脱脂乳 14%, 121℃ 灭菌 15min, 接种量 6%, 40℃ 培养。

3.2 改良 MRS 和改良 IRIE 培养基分别对 L.b 和 S.t 增殖作用显著, 菌体收获时间分别为 10~12h 和 4~6h。

3.3 分离纯化 L.b 菌, 用改良 MRS 以 10^{-2} 稀释度采用划线分离法在烛缸中培养, 并且改良 MRS 可以作为其纯化与生长培养基, 试管划线法纯化效果比单层平板划线的稍好。添加 2% 玉米浆有利于纯菌株的生长。

3.4 分离纯化 S.t 菌, 用链球菌基础培养基以涂布法和 0.06MPa 抽真空的真空袋培养。在 9 种培养基中选择链球菌基础培养基为 S.t 菌的最佳生长培养基, 添加 0.3% 的玉米浆后对 S.t 菌生长有抑制作用。培养基的选择对酸乳菌种的分离及其培养很重要。

3.5 根据伯杰氏细菌学鉴定手册中有关乳酸菌形态和生理生化特性, 对分离纯化后的菌株进行了鉴定。在不含乳基质培养基上采用斜面定期移植保藏法, 在 15d 内传代可以保持 L.b 和 S.t 菌活力。

参考文献:

- [1] 周家春. 食品工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 94-102.
- [2] 吴定, 孙德坤, 姚昌群, 等. 不同酸性条件对保加利亚乳杆菌存活性影响[J]. 食品科学, 2000, 21(6): 25-27.
- [3] 魏华, 付金衡, 李雁群, 等. 影响乳酸菌产率因素的初步研究[J]. 中国畜产与食品, 1998, 5(5): 204-206.
- [4] 马杰. 酸乳中酸乳菌的分离及其发酵性能测试[J]. 河南科学, 1996, 14(4): 460-463.
- [5] 周家春. 乳酸菌菌种的简便分离和培养[J]. 食品科学, 1998, 19(1): 39-41.
- [6] 郝林. 食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 49-51.
- [7] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 85-124.
- [8] 郭士海. 现代细菌学培养基和生化试验手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992. 423-481.
- [9] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 384-392.
- [10] 刘慧, 冯一兵. 酸奶生产的菌种保藏、活化及其扩培技术[M]. 食品工业, 1996, (1): 21-22.
- [11] 汪川. 酸奶中保加利亚乳杆菌分离条件的优化[J]. 中国微生物学杂志, 2001, 14(2): 73-75.
- [12] 王淑军. 酸乳制品中乳酸菌分离筛选方法研究[J]. 中国畜产与食品, 1998, 5(6): 265-267.
- [13] 张金华, 张晓光, 李兰红, 等. 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌的筛选[J]. 现代化农业, 1999, (3): 23-24.
- [14] 李锦子, 行曙光, 马杰, 等. 嗜热链球菌培养条件的研究[J]. 微生物学通报, 1996, 23(3): 138-140.
- [15] R E 布坎南, N E 吉本斯, 等. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 660-828.
- [16] 孟和毕力格, 李少英, 双杰. 酸奶制品中乳酸菌的分离鉴定与发酵性能的研究[J]. 中国乳业, 2001. 13-16.