

## 乳品发酵菌种的选择性计数方法的研究\*

解楠<sup>1</sup>, 何卫加<sup>2</sup>, 陈平<sup>2</sup>, 霍贵成<sup>1</sup>

1(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨, 150030)

2(丹尼斯克(中国)有限公司, 江苏昆山, 215300)

**摘要** 研究了菌株间的差异, 通过改变现有商业培养基的培养条件, 如培养温度、时间、pH、添加不同的抗生素等, 共选择 12 种培养基对保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌等 12 株发酵菌种进行了选择性的计数。

**关键词** 乳品发酵剂, 选择性计数, 培养基

常用的乳品发酵剂主要是产生乳酸的细菌如乳酸菌和双歧杆菌等, 其中很多是益生菌<sup>[1]</sup>, 对机体有多种其他正常生理菌群无法比拟的生理作用, 如调整肠道菌群、提高蛋白质和维生素的代谢、防止便秘、缓解乳糖不耐症、抗肿瘤、增强免疫系统、降低胆固醇等<sup>[2]</sup>。

评价发酵乳制品的一个重要的依据就是产品中活性发酵剂菌种的数量, 同时这也是研究益生菌的一个重要方面<sup>[3]</sup>。目前, 国际上没有各种乳品发酵菌种选择性计数培养基的标准, 本文在已有的商业应用培养基如 MRS 琼脂、RCM 琼脂等基础上, 通过改变不同的培养条件(如温度、时间、pH 值、添加不同的抗生素)来改良培养基, 对保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌等 12 株发酵菌种进行了选择性的计数。

## 1 材料和方法

## 1.1 基础培养基及试剂

MRS 琼脂培养基(德国 Merck 公司), M17 琼脂培养基(德国 Difco 公司), RCM 琼脂培养基(德国 BD 公司)。

试剂:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 无水乙酸钠, 柠檬酸铵,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Tween-80, 丙酮酸钠, 甘氨酸, NaCl, NaOH,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 乳酸钠, 氯化锂, 茶啉酮酸, 硫酸新霉素, 硫酸巴仑霉素, 万古霉素, 氯洁霉素等(国产); 蛋白胨, 酵母提取物, 胰水解酪蛋白, 琼脂, 酸水解酪蛋白, 盐酸半胱氨酸, 牛肉膏均为生化试剂(进口)。

## 1.2 溶液配制

(1) 盐酸半胱氨酸溶液: 配制 5% 的盐酸半胱氨酸溶液, 121℃ 灭菌 15 min;

(2) NNLP 溶液<sup>[4]</sup>: 氯化锂 6.000g; 茶啉酮酸 0.300g; 硫酸新霉素 0.200g; 硫酸巴仑霉素 0.250g, 蒸馏水 100 mL, 溶解后膜过滤除菌, 并避光冷藏保存;

(3) 万古霉素溶液: 准确称取 0.010g 万古霉素溶解到 100 mL 蒸馏水中, 膜过滤除菌, 冷藏保存;

(4) 氯洁霉素溶液: 准确称量 0.010g 氯洁霉素溶解到 200 mL 蒸馏水中, 膜过滤除菌, 冷藏保存;

(5) 1.0M NaOH 和 HCl 溶液;

(6) 稀释液生理盐水<sup>[5]</sup>: 称取 8.5g NaCl 和 1.0g 蛋白胨溶解到 1000 mL 蒸馏水中, 121℃ 灭菌 15 min; 双歧杆菌的稀释液<sup>[5]</sup>: 称取 8.5g NaCl, 0.5g 盐酸半胱氨酸和 1.0g 蛋白胨溶解到 1000 mL 蒸馏水中, 121℃ 灭菌 15 min。

## 1.3 改良培养基

表 1 改良培养基的配制方法

培养基	基础培养基	改良方法
MRS-5.4 琼脂	MRS 琼脂	调整 pH 值至 5.4, 121℃ 灭菌 15 min
MRS-5.2 琼脂	MRS 琼脂	调整 pH 值至 5.2, 121℃ 灭菌 15 min
MRS-4.58 琼脂	MRS 琼脂	调整 pH 值至 4.58, 121℃ 灭菌 15 min
MRS- vancomycin 琼脂 <sup>[6]</sup> (MRS-V 琼脂)	MRS 琼脂	灭菌后冷却至 50℃ 左右, 加入(3)溶液, 使万古霉素最终浓度达到 1mg/L
MRS- Clindamycin 琼脂(MRS-C 琼脂)	MRS 琼脂	灭菌后冷却至 50℃ 左右, 加入(4)溶液, 使氯洁霉素最终浓度达到 2mg/L
RCM-5.3 琼脂	RCM 琼脂	调整 pH 值至 5.3, 121℃ 灭菌 15 min
RCM-NNLP 琼脂 <sup>[6]</sup>	RCM 琼脂	灭菌后冷却至 50℃ 左右, 加入 5 mL (2) 溶液于 100 mL 培养基中

第一作者: 硕士研究生。

\* 此项目由丹尼斯克(中国)有限公司资助

收稿日期: 2007-06-21, 改回日期: 2007-09-03

1.4 自制培养基

(1) Lc-琼脂<sup>[7]</sup>: 蛋白胨 10.0g, 酵母提取物 1.0g, 牛肉膏 4.0g, 酸水解酪蛋白 1.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0g, 无水乙酸钠 3.0g, 柠檬酸铵 1.0g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2.0g, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.05g, Tween-80 1.0g, 琼脂 12.0g, 蒸馏水 1000 mL, 调整 pH 6.2±0.2, 121℃ 灭菌 15 min。

(2) NaLa-琼脂<sup>[8]</sup>(乳酸钠琼脂): 胰酶解酪蛋白 10.0g, 酵母提取物 10.0g, 丙酮酸钠 2.0g, 甘氨酸 2.0g, NaCl 1.5g, Tween-80 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25g, 琼脂 12.0g, 蒸馏水 1000 mL, 调整 pH 至 7.0±0.2, 加入 16.7g 的 60% 的乳酸钠溶液, 121℃ 灭菌 15 min。

1.5 菌株

表 2 实验中选择菌株<sup>1)</sup>

菌株名称	缩写	实验菌株
保加利亚乳杆菌( <i>Lactobacillus bulgaricus</i> )	LB	Lb340、Lb64
嗜热链球菌( <i>Streptococcus thermophilus</i> )	ST	St21、TA045
嗜酸乳杆菌( <i>Lactobacillus acidophilus</i> )	LA	NCFM、La14
双歧杆菌( <i>Bifidobacteria</i> )	BB	Bi07、Bb420
干酪乳杆菌( <i>Lactobacillus casei</i> )	LC	Lc11
鼠李糖乳杆菌( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	LR	Lr32
副干酪乳杆菌( <i>Lactobacillus parcasei</i> )	LPC	Lpc37
丙酸杆菌( <i>Propionibacteria</i> )	PB	Ps01

注: 由丹尼斯克(中国)有限公司提供。

1.6 主要仪器设备

表 3 各种培养基上计数结果 lg cfu/mL

	MRS <sup>1)</sup> 37℃厌氧 72h	MRS-5.4 25℃需氧 72h	MRS-5.2 43℃厌氧 72h	MRS-4.58 43℃厌氧 72h	RCM-5.3 43℃厌氧 72h	LC-agar 27℃厌氧 72h	MRS-V 37℃厌氧 48h	MRS-V 37℃厌氧 72h	MRS-V 43℃厌氧 48h	MRS-V 43℃厌氧 72h	MRS-C 37℃厌氧 48h	RCA-NNLP 37℃厌氧 72h	M17 37℃需氧 24h	NaLa- Agar <sup>2)</sup> 30℃厌氧 7~9d
Lb340	9.394	<3.00	9.126	<3.00	8.825	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00
Lb64	10.223	<3.00	10.050	9.568	9.749	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	7.778	<3.00	<3.00	<3.00
Lc11	10.633	<3.00	<3.00	10.511	10.517	10.623	<3.00	10.681	<3.00	10.450	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00
Lpc37	10.763	10.839	<3.00	10.609	<3.00	10.991	10.740	10.740	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00
La14	11.292	<3.00	10.032	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	11.143	<3.00	<3.00	<3.00
NCFM	10.122	<3.00	9.142	9.959	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	9.985	<3.00	<3.00	<3.00
Lr32	10.708	<3.00	9.734	10.423	10.681	9.924	10.677	10.677	10.756	10.756	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00
Ps01	9.980	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	9.985
St21	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	12.403	<3.00
TA045	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	11.744	<3.00
Bi07	9.519	<3.00	<3.00	<3.00	9.477	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	9.512	<3.00	<3.00
Bb420	5.130	<3.00	<3.00	<3.00	5.114	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	5.097	<3.00	<3.00

注: 1) 除 Lc-琼脂和 NaLa-琼脂外, 其他厌氧培养基中都加入了(1)溶液, 使盐酸半胱氨酸在溶液的最终浓度为 0.05%, 以提高厌氧效果。

2) 如存在其他的乳酸菌, 在 NaLa-琼脂 30℃厌氧培养 7~9d 的计数结果减去 72h 的计数结果。

LB 最适生长温度在 40~45℃, 可以耐受一定的酸性环境<sup>[9]</sup>。比较实验中 LB 能够生长的 5 种培养基, 其中在 MRS-4.58 琼脂和 MRS-C 琼脂上, 2 株 LB 只有 1 株能够形成菌落, 在 RCM-5.3 琼脂上菌落数量只有 MRS-5.2 琼脂的 50%, 且菌落大小不一

厌氧培养设备(德国 Merck 公司)、HVE-50 型高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司)、膜过滤装置(国产)、自动菌落计数器(YLN-30A)等。

1.7 计数方法

采取倾注平板方法, 选取合适的稀释度, 每个稀释度做 3 次重复并取平均值, 平板上菌落在 25~250 之间计数。

2 结果与讨论

由表 3 可以看出, M17 琼脂在 37℃ 下需氧培养 24h 时只有 ST 形成菌落, 大小在 0.5~1 mm (由电子游标卡尺测量, 精度为 0.1 mm)、圆盘型、白色, 因此 M17 琼脂可以作为 ST 的选择性计数培养基。

除 ST 外, 所有的乳杆菌都可以在 MRS 琼脂上生长, 因此可以作为单株乳杆菌的计数培养基, 但不能选择性计数。

细菌对抗生素敏感性不同为选择性计数提供了依据。RCM-NNLP 琼脂培养基可以抑制除 BB 外的所有菌株生长, 只有 BB 形成大约 1 mm 圆形、湿润、有光泽、边缘整齐、白色菌落。通过 MRS-C 琼脂培养基对 LA 选择计数, 形成的菌落通常是粗糙、不规则的形状, 大小在 0.1~0.5 mm。

致, 不易计数。只有在 MRS-5.2 琼脂上 2 株菌形成圆形、白色、边缘粗糙, 类似于棉花团状的菌落, 大小为 1.5~2.0 mm。即 MRS-5.2 琼脂 43℃ 培养 48h 可以作为计数 LB 的培养基, 如存在 LA 和 LR 可以将其数量减去。

LC、LR 和 LPC 都分类在干酪乳杆菌属<sup>[10]</sup>, 只有根据菌株间细微差别才可以选择性的计数。MRS-V 琼脂 43℃ 厌氧 48h 时只有 LR 形成直径 1.5~2.5 mm 之间圆形菌落; 当继续培养到 72h 时, LC 形成和 LR 相似的菌落形态, 其他菌株都不能形成菌落。因此, MRS-V 琼脂 43℃ 厌氧 48h 计数 LR, 72h 计数 LR、LC 的总和。而 MRS-V 琼脂 37℃ 厌氧条件下, 48h 计数 LR、LPC 之和; 当培养至 72h, LC 形成可见菌落, 此时可以计算 72h 和 48h 的菌数差来计数 LC。LPC 生长对氧气和温度的要求不严格, 可在 MRS-5.4 琼脂等 5 个培养基上生长, 但只有 MRS-5.4 琼脂 25℃ 需氧 72h 下, 可以区分 LPC 和其他菌株 (LR 菌落极小, 易于区分), 如果继续培养, 大约 84h LC

和 LR 也可以形成相似的菌落 (数据在表中没有列出)。LC-琼脂 27℃ 厌氧培养 72h 可计数 LC、LR 和 LPC, 都形成 1.0~1.5 mm 大小、圆形、光亮、白色的相似菌落, 可以作为单株菌的计数培养基。但目前 LC-琼脂没有商业产品。

NaLa-琼脂是根据细菌对碳源需求不同而配制的培养基, 前 72h 厌氧培养过程中, 如存在其他的乳酸菌则会形成 0.1~0.5 mm 的菌落, 由于 PB 的生长较慢, NaLa-琼脂 30℃ 厌氧培养 7~9d 时, 能够形成 1.5~3.0 mm、圆形、边缘整齐、表面光滑、乳白色的菌落, 易于辨认并计数。各菌株选用的培养基、培养条件及菌落大小形态见表 4。

表 4 选择性计数培养基及菌落形态

菌株	培养基名称	培养条件	大小	菌落形态
ST	M17 琼脂	需氧, 37℃, 24h	0.1~0.5 mm	圆形, 边缘光滑, 白色
BB	RCM-NNLP 琼脂	厌氧, 37℃, 72h	大约 1.0 mm	圆形, 平滑的, 白色
LR	MRS-vancomycine 琼脂	厌氧, 43℃, 48h	1.5~2.5 mm	圆形, 平滑的、光亮的, 白色
LPC	MRS-5.4 琼脂	需氧, 25℃, 72h	0.5~1.0 mm	圆形, 光亮的、边缘光滑, 白色
LC	MRS-vancomycine 琼脂	厌氧, 37℃, 72h	大约 1 mm	圆形, 光滑的、光亮的, 白色
LB	MRS-5.2 琼脂	厌氧, 43℃, 48h	1.5~2.0 mm	圆形, 周围粗糙的, 棉花状的, 白色
PB	NaLa-琼脂 <sup>1)</sup>	厌氧, 30℃, 7~9d	1.5~3.0 mm	圆形的, 边缘光亮的, 光滑的, 乳白色
LA	MRS-Clindamycin 琼脂	厌氧, 37℃, 48h	0.5~1.0 mm	不规则的, 周围粗糙, 钝的, 白色

注: 1) 如存在其他的乳酸菌, 在 NaLa-琼脂 30℃ 厌氧培养 7~9d 的计数结果减去 72h 的计数结果。

### 3 产品中益生菌的选择性计数

应用上述部分菌株制成 6 种不同产品, 包括发酵酸

乳和益生菌混合制剂等, 并对其中含有的菌株利用上述培养基进行选择计数。结果表明, 实际测得的菌数和实验设计菌数值较接近 (见表 5), 上述方法可行。

表 5 产品中菌株选择性计数结果 Lg cfu/mL

产品	设计菌株	测定菌株							
		LB	ST	LA	BB	LC	LR	LPC	PB
产品 1 (原味酸奶)	LB, ST	6.80	8.88	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00
产品 2 (原味 ABT 酸奶)	ST, BB, LA	<3.00	8.84	5.73	5.68	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00
产品 3 (含保释菌种酸奶)	LB, ST, LPC, PS	6.79	8.39	<3.00	<3.00	<3.00	<3.00	6.85	6.70
产品 4 (原味益生菌酸奶)	LB, ST, LR	6.75	9.16	<3.00	<3.00	<3.00	6.67	<3.00	<3.00
产品 5 (含益生菌保健品)	LA, LC, BB, LR	<3.00	<3.00	10.62	10.76	10.68	<3.00	<3.00	<3.00
产品 6 (含益生菌保健品)	LB, ST, LA, LC, BB	9.39	9.76	9.89	8.91	9.98	<3.00	<3.00	<3.00

### 4 结 论

通过研究菌株间性质的差异, 在商业培养基基础上改变温度、时间、pH 及添加不同抗生素等培养条件能够对一些乳品发酵菌种进行选择计数。依据目前实验菌株及培养基可以得出: M17 琼脂培养基 37℃ 需氧培养 24h 只能计数嗜热链球菌; RCM-NNLP 琼脂培养基 37℃ 厌氧培养 72h 计数双歧杆菌; MRS 氯洁霉素琼脂培养基 37℃ 厌氧培养 48h 可以计数嗜酸乳杆菌; MRS 万古霉素琼脂培养基 43℃

厌氧培养 48h 可以计数鼠李糖乳杆菌; MRS 万古霉素琼脂培养基 37℃ 厌氧培养 72h 可以计数干酪乳杆菌; MRS pH5.4 琼脂培养基 25℃ 需氧 72h 可以计数副干酪乳杆菌; MRS pH5.2 琼脂培养基 43℃ 厌氧培养 72h 可以计数保加利亚乳杆菌; 乳酸钠琼脂培养基 30℃ 厌氧培养 7~9d 可以计数丙酸杆菌。

### 参 考 文 献

- Shortt C. The probiotics century: historical and current perspectives [J]. Trends in Food Science & Technology,

- 1999,10; 411~417
- 2 Holzapfel W H, Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics [J]. Food Research International, 2002,35;109~116
  - 3 Analie Lourens Hattingh, Bennie C Viljoen. Yogurt as probiotics carrier food [J]. International Dairy Journal, 2001(11);1~17
  - 4 Ghoddussi H B, Robinson R K. Enumeration of starter cultures in fermented milks [J]. Dairy Res, 1996,63;151~158
  - 5 Roy D. Review: Media for the isolation and enumeration of *bifidobacteria* in dairy product [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001,69;167~182
  - 6 Dave R I, Shan N P. Evaluation of media for Selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria* [J]. J Dairy Sci,1996,79;1 524~1 536
  - 7 Ravula R R, Shah N P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurt and fermented milk drinks [J]. Biotechnol Tech,1998,(12);819~822
  - 8 Tharmaraj N, Shah N P. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*[J]. J Dairy Sci, 2003,86;2 288~2 296
  - 9 凌代文主编. 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. 6~7
  - 10 布坎南 R E, 吉本斯 N E 编. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社,1984. 807~808

## Study on the Methods for Selective Enumeration of Dairy Culture Strains

Xie Nan<sup>1</sup>, He Weijia<sup>2</sup>, Chen Ping<sup>2</sup>, Huo Guicheng<sup>1</sup>

1(Key Laboratory of Dairy Science of Education Ministry ,Northeast Agriculture University,  
Harbin 150030, China) 2(Danisco (China) Co. ,Ltd. Kunshan 215300,China)

**ABSTRACT** As of recent, uniform standard methods for selective enumeration of dairy culture strains is not available. The differences between strains were studied. By improving culture conditions, for example incubation temperature, time, pH value, and adding different antibiotics, 12 commercial media were selected for selective enumeration of 12 dairy culture strains, including *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*.

**Key words** dairy culture strains, selective enumeration, media

信息窗

### 生姜精油将带动我国食品调味料发展

20 世纪以后,中国不仅是生姜的主产国之一,也渐成为生姜的主要出口国之一,平均年产生姜超过 15.2 万 t,年出口量约 6.7 万 t,占世界总出口量的 40%。但生姜的贮藏较难,易腐烂变质,因此每到收获季节,产区生姜损失很大。迄今为止,生姜的贸易主体仍是干姜,生姜食用多作普通调味料,在我国一直以原姜或姜粉为主,利用率极低。

近年来,随着人们自身保健意识的增强,日益强调食品原料及添加剂的天然性与健康性,使得人们再度关注生姜这一药食兼用的食品资源,并以科学手段考察它在保健、预防、治疗慢性疾病方面的功效。而且,随着食品加工技术的进步,运用现代工艺技术提取生姜制成的生姜精油等深加工产品,作为高品质、高价值的贸易品越来越受到食品工业的推崇,在国外发展迅速,已逐渐成为食品工业的主要原料之一,而它在我国的应用才刚刚起步。

因此,加强生姜精油等精深加工产品的研究开发,可以充分利用生姜的有效成分,提高其利用价值,推动我国食品调味料和相关的食品加工业朝着深加工、方便化、天然健康的方向发展,与国际接轨。通过现代生化及药理技术发现的生姜精油中特定功效成分,不仅为传统中医学治疗实践提供了理论依据,更为宝贵的传统中药走向世界市场打开了大门。这些都赋予了生姜利用新的内容 & 意义,并将为生姜资源的利用开辟无限广阔的前景。

生姜作为中国和亚洲最重要的根茎类香辛调味蔬菜和传统的中药材,积累了丰富的(食用和药用)实践经验,随着现代科学技术的进步,必将使我国生姜的综合开发、利用与深加工研究更上一层楼,并带动我国食品调味料和相关的食品加工业达到国际水平。