

文章编号:1673-1689(2008)03-0073-06

干酪乳杆菌抑制大豆奶酪中的金黄色葡萄球菌 和枯草芽孢杆菌

刘冬梅, 吴晖, 李理, 许喜林

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 干酪乳杆菌 LCR 719 的培养上清液能很好抑制 *S. aureus* 和 *B. subtilis*。在 10 ℃ 下贮藏时, 接入 LCR 719 的大豆奶酪可使 *S. aureus* 的菌数降低至原来的 1/10~1/100, 使 *B. subtilis* 的菌数降低至原来的 1/10 以下。在 30 ℃ 下贮藏时, 接入 LCR 719 的大豆奶酪可抑制 *S. aureus* 和 *B. subtilis* 的生长。结果表明, LCR 719 能用作大豆奶酪生产的潜在保护性菌种。

关键词: 干酪乳杆菌鼠李糖亚种; 抑制; 大豆奶酪; 金黄色葡萄球菌; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Inhibition on *S. aureus* and *B. subtilis* in Soy Cheese by *Lactobacillus casei*

LIU Dong-mei, WU Hui, LI Li, XU Xi-lin

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The culture supernatants of *Lactobacillus casei* LCR 719 showed that good inhibitory activity on *S. aureus* and *B. subtilis*. The numbers of *S. aureus* decreased by 10~100 times in soy cheese inoculated with LCR 719 during storage at 10 ℃, and the numbers of *B. subtilis* decreased by more than 10 times. *S. aureus* and *B. subtilis* were also inhibited in such soy cheese during storage at 30 ℃. These results showed that LCR 719 could be used as a potential protective culture in soy cheese production.

Key words: *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*; inhibition; soy cheese; *S. aureus*; *B. subtilis*

近年来益生菌的研究与应用为发酵食品带来了新的契机, 在食品(例如香肠、奶酪和蔬菜)中引入益生菌, 不仅可以使食品发酵, 而且还给食品带来益生功能。所使用的益生菌, 除了产生抑菌的有机酸外, 还可通过产生抗菌肽等抑菌物质起到抑制不良微生物的作用^[1-2]。研究表明, *Lactobacillus*

casei rhamnosus 有许多健康功效, 如抑菌活性、抗癌活性以及降低胆固醇的作用^[3-4]。将益生菌用于乳制品、酸奶及奶酪的抑菌已有许多研究^[5-7]。作者的前期研究发现, *Lactobacillus casei rhamnosus* LCR 719 有较好的抑菌作用^[8], 将该菌用于大豆奶酪的发酵, 研究该菌对 *S. aureus* 和 *B. subtilis* 的抑制作用,

收稿日期: 2007-07-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目(20676042); 广东省科技攻关项目(2005B10401006).

作者简介: 刘冬梅(1971-), 女, 江西兴国人, 工学博士, 讲师, 主要从事食品质量与安全方面的研究.

Email: liudm@scut.edu.cn

以期部分解决大豆奶酪的贮存保鲜的难题。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* LCR 719, 由华南理工大学轻工与食品学院食品安全教研室从菌株 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 6013(简称 LCR 6013)驯化而得;金黄色葡萄菌(*S. aureus* ATCC 25923)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis* ATCC 6633), 由作者所在教研室保存。大豆奶酪细菌 DH1、GH4 由华南理工大学食物蛋白质工程研究中心从腐乳中分离保存;德氏乳杆菌保加利亚亚种 AS1. 1482 (*Lactobacillus deldrueckii* subsp. *bulgaricus*)、乳酸链球菌 GIM1. 156 (*Streptococcus lactis*) 由广东省微生物研究所菌藏中心提供。

1.1.2 主要试剂 蛋白胨、酵母粉、牛肉浸膏(广东环凯微生物科技有限公司产品);大豆(山东出品);葡萄糖(生化试剂,广州市化学试剂厂产品);其它常用试剂为市售分析纯;3 M 金黄色葡萄球菌快速检测片及确认片(美国 3M 公司提供);卵黄多粘菌素甘露醇琼脂培养基(MYP)(广东环凯微生物科技有限公司产品)。

1.1.3 主要仪器设备 PYX-190S-A 生化培养箱(科力电器公司产品);SW-CJ-1C 超净工作台(苏州净化设备厂产品);牛津杯,内径 6.0 mm,外径 7.8 mm,高 10.0 mm(天津出品);TDL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂产品);DSC-T1 型索尼数码相机(Sony 公司产品)。

1.1.4 培养基及培养条件

1)MRS 固体培养基:蛋白胨 10.0 g, 酵母提取

物 5.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 柠檬酸二铵 2.0 g, 硫酸镁 0.58 g, 牛肉膏 10.0 g, 磷酸氢二钾 2.0 g, 硫酸锰 0.25 g, 乙酸钠 5.0 g, Tween 80 1 mL, 蒸馏水 1 000 mL, 琼脂粉 20.0 g;调 pH 6.5, 121 °C 灭菌 15 min, 用于保存 LCR 719。MRS 液体培养基:不加琼脂, 又称初始培养基, 用于培养 LCR 719。

2)肉汤平板培养基:营养肉汤粉 18.0 g, 琼脂粉末 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL; 121 °C 灭菌 15 min, 用于细菌的抑菌。

3)厌氧培养条件:在干燥器中按 100 mL 体积加 1 g 焦性没食子酸的比例, 加入 5 mL 2.5 mol/L 的 NaOH 溶液, 使其接触发生吸氧反应。事先放置的厌氧度指示剂显示无色, 为厌氧状态。

4)初始培养条件:培养温度 37 °C, 培养时间为 24 h, 厌氧静止培养。

1.2 实验方法

1.2.1 抑菌试验 培养一定时间的菌悬液于 90~95 °C 灭菌 15 min, 然后在 8 000 r/min 条件下离心 20 min, 按文献[8]进行抑菌实验, 用液体培养基 MRS 作空白对照。

1.2.2 制备大豆奶酪 豆奶于 121 °C 灭菌 20 min, 冷却至 37 °C, 每 800 mL 豆奶接入 40 mL 发酵剂、*S. aureus* 和 *B. subtilis*, 见表 1。37 °C 静止发酵 6 h, 入模和排乳清, 经 12 h 压榨成型, 用大豆奶酪质量的 3.0% 的 NaCl 均匀涂抹于奶酪表面, 将大豆奶酪切成 2 cm×2 cm×1 cm 的方块, 进行真空包装, 置于 10 °C 和 30 °C 贮藏, 间隔 0、10、20、30、40、50、60 d 后取样检测 *S. aureus* 和 *B. subtilis*、水分活度和水份。

表 1 接入奶酪中的菌种及接种量

Tab. 1 Inoculation level in soy cheese

编号	各菌种接种量					
	DH1	GIM1. 156	LCR 719	AS1. 1482	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
C ₁	20 mL	20 mL			10 ² 个/mL*	
C ₂	20 mL	20 mL			10 ⁴ 个/mL	
C ₃	20 mL	20 mL				10 ² 个/mL
C ₄	20 mL	20 mL				10 ⁴ 个/mL
A	13.5 mL	13.5 mL	13.5 mL		10 ² 个/mL	
B	13.5 mL	13.5 mL	13.5 mL		10 ⁴ 个/mL	
C	13.5 mL	13.5 mL		13.5 mL	10 ² 个/mL	
D	13.5 mL	13.5 mL		13.5 mL	10 ⁴ 个/mL	
E	13.5 mL	13.5 mL	13.5 mL			10 ² 个/mL
F	13.5 mL	13.5 mL	13.5 mL			10 ⁴ 个/mL
G	13.5 mL	13.5 mL		13.5 mL		10 ² 个/mL
H	13.5 mL	13.5 mL		13.5 mL		10 ⁴ 个/mL

*表示每毫升豆奶中有 100 个有害菌, 其它类同。

1.2.3 *S. aureus* 的检测 利用美国 3M 公司的快速检测片,检测方法原理参照文献[9],以无菌操作将大豆奶酪样品 10 g 分散于 100.0 g 的无菌水中,再用 0.9 g/dL 生理盐水适当稀释,取 1 mL 于检测片上。

1.2.4 *B. subtilis* 的检测 用卵黄多粘菌素甘露醇琼脂培养基(MYP),检测步骤:称取本品 46.0 g,加入去离子水 1 L,搅拌加热,煮沸至完全溶解,分装于三角瓶中,每瓶 100 mL,121 °C 灭菌 15 min;用时加热溶化琼脂,冷至 50 °C 后,每 100 mL 培养基加入 50.0% 卵黄液 5 mL 和多粘菌素 B 10 000 IU,混匀后倾注培养皿;将大豆奶酪样品 10 g 分散于 100.0 g 的无菌水中,用 0.9 g/dL 生理盐水作适当稀释;取各稀释液 0.1 mL 均匀涂布到 MYP 琼脂平板,每个稀释度重复一次;将平板置于 (37±1) °C 培养箱中培养 12~20 h;计算同一稀释度两个平板的平均菌落数,*B. subtilis* 在 MYP 平板上生成的菌落为粉红色。

2 结果与讨论

2.1 LCR 719 在 MRS 中的培养上清液对 *S. aureus* 和 *B. subtilis* 的抑制

如图 1 所示,LCR 719 在 MRS 中培养 42 h 后的上清液对 *S. aureus* 和 *B. subtilis* 有很好的抑菌效果。将该菌接种到大豆奶酪中,进行抑菌作用研究。

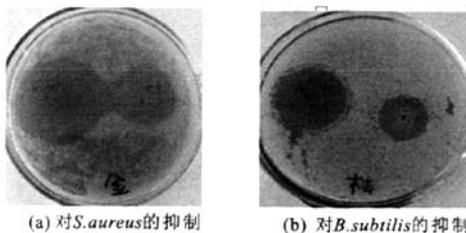


图 1 LCR 719 在 MRS 中的培养上清液对 *S. aureus* 和 *B. subtilis* 的抑制

Fig. 1 Inhibition of *S. aureus* and *B. subtilis* by culture supernatants of LCR 719 in MRS

2.2 LCR 719 在大豆奶酪中对 *S. aureus* 的抑制

2.2.1 *S. aureus* 的典型菌落特征 将纯种 *S. aureus* 用无菌生理盐水作适当稀释后,吸取 1 mL 滴加在 3 M 检测片上,置于 37 °C 培养 24~48 h,观察蓝绿色菌落并计数,见图 2。

从图 3 可以看出,接入 LCR 719 + DH₁ + GIM1.156 的豆奶及凝乳的 pH 值在 6 h 发酵后降

低到 4.7,而且降低的速率明显快于接入 AS1.1482 + DH₁ + GIM1.156 菌和单独接入 DH₁ + GIM1.156 的对照组。发酵 6 h 后,接入 AS1.1482 菌和对照组的 pH 值分别下降到 5.2 和 5.3。可以看出,接入 LCR 719 菌可使豆奶快速酸化并使豆奶凝乳。

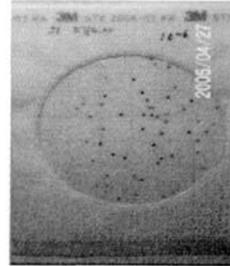


图 2 *S. aureus* 在 3M 上的菌落形态

Fig. 2 Colonial morphology of *S. aureus* on 3 M medium

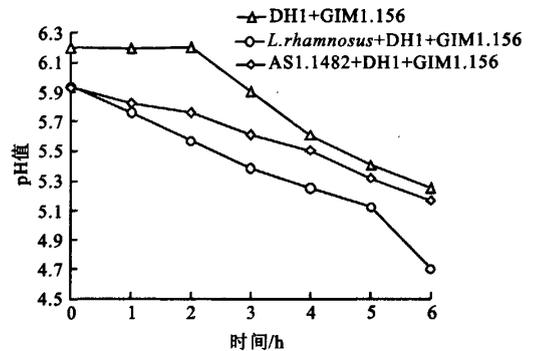
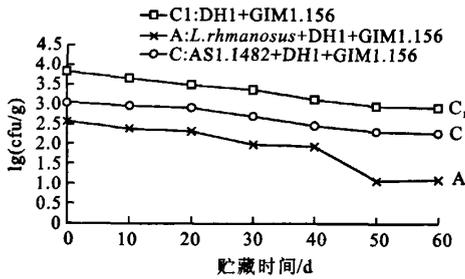
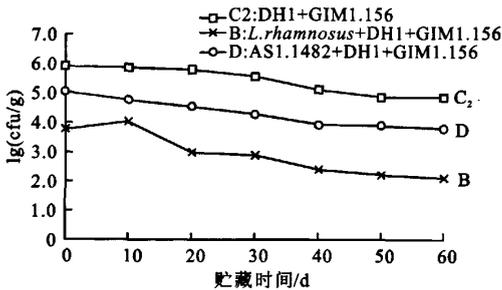


图 3 大豆奶酪发酵过程中 pH 值的变化

Fig. 3 pH during soy cheese fermentation

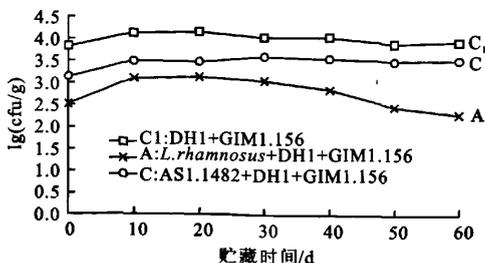
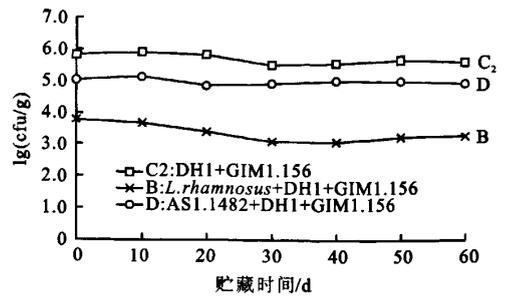
2.2.2 10 °C 贮存对 *S. aureus* 的抑制 按照方法 1.2.2 制成的奶酪置于 10 °C 贮藏不同时间后,取样检测 *S. aureus*,结果见图 4。当 *S. aureus* 的接种量为 10² cfu/mL 时,从图 4(a)可以看出,*S. aureus* 在 60 d 贮藏过程都在下降,接种了 LCR 719 组(A) *S. aureus* 下降幅度最大,*S. aureus* 的对数从 2.5 下降到 1.1,降低了 1.4。接种 AS1.1482 组(C)的与(A)的组比较,下降幅度没有这么大,*S. aureus* 的活菌数的对数从 3.0 下降到 2.3,下降了 0.7。而对照组(C₁)的从 3.8 下降到 2.9,只下降了 0.9。

当 *S. aureus* 的接种量为 10⁴ cfu/mL 时,从图 4(b)可以看出,*S. aureus* 在 60 d 贮藏过程都在下降,接种了 LCR 719 组(B) *S. aureus* 下降幅度最大,活菌数的对数从 3.8 下降到 2.1,降低了 1.7。接种 AS1.1482 组(D)的与(B)的组比较,下降幅度没有这么大,从 5.0 下降到 3.8,下降了 1.2。而对照组(C₂)的从 5.9 下降到 4.9,只下降了 1.0。

(a) *S.aureus*的接种量为 10^2 cfu/mL(b) *S.aureus*的接种量为 10^4 cfu/mL图4 10 °C 贮存对大豆奶酪中 *S. aureus* 的抑制Fig. 4 Inhibition of *S. aureus* in soy cheese during storage at 10 °C

2.2.3 30 °C 贮存对 *S. aureus* 的抑制 在贮藏温度为 30 °C 时, LCR 719 对 *S. aureus* 生长影响见图 5。当 *S. aureus* 的接种量为 10^2 cfu/mL, 从图 5(a) 可以看出, 接种了 LCR 719 组(A) *S. aureus* 有轻微的下降, 活菌数的对数从 2.5 下降到 2.3, 降低了 0.2; 当 *S. aureus* 的接种量为 10^4 cfu/mL 时, 从图 5(b) 可以看出, *S. aureus* 在 60 天贮藏过程中都在下降, 接种了 LCR 719 组(B) *S. aureus* 下降幅度最大, 活菌数的对数从 3.8 下降到 3.2, 降低了 0.6。

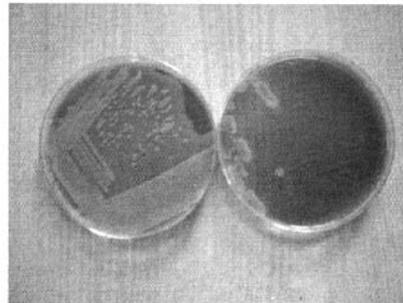
由图 5 可以看出, 接种了 AS1.1482 的奶酪 C、D 在第 10 天取样分析发现, *S. aureus* 有一些升高, 到第 20 天开始恢复到原有的水平, 一直到 60 d 贮存期。而对照组 *S. aureus* 的菌数在 60 d 的贮存期也变化很小。

(a) *S.aureus*的接种量为 10^2 cfu/mL(b) *S.aureus*的接种量为 10^4 cfu/mL图5 30 °C 贮存对大豆奶酪中 *S. aureus* 的抑制Fig. 5 Inhibition of *S. aureus* in soy cheese during storage at 30 °C

30 °C 与 10 °C 两个贮存温度最大的不同是, 前者在贮藏过程 *S. aureus* 下降幅度小或没有下降, 而后者下降幅度较大。LCR 719 在两个贮藏温度下, 能不同程度地抑制大豆奶酪中的 *S. aureus*。LCR 719 抑制 *S. aureus* 的效果与前人的报道一致^[10-13]。初始(0 天)取样分析发现, 奶酪 A、B、C、D、C₁、C₂ 的 *S. aureus* 菌数不同, 发酵过程中 pH 值下降幅度不同, 较低的 pH 值扰乱了不良微生物的动态平衡^[14]。

2.3 LCR 719 在大豆奶酪中对 *B. subtilis* 的抑制

2.3.1 *B. subtilis* 的典型菌落特征 将纯种 *B. subtilis* 菌悬液用无菌生理盐水作适当稀释后, 吸取 1 mL, 按照 1.2.4 的方法滴加在 MPY 平板上, 置 37 °C 培养 18~24 h, 观察图 6 粉红色菌落, 并计数。

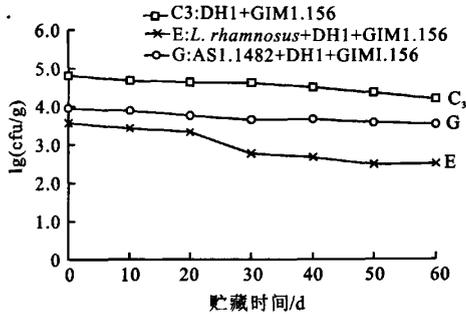


(左: 枯草芽孢杆菌在 MPY 的菌落形态; 右: 空白 MPY)

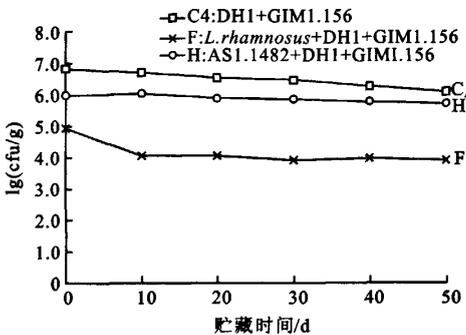
图6 在 MPY 培养基上 *B. subtilis* 的菌落形态Fig. 6 Colonial morphology of *B. subtilis* on MPY medium

2.3.2 10 °C 贮存温度下对 *B. subtilis* 的抑制 在贮藏温度 10 °C 时 LCR 719 对 *B. subtilis* 生长影响见图 7。*B. subtilis* 在 60 d 贮藏过程中平缓下降, 但接种了 LCR 719 的组 *B. subtilis* 下降幅度最大, 奶酪 E、F 的 *B. subtilis* 的活菌数的对数从 3.6、4.9 分别下降到 2.5、3.6, 分别降低了 1.1 和 1.3。接种了 AS1.1482 的奶酪 G、H 的 *B. subtilis* 的活

菌数的对数从 4.0、6.0 分别下降到 3.5、5.6,降低了 0.5、0.4。而只接种了 DH1 的大豆奶酪 C₃、C₄ 的 *B. subtilis* 活菌数的对数从 4.8、6.8 分别下降到了 4.2、6.2,只降低了 0.6。



(a) *B. subtilis* 的接种量为 10² cfu/mL



(b) *B. subtilis* 的接种量为 10⁴ cfu/mL

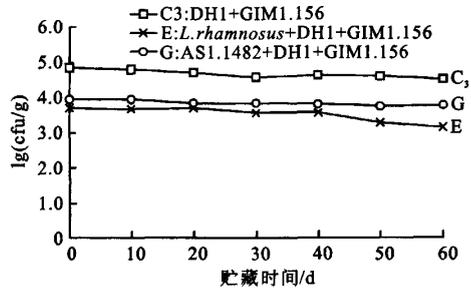
图 7 10 °C 贮存对大豆奶酪中 *B. subtilis* 的抑制

Fig. 7 Inhibition of *B. subtilis* in soy cheese during storage at 10 °C

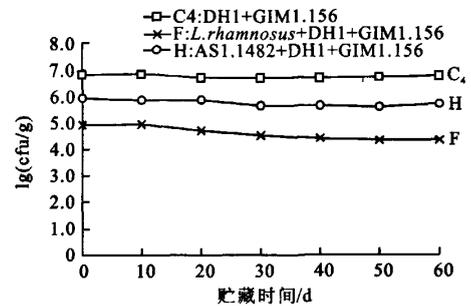
2.3.3 30 °C 贮存对 *B. subtilis* 的抑制 在贮藏温度 30 °C 时,LCR 719 对 *B. subtilis* 的生长的影响见图 8。接种了 LCR 719 的奶酪 E、F 的 *B. subtilis* 活菌数的对数从 3.7、4.9 分别下降到 3.2、4.3,分别降低了 0.5、0.6。接种了 AS1.1482 的奶酪 G、H 的 *B. subtilis* 几乎没有下降。而对照组大豆奶酪 C₃、C₄ 的 *B. subtilis* 没有下降。温度可以影响微生物的生长,高温与低温最大的不同是,前者使 *B. subtilis* 在贮藏过程中下降幅度小或没有下降。为防止不良微生物和为了产生良好的风味,乳酸菌被广泛用于肉制品工业^[13]。大豆奶酪 E、F、G、H、C₃、C₄ 的 *B. subtilis* 菌数不同,是 pH 值的快速下降抑制了 *B. subtilis* 的生长。

分析大豆奶酪 C₁~C₄、A~H 在 10、30 °C 分别贮藏 60 d 后水分活度 A_w(恒温 25 °C)和水份,A_w 为 0.990~0.999,含有 63.1 % 水,可知贮藏温度对水分活度影响不大,大豆奶酪的 A_w 高于白腐乳(A_w =

0.905,含 68.0 % 水),而与牛奶干酪(A_w = 0.999,含水 56.5 %)比较接近。微生物的繁殖活动需要一定的 A_w,当 A_w 为 0.5 时,任何微生物都不能生长。在生产贮藏过程中,尽量控制 A_w 小于 0.5,才可有效防止微生物的污染。上述结果表明,*S. aureus* 和 *B. subtilis* 受到抑制,而 A_w 高达 0.9 以上不足以抑制这两种菌的生长,因此可以说 LCR 719 能抑制大豆奶酪中的 *S. aureus* 和 *B. subtilis*,LCR 719 利用豆奶中的碳源产生有机酸使体系快速酸化抑制有害菌。而商业发酵剂 AS1.1482 用于控制大豆奶酪的微生物效果较差。尽管有机酸是抑制微生物的主要原因,但是要抑制所有不良微生物,需要多种因素协同作用^[15-16],即在原料卫生、产品水分活度、pH 值、天然或化学防腐剂保鲜剂和气调包装技术等方面要协同作用。



(a) *B. subtilis* 的接种量为 10² cfu/mL



(b) *B. subtilis* 的接种量为 10⁴ cfu/mL

图 8 30 °C 贮存对大豆奶酪中 *B. subtilis* 的抑制

Fig. 8 Inhibition of *B. subtilis* in soy cheese during storage at 30 °C

3 结 语

LCR 719 培养上清液能很好抑制 *S. aureus* 和 *B. subtilis*。在 10 °C 贮藏时,接入 LCR 719 的大豆奶酪可使 *S. aureus* 的菌数降低至原有的 1/10~1/100,使 *B. subtilis* 的菌数降低至原有的 1/10 以下。在 30 °C 贮藏时,接入 LCR 719 的大豆奶酪可抑制 *S. aureus* 和 *B. subtilis* 的生长。结果表明,

LCR 719 能用作大豆奶酪的潜在保护性菌种。

参考文献(References):

- [1] Guinane C M, Cotter P D, Hill C, et al. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2005,98: 1316—1325.
- [2] Luecke F K, Hechelmann H. Starter cultures for dry sausages and raw ham; composition and effect[J]. **Fleischwirtschaft**, 1987,67: 307—314.
- [3] Forestier C, De Champs C, Vatoux C, et al. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*; in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties[J]. **Research in Microbiology**, 2001,152: 167—173.
- [4] De Champs C, Maroncle N, Barestrino D, et al. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption[J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 2003, 41(3): 1270—1273.
- [5] Kalta A K, Kruse H, Johnsen G, et al. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2001,67: 147—152.
- [6] Hotzapfel W, Geisen R, Schillinger U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 1994,24: 343—362.
- [7] 沈莲清,苏光耀,王向阳. 植物乳杆菌素研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(5):121—125.
SHEN Lian-qing, SU Guang-yao, WANG Xiang-yang. Progress on plantaricin by *L. plantarum*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006,25 (5): 121—125. (in Chinese)
- [8] 刘冬梅,李理,梁世中,等. 潜在益生菌鼠李糖乳杆菌在大豆奶酪中的稳定性[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,2006,34(5):76—80.
LIU Dong-mei, LI Li, LIANG Shi-zhong, et al. Stability of potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in soy cheese[J]. **Journal of South China University of Technology:Natural Science Edition**, 2006, 34 (5): 76—80. (in Chinese)
- [9] 张远. 金黄色葡萄球菌及其快速检测方法[J]. 粮油食品科技,2006,14(5):51—53.
ZHANG Yuan. *Saphylococcus aureus* and its rapid detection methods[J]. **Science and Technology of Cereals, Oils and Foods**, 2006, 14 (5): 51—53. (in Chinese)
- [10] Leistner L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2000, 55: 181—186.
- [11] Marcy J A, Kraft A A, Olson D G, et al. Fate of *Staphylococcus aureus* in reduced sodium fermented sausage[J]. **Journal of Food Science**, 1985,50: 316—320.
- [12] Schillinger U, Luecke F K. Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products[J]. **Fleischwirtschaft**, 1991(1): 3—10.
- [13] Sameshima T, Magome C, Takeshita K, et al. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 1998,41: 1—7.
- [14] Työppönen S, Petäjä E, Mattila-Sandholm T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2003,83: 233—244.
- [15] Archer M H, Dillon V M, Campbell-Platt G, et al. Effect of deacetyl on growth rate of *Salmonella typhimurium* determined from detection times measured in a microwell plate photometer[J]. **Food Control**, 1996(7): 63—67.
- [16] Brul S, Coote P. Preservative agents in foods, mode of action and microbial resistance mechanisms[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 1999,50: 1—17.

(责任编辑:李春丽)