

# 酸马奶酒中微生物的分离鉴定及抗菌特性的研究

贺银凤, 李少英, 母智深, 王锂韞, 双杰, 吴敬, 赵美霞

(内蒙古农业大学)

**摘要:** 从内蒙古锡盟不同地区采集 15 份酸马奶酒样品, 经分离纯化、归属种鉴定, 并单菌发酵液经调 pH 值、蒸发酒精、浓缩后, 对李斯特杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌进行抑菌研究。结果表明, 酸马奶酒是由多种乳酸菌和酵母菌共同发酵的乳饮料。其中乳酸菌中有球菌 5 个属, 杆菌 6 个属, 酵母菌 6 个属。乳酸菌中有 9 株乳球菌和 12 株乳杆菌对李斯特杆菌有抑制作用, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌无抑制作用。酵母菌中有 4 株对大肠杆菌有抑制作用, 其中有 2 株同时对金黄色葡萄球菌有抑制作用, 对李斯特杆菌无抑制作用。

**关键词:** 酸马奶酒; 菌种分离; 鉴定; 抑菌作用

**中图分类号:** S377

**文献标识码:** A

**文章编号:** 100226819(2002)0220091205

酸马奶酒一种古老乳饮料, 公元前 5 世纪就流行于欧洲的塞西亚部落。千百年来, 以其营养、健康、医疗和独特的风味一直为人们所喜爱, 至今东欧、蒙古国以及我国的内蒙古、新疆地区盛兴不衰。

酸马奶酒具有驱寒、活血、舒筋、消食、健胃等功能。利用酸马奶酒治疗结核病首创于前苏联, 目前东欧各国也建立了几百个酸马奶酒疗养院。内蒙古锡盟蒙医研究所也对包括肺结核、胃肠病、高血压、高血脂等多种疾病作了大量的临床研究, 但仍局限于临床治疗效果<sup>[1]</sup>。酸马奶酒中有哪些微生物, 产生什么代谢产物, 能起到较强的抑菌作用, 未见报道。本研究探讨了酸马奶酒中的微生物种类及其抗菌特性, 为酸马奶酒抗菌因子的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 样品来源

采自内蒙古锡林郭勒盟锡林浩特市、正兰旗、阿旗等不同地区马奶样品 15 个。

#### 1.1.2 培养基及试剂

MRS、LB、BLB、TPY 及各种糖培养基购于美国 Difco 公司, 按照文献[2, 5]方法配制; BL 培养基、马铃薯葡萄糖培养基购于日本荣研化学株式会社; PDA、Gondkova 氏培养基按文献[3]配制。

#### 1.1.3 标准菌株

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、致病性大肠杆菌 (*Escherichia Coli*)、李斯特菌

(*Listeria*)、保加利亚乳杆菌 JCM 1002 (*Lactobacillus*)、嗜酸乳杆菌 ATCC4356 (*L. acidophilus*)、肠膜明串珠菌乳脂亚种 ATCC9254 (*Leuconostoc mesenteoides* subsp. *Cremoris*)、乳球菌乳酸亚种 IFO 12007 (*Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis*) 由内蒙古农业大学动物科技学院提供。

#### 1.1.4 仪器设备

显微镜、分光光度计、真空冷冻干燥机、旋转蒸发器、超净工作台、150 型大厌氧罐。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 乳酸菌的分离及纯化

将样品划线接种于 BL 琼脂平板上, 30 和 37 厌氧培养 48 h, 挑取单个菌落, BL 琼脂培养基高层柱状穿刺制成纯培养物, 4 冰箱保存备用。纯培养物做革兰氏染色和过氧化氢酶试验, 如果革兰氏染色阴性, 过氧化氢酶试验阳性, 则初步鉴定为乳酸菌。穿刺接种于 MRS 半固体培养基中 37 培养 24 h~ 48 h 后, 保存在 4 环境下备用。

### 1.2.2 酵母菌的分离培养与纯化

样品接种于 PDA 培养基上, 28 培养 36 h, 取可疑酵母菌菌落制成纯培养物, 置 4 冰箱中备用。

### 1.2.3 乳酸菌属种的鉴定

按文献[2, 4, 6, 7, 8]介绍的方法进行。鉴定程序及项目见图 1。

收稿日期: 2001210229 修订日期: 2001212220

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (29966003)

作者简介: 贺银凤, 教授, 呼和浩特市 内蒙古农业大学食品科学与工程系, 010018

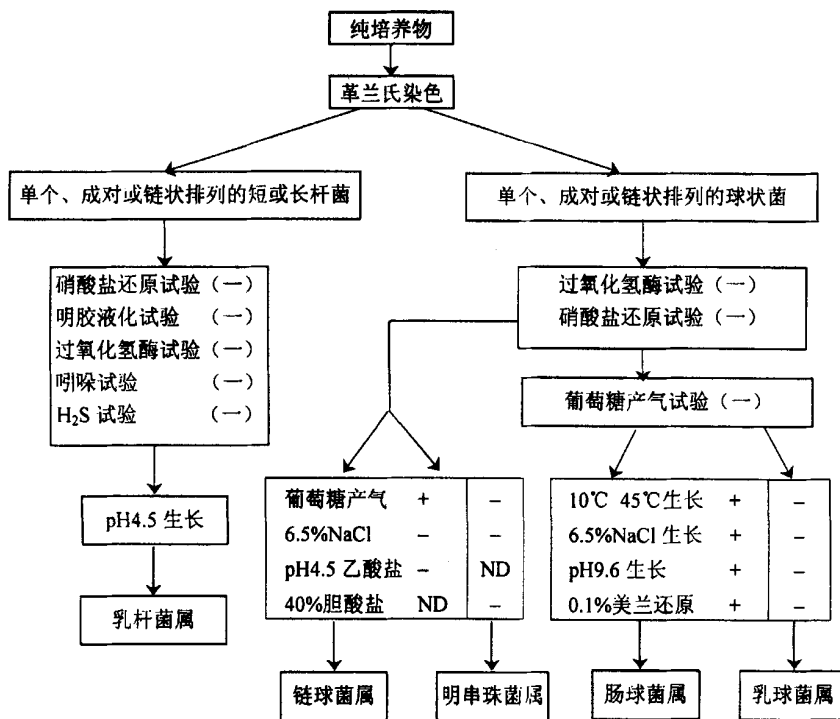


图 1 乳酸菌鉴定程序及实验项目

Fig 1 Identification procedure and testing items of lactic bacteria

11214 酵母菌的鉴定

按文献[3]的方法进行, 鉴定程序及项目见图

2.

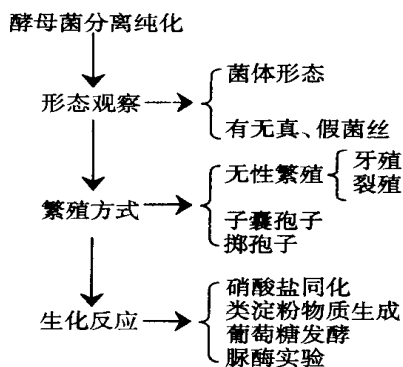


图 2 酵母菌鉴定程序及实验项目

Fig 2 Identification procedure and testing items of yeast

11215 乳酸菌的抑菌实验

对乳酸菌进行活化培养, 对培养液和菌体分别调整 pH 值, 浓缩后, 用纸片法和牛津杯法, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、李斯特菌做抑菌实验。

11216 酵母菌的抑菌实验

对分离到的酵母菌进行活化培养, 对培养液和菌体分别调整 pH 值, 蒸发酒精, 浓缩后, 同样对上述 3 种指示菌做抑菌程度实验。

2 结果与分析

211 酸马奶酒中乳酸菌的分离及归属种鉴定

根据文献[2, 4]的方法, 本研究共分离到乳酸菌 53 株。经革兰氏染色、形态观察, 首先将 53 株乳酸菌分为杆菌和球菌两大类。然后鉴定杆菌、球菌。

21111 乳酸菌球菌属种的鉴定

本项实验以嗜热连球菌(13957)和乳球菌乳酸亚种(12007)作为标准菌株对照, 对革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性的无芽胞球菌进行了鉴定。实验结果见表 1、表 2。表中 H<sub>1-1</sub> 和未列入表中的 11 株菌, 葡萄糖产气实验均为阴性, 为同型发酵的乳酸菌, 能在 615% NaCl pH418 & pH916 等环境中生长, 在 10 和 45 温度下均能生长, 而且均具有耐热性等, 实验结果符合文献[2]中所介绍的粪肠球菌的生物学特性, 因此定为粪肠球菌; 表中 H<sub>1-2</sub> 两株菌能分解葡萄糖进行异型乳酸发酵。不能在 615% NaCl pH418 & pH916 等环境中生长, 在 10 温度下生长, 在 45 温度下不生长, 但具有耐热性, 能从葡萄糖形成葡聚糖, 实验结果符合文献[4, 6]中肠膜明串珠菌葡聚糖亚种。表中 H<sub>1-3</sub> 共 3 株菌, 在 10 温度、pH916 和 pH418 生长, 具有耐热性, 但在 45 温度下, 615% NaCl 不生长。实验结果符合文献[6~8]中所介绍的乳酸乳球菌乳亚种, 因此归属于乳酸乳球菌乳亚种。表中 H<sub>1-4</sub> 共两株菌不分解葡萄糖产

气,不能在 615%NaCl pH916 的环境下生长,能在 10 和 45 温度下生长,具有耐热性,能水解精氨酸。试验结果符合文献[4]中所介绍的坚强肠球菌的生物学特性,因此归属于坚强肠球菌。表中的 H<sub>1-5</sub> 菌株呈链状,不分解葡萄糖产气,不能在 10 温度下,615%NaCl 环境中,pH916 和 pH418 环境中生长,但能在 45 温度下生长,能使 1% 美兰还原、精氨酸水解,具有耐热性,根据文献[4,6]归为链球菌属。

表 1 乳酸菌球菌属种的鉴定结果

Table 1 Results of identification on lactococcus

菌株号	H <sub>1-1</sub>	H <sub>1-2</sub>	H <sub>1-3</sub>	H <sub>1-4</sub>	H <sub>1-5</sub>
细胞形态	散在、球状	散在、球状	散在、球状	成双、椭圆	成双或链状
葡萄糖产气	-	+	-	-	-
苹果酸分解	+	-	-	-	-
10 生长	+	+	+	+	-
45 生长	+	-	-	+	+
1% 美兰还原	+	-	-	+	+
耐热性	+	+	+	+	+
615%NaCl 生长	+	-	-	-	-
pH916 生长	+	-	-	-	-
pH418 生长	+	-	+	+	-
精氨酸水解	+	-	+	+	+
明胶液化	-	-	-	-	-
葡聚糖产生	-	+	+	ö	ö

注:“+”表示有反应,“-”表示无反应

从球菌鉴定过程中发现,多数菌株既能在 10 生长,也能在 45 生长,这与标准菌株不同,分离株生长温度范围广,可能与分离乳样环境变化有关。由于牧区牧民家庭制作酸马奶酒的环境不是恒温状态,这样马奶酒中的菌逐渐适应环境,形成了这种在广泛温度范围内生长的特性。另外分离株均具有耐热性,这也是这次分离株所具有的特征。这与分离源酸马奶酒所处的环境有关,是对环境适应的结果。

21112 乳杆菌属种的鉴定

本实验以保加利亚乳杆菌德氏亚种 JCM 1002 和嗜酸乳杆菌 ATCC4356 为标准菌株对照,对革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性的无芽胞杆菌进行了鉴定,实验结果见表 3、表 4。表 3 中所列菌株和未列表中的菌株 H<sub>2-1</sub> 共 4 株菌分解葡萄糖产气,进行异型乳酸发酵。能在 15 和 45 环境中生长,实验结果符合文献[4,6]中所介绍的旧金山乳杆菌生物学特性。所以归为旧金山乳杆菌。表中 H<sub>2-2</sub> 共 8 株,H<sub>2-3</sub>, H<sub>2-4</sub> 共 5 株,H<sub>2-5</sub> 分解葡萄糖不产气,均能在 15

和 45 环境中生长,但是对 27 种糖分解利用的能力不同,结合文献[2,4,6]对乳杆菌属种特性的描述,上述 4 种菌株分别归于干酪乳杆菌干酪亚种、同型腐酒乳杆菌、夏普乳杆菌、詹氏乳杆菌。表中 H<sub>2-6</sub> 菌株分解葡萄糖产气,在 15 和 45 环境中生长,且能利用甘露糖和果糖,符合文献[4,6]中所介绍的绿色乳杆菌的生物学特性,归为绿色乳杆菌。本次研究分离到的乳杆菌在 15 和 45 均能生长。

表 2 乳酸菌球菌糖发酵实验结果

Table 2 Results of fermentation of lactococcus on sugar

糖	H <sub>1-1</sub>	H <sub>1-2</sub>	H <sub>1-3</sub>	H <sub>1-4</sub>	H <sub>1-5</sub>
阿拉伯糖	-	-	-	-	-
木糖	-	+	-	-	-
鼠李糖	-	-	-	-	-
核糖	+	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+	+
甘露糖	+	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+	+
半乳糖	+	+	+	+	+
蔗糖	-	+	-	+	-
麦芽糖	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	+	+
乳糖	+	-	+	+	+
蕈糖	+	+	+	+	+
蜜二糖	+	+	-	-	-
棉子糖	-	+	-	-	-
松本糖	-	-	-	+	-
糊精	-	+	+	+	+
淀粉	-	-	-	-	-
糖原	-	+	-	-	-
菊粉	-	-	-	-	-
甘露醇	-	-	-	+	-
山梨醇	-	+	-	+	-
肌醇	-	+	-	-	-
七叶苷	+	+	+	+	+
水杨苷	+	+	+	+	+
扁桃苷	-	+	+	+	+
α-甲基葡萄糖苷	-	+	-	-	-

表 3 乳酸菌杆菌属种的鉴定结果

Table 3 Results of identification on lactobacillus

菌株号	H <sub>2-1</sub>	H <sub>2-2</sub>	H <sub>2-3</sub>	H <sub>2-4</sub>	H <sub>2-5</sub>	H <sub>2-6</sub>
细胞形态	散在、短杆	成双、短杆	成双、短杆	成双、短杆	弯曲、长杆	散在、粗短
过氧化氢酶	-	-	-	-	-	-
葡萄糖产气	+	-	-	-	-	+
苹果酸分解	+	+	+	+	-	+
15 生长	+	+	+	+	+	+
45 生长	+	+	+	+	+	+
产乳酸特性	0157	111	0146	0126	0121	0163

注:“+”表示实验有反应,“-”表示无反应

表 4 乳杆菌属糖发酵实验结果

Table 4 Results of fermentation of lactobacillus on sugar

糖名称	H <sub>2-1</sub>	H <sub>2-2</sub>	H <sub>2-3</sub>	H <sub>2-4</sub>	H <sub>2-5</sub>	H <sub>2-6</sub>
阿拉伯糖	-	-	-	-	-	-
木糖	-	-	-	-	-	-
鼠李糖	-	-	-	-	-	-
核糖	-	+	+	-	-	-
葡萄糖	+	+	+	+	+	+
甘露糖	-	-	+	-	+	+
果糖	-	+	+	+	+	+
半乳糖	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	-	+	+	+
麦芽糖	-	-	-	+	+	+
纤维二糖	-	+	-	+	+	+
乳糖	+	+	-	+	-	+
葡萄糖	-	+	-	+	-	-
蜜二糖	-	-	-	-	-	-
棉子糖	-	-	-	-	+	-
松三糖	+	+	-	-	-	-
糊精	-	-	-	-	+	-
淀粉	-	-	-	-	-	-
糖原	-	-	-	-	-	-
菊粉	-	-	-	-	-	-
甘露醇	+	+	+	+	+	-
山梨醇	-	-	-	+	-	-
肌醇	-	-	-	-	-	-
七叶苷	-	+	+	+	-	-
水杨苷	-	+	+	+	-	-
扁桃苷	+	+	+	+	+	+
Δ <sup>2</sup> 甲基葡萄糖苷	-	-	-	-	-	-

212 酸马奶酒中酵母菌的归属鉴定

酸马奶酒中酵母菌归属鉴定结果见表 5。表中可以看出酵母菌形态有多种,多数呈椭圆形,还有圆形和柠檬形。18 株酵母菌中,H<sub>3-1</sub>共 2 株为毕赤氏酵母属,H<sub>3-2</sub>共 2 株为娄德酵母属,H<sub>3-3</sub>共 8 株为厚壁孢酵母属,H<sub>3-4</sub>共 3 株为假丝酵母属,H<sub>3-5</sub>为酒香酵母属,H<sub>3-6</sub>共 2 株为克勒克酵母属。

213 乳酸菌的抑菌实验

对分离鉴定的乳酸菌 39 株分别做了对李斯特菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌实验。20 株球菌中有 9 株有抑菌作用,其中 H<sub>1-1</sub>和 H<sub>1-2</sub>对李斯特菌抑菌作用较强,抑菌圈直径达 20 mm; 19 株杆菌中有 12 株对李斯特菌均有抑制作用。其中 H<sub>2-1</sub>抑菌作用较强,抑菌圈直径达 19 mm。见图 3。

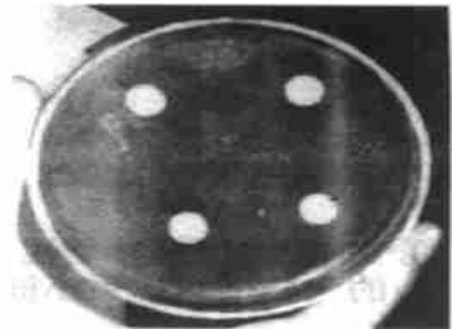


图 3 乳酸菌抑制李斯特菌

Fig 3 Photo of inhibitory effect of lactic bacteria on Listeria

39 株乳酸菌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均无抑制作用。

表 5 酵母菌归属鉴定结果

Table 5 Results of identification on yeast

菌号	H <sub>3-1</sub>	H <sub>3-2</sub>	H <sub>3-3</sub>	H <sub>3-4</sub>	H <sub>3-5</sub>	H <sub>3-6</sub>
细胞形态	椭圆 有隔 真菌丝	椭圆 有假菌丝	柠檬形 椭圆 无假菌丝	圆形 椭圆 有隔 真菌丝	椭圆 有假菌丝	椭圆 无假菌丝
繁殖特性	无性繁殖 子囊孢子 掷孢子	芽殖	芽殖	芽殖	芽殖 生长缓慢	芽殖
硝酸盐还原	-	-	-	-	-	-
类淀粉物质生成	-	-	-	-	-	-
葡萄糖发酵	+	+	+	+	+	+
脲酶	-	-	-	-	-	-

214 酵母菌的抑菌作用

18 株酵母菌有 4 株酵母菌对大肠杆菌有明显的抑制作用,形成了透明的抑菌圈,且直径在 15 mm 以上。见图 4。它们是酒香酵母属 1 株,娄德酵

母属 1 株,克勒克酵母属 1 株,厚壁孢酵母属 1 株。其中克勒克和厚壁孢酵母属的 2 株菌同时对金黄色葡萄球菌也有一定抑制作用,但是抑菌圈并不完全透明,圈内还有菌落生长,涂片革兰氏染色镜检

内、外两种菌形态完全一致, 经分析, 可能是该金黄色葡萄球菌表现出了较强的抗性。18 株酵母菌对李斯特菌无抑制作用。



图 4 酵母菌抑制大肠杆菌

Fig. 4 Photo of inhibitory effect of yeast on *E. coli*

从酸马奶酒中分离得到的乳酸菌和酵母菌对 3 种指试菌的单发酵抑菌试验, 得到初步的抑菌特性, 是什么物质起抑菌作用和进一步分离提纯有待研究。

### 3 结 论

1) 研究酸马奶酒中的微生物, 发现酸马奶酒是多种乳酸菌和酵母菌共同发酵的含酒精乳饮料。

2) 从内蒙古锡盟不同地区采集的 15 份酸马奶酒中共分离到 53 株乳酸菌, 经纯化、鉴定, 有 20 株是乳酸菌球菌, 分别是粪肠球菌 11 株; 肠膜明串珠菌葡聚糖亚种 2 株; 乳酸乳球菌乳亚种 3 株; 坚强肠球菌 2 株; 链球菌属 2 株。

3) 酸马奶酒中乳酸菌杆菌有 19 株, 分别归为 6

个属种, 其中旧金山乳杆菌 4 株; 干酪乳杆菌干酪亚种 8 株; 同型腐酒乳杆菌 1 株; 夏普乳杆菌 5 株; 詹氏乳杆菌 1 株。

4) 酸马奶酒中分离的乳酸菌球菌 9 株, 杆菌 12 株, 对李斯特菌有抑菌作用, 抑菌圈直径高达 20 mm。对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均无抑制作用。

5) 酸马奶酒中分离得到的酵母菌中有 4 株对大肠杆菌有明显抑菌作用, 直径在 10 mm 以上, 其中有 2 株同时对金黄色葡萄球菌有抑制作用。酵母菌对李斯特菌无抑制作用。

### [参 考 文 献]

- [1] 关加怀. 马奶及马奶酒的医疗作用[J]. 中国畜产与食品, 1998, 2: 87~ 88
- [2] 内村泰等. 乳酸菌实验法——分离から同定まで(日文版)[M]. 朝仓书店, 1992 1~ 270
- [3] 荷·亚罗等. 酵母菌特性及鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1992 1~ 210
- [4] 杨洁彬等. 乳酸菌[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999 1~ 83
- [5] 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 301~ 383
- [6] McKay L L, et al. Applied Environmental Microbiology[M]. 1978, 36: 360~ 367.
- [7] Peter H A. Sneath, bergey's manual of systematic bacteriology[M]. Williams & Wilkins, Section 12~ 16, 1986
- [8] Schleifer K H, et al. System Appl Microbiol[M]. 1991, 14: 386

## Isolation, Identification and Anti-Bacteria Function of Microorganism s From Koumiss

He Yinfeng, Li Shaoying, Mu Zhishen, Wang Liyun, Shuang Jie, Wu Jing, Zhao Meixia

(Department of Food Science and Engineering, Inner Mongolia University of Agriculture, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** The koumiss is a kind of fermented milk drink by multi-microorganisms. Microorganisms are isolated from 15 koumiss samples of pastoral area in Xilin Guole. According to the morphological characteristics and biochemical reaction and sugar fermentation characteristics, they respectively belonged to Lactococcus 5 genus, Lactobacillus 6 genus, yeasts 6 genus. It is also found that some microorganisms have inhibitory effect on the growth of Listeria, S. aureus and E. coli. Nine strains of Lactococcus and 12 strains of Lactobacillus have the inhibitory effect on Listeria, but do not have the inhibitory effect on E. coli and S. aureus. Four strains of yeasts have the inhibitory effect on E. coli, two strains of them have the inhibitory effect of S. aureus, meanwhile, but do not have the inhibitory effect on the Listeria.

**Key words:** koumiss; microorganism isolation and identification; inhibitory effect on bacteria