

乳脂乳球菌 CH5 生长特性的研究

秦文, 任发政*, 陈尚武, 张玲改

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 教育部—北京市功能乳品重点实验室, 北京 100083)

摘要 本文以农家干酪生产使用的乳脂乳球菌(*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*)为研究对象,从细菌总数(CFU), pH值和滴定酸度三个指标对本实验室分离得到的乳脂乳球菌CH5在脱脂乳中的生长特性和4℃下保存过程中的活力变化进行了研究。结果表明乳脂乳球菌CH5在脱脂乳中的延滞期短,能较快进入对数生长期,6h时进入稳定期,活菌数达 10^9 CFU/ml, T_{dg} 约为1.03h, T_{da} 约为2.87h,这表明乳脂乳球菌CH5细胞增长速度快于产酸速率。乳脂乳球菌CH5在4℃下保存时,稳定性较好,前11d活菌数和最大产酸速率(μ_{acid})基本保持不变,此后逐渐下降,表明CH5发酵剂在前11d的活力比较稳定,可以确定生产农家干酪的CH5母发酵剂的最佳传代时间为11d,冷却保藏第3d为最佳生产使用时间。

关键词: 乳脂乳球菌; 细菌总数; 生长曲线; 世代时间; 最大产酸速率

Growth Characteristics of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Strain CH5 in Reconstituted Skim Milk

QIN Wen, REN Fa-zheng*, CHEN Shang-wu, ZHANG Ling-gai

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Functional Dairy Laboratory of Education Ministry and Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: Using acid-producing bacteria-*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* which is often used in cottage cheese making as research object, the growth characteristics of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strain CH5 in reconstituted skim milk (RSM) and changes of starter activity under 4℃ during storage were studied with three factors including CFU, pH and titratable acidity. The results showed that: the lag phase of strain CH5 in RSM was very short, the population of viable cell of which could reach 10^9 CFU/ml; in the stationary phase. The doubling time for growth (T_{dg}) was about 1.03h and doubling time for lactic acid production (T_{da}) was about 2.87h, showed the efficient cell growth, not the acid production, a desirable property during bulk culture preparation. During storage under 4℃, the maximum acidification rate (μ_{acid}) appeared on 3d, and the viable cell counts and μ_{acid} did not show significant changes before 11d. It suggested that the mother culture prepared by CH5 strain could be maintained per 11d, and the optimum stage for bulk culture started from the 3rd day of cold storage.

Key words: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*; CFU; growth curve; generation time; maximum acidification rate μ_{acid}
中图分类号 TS252.1 文献标识码 A 文章编号 1002-6630(2005)04-0062-04

干酪是近年来唯一保持产量连续增加的乳制品,其中鲜食干酪的产量更是呈现了明显的上升趋势。农家干酪(cottage cheese)是目前国际市场上最普及的新鲜软质干酪之一,它是一种酸化凝乳型干酪,主要依靠发酵剂产酸或直接添加食用酸化剂使原料乳的pH值下降至酪蛋白等电点形成凝乳而制成^[1]。传统上多采用添加发酵剂产酸来生产农家干酪。

农家干酪生产中经常遇到的产品缺陷有酸味过重、质地疏散和凝乳块易散^[2]。这些缺陷都是由酸化过程控

制不当所致。研究表明,由于噬菌体感染、凝集作用和其他能直接影响乳酸菌稳定等较难控制的因素,是农家干酪的生产中致使酸化过程失控的重要原因^[3]。因此要生产出质量高、品质稳定的产品,首先要保证发酵剂本身的稳定,包括对噬菌体和凝集作用敏感度低,保持菌株活力稳定。

农家干酪作为一种酸凝乳型干酪,发酵剂在其生产过程中扮演着重要的角色。乳脂乳球菌(*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*)由于对凝集作用敏感程度低,活力

收稿日期 2005-03-02

* 通讯作者

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2002BA518A07)

作者简介: 秦文(1980-),女,硕士研究生,研究方向为乳品科学。

和性状在长期的活化和使用过程中比较稳定,因而常单独或与其他产香菌配合应用于农家干酪的生产^[1,3]。目前我国干酪研究尚处于起步阶段,对农家干酪所用发酵剂菌种的生长、稳定特性了解较少。为此,本文选用农家干酪生产中常使用的乳脂乳球菌作为研究对象,对其在脱脂乳中的生长和产酸特性以及4℃条件下保存过程中菌株活力变化进行了研究,为进一步开展乳脂乳球菌在农家干酪生产中的应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 乳脂乳球菌(*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*)CH5菌株:为本实验室从国内外天然干酪产品中分离、纯化得到一系列乳酸菌菌株,经筛选并鉴定为乳脂乳球菌(菌株编号*L. lactis* ssp. *cremoris* CH5)。该菌株在产酸,产香及滋气味等方面均表现良好。原菌株以冻干粉形式保存。

1.1.2 培养基:12%复原脱脂奶(115℃灭菌15min)及MRS培养基,所有试剂为分析纯试剂。

1.2 主要实验仪器

酸度计(Hanna211型实验室酸度离子仪),UV-2102PC型分光光度计,DSHZ-300多用途水浴恒温振荡器,SW-CJ医用型洁净工作台,DNP-9082型电热恒温培养箱。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种的活化:取适量冻干粉菌种接种于液体MRS培养基中,在30℃下培养至混浊,按1%接种量转接于液体MRS中,如此反复转接活化3代,恢复菌种活力。

1.3.2 乳脂乳球菌CH5的生长曲线和产酸曲线的测定:将活化后的菌种按1%接入复原脱脂奶中,30℃培养。测定接种时的起始菌数和pH值后,每隔2h取样测定培养物pH值和滴定酸度(TA),用MRS平板法测定活菌数,最终得到产酸曲线和生长曲线。所有培养和测定设3次重复。

1.3.3 乳脂乳球菌CH5世代时间的计算^[4-6]:在发酵剂生长过程中,其世代时间可直接通过菌数的变化来计算,也可间接通过测定生成的代谢产物来计算。本文通过测定生长量计算的世代时间 T_{dg} 与以乳酸生成量计算的世代时间 T_{da} 来反映发酵剂菌株菌数的增长特性。发酵剂在对数生长期中生长和产酸的世代时间计算公式如下:

$$T_{dg}=0.301(t-t_0)/(\log N-\log N_0)$$

$$T_{da}=0.301(t-t_0)/\Delta LA$$

式中: T_{dg} =以生长量计算的世代时间;

N =时间为 t 时的菌数;

N_0 =时间为 t_0 时的菌数;

T_{da} =以乳酸生成量计算的世代时间;

ΔLA =从 t_0 变化到 t 时乳酸生成量(乳酸%)的差值。

1.3.4 乳脂乳球菌CH5存活曲线的测定:将用乳脂乳球菌制备的发酵剂贮藏于一定条件下,定期用MRS平板法测活菌数,绘制Log N(CFU/ml)-t(半对数-时间)图。

1.3.5 最大产酸速率(μ_{acid})的计算方法^[7]: μ_{acid} 是指发酵剂在一段时间内酸度的增值,以mmol/h表示。发酵剂在对数生长期中的最大产酸速率按下式进行计算:

$$\ln Y=\ln Y_0+\mu_{acid}\times(t-t_0)$$

式中: Y_0 =单位质量的发酵剂在时间 t_0 时生成的乳酸量,以mmol/g表示;

Y =单位质量的发酵剂在时间 t 时生成的乳酸量。

1.3.6 光密度(OD值)测定方法:在600nm下测定吸光度值(比浊法)。

1.3.7 活菌测定方法:采用平板菌落计数法,在30℃下,于MRS平板上培养48h后计数。

1.3.8 pH值测定方法:用HANNA211pH计测定。

1.3.9 滴定酸度(TA)测定方法^[6]:取10g左右发酵物置150ml锥形瓶中,加入20ml蒸馏水和1%的酚酞指示剂数滴,混匀,用0.1N NaOH标准溶液滴定至终点。

$$TA(\text{乳酸}\%)=(0.1N\text{ NaOH毫升数}\times 0.009/\text{样品重量})\times 100$$

0.009—即0.1N NaOH溶液1ml相当于乳酸的克数。

2 结果与讨论

2.1 乳脂乳球菌CH5菌体最佳收获时间

将乳脂乳球菌CH5种子液按1%接种到液体MRS培养基中,在30±1℃下振荡培养,每隔2h取样测pH值和600nm下光密度(OD_{600nm}),两者与时间的对应关系如图1所示。

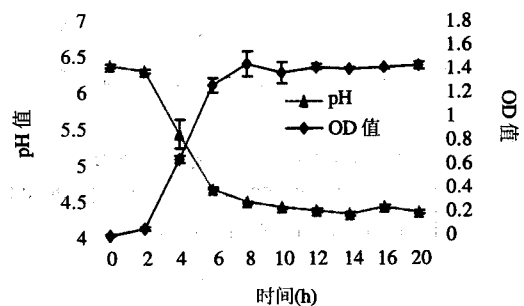


图1 乳脂乳球菌CH5在液体MRS培养基里振荡培养的生长和产酸曲线
Fig.1 Growth and acid production of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CH5 in MRS

通常情况下, 菌体生长的对数末期至稳定前期为菌体收获的最佳时期。从图1中的生长曲线可以看出, 在8h的时候, 菌液的OD₆₀₀值达到最大, 此后保持平稳, 从产酸曲线也可看出, 乳脂乳球菌在培养8h后, 产酸速率开始下降, 10h后pH几乎保持不变, 即乳脂乳球菌培养8~10h后, 就逐渐进入稳定期。因此我们选用8~10h为其最佳收获时间, 测定此时的活菌数为 3.3×10^9 CFU/ml。

2.2 乳脂乳球菌CH5在复原脱脂奶(RSM)中的生长和产酸曲线

微生物的典型生长一般有四个时期, 即迟滞期、对数生长期、稳定期和衰亡期。由图2可看出, 乳脂乳球菌CH5在RSM中生长时, 迟滞期很短, 很快就进入对数生长期, 在6h时活菌数达到 10^9 CFU/ml, 此后进入稳定期, 8h后, 活菌数缓慢下降, 逐渐进入衰亡期。结合图2和图3可以看出, 当乳脂乳球菌在RSM中生长程度达最大时, 由于发酵剂的生长使乳的pH值下降至4.52, 乳酸浓度上升至约0.65%, 此时复原乳凝乳状态较好, 可作为培养终点。

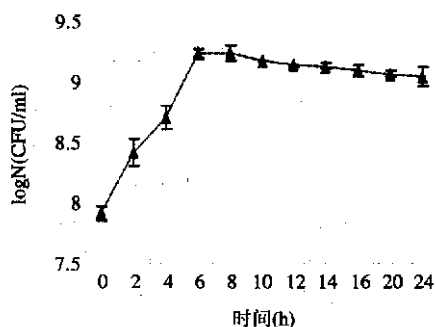


图2 乳脂乳球菌CH5在复原脱脂奶中的生长曲线

Fig.2 Growth of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CH5 in RSM

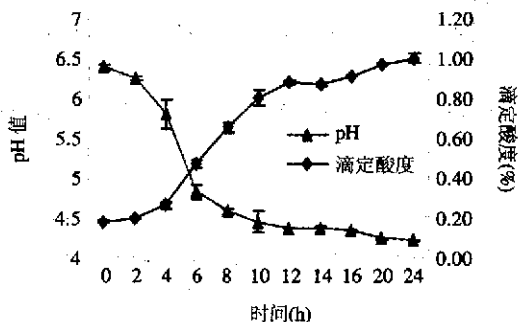


图3 乳脂乳球菌CH5在复原脱脂奶中的产酸曲线

Fig.3 Acid production of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CH5 in RSM

2.3 乳脂乳球菌CH5的世代时间

为了表达菌株的发酵能力, 一般通过测定发酵剂的产酸速率来衡量其活力的大小。通过比较 $T_{0.9}$ (以生长量计算的世代时间)和 $T_{0.9}$ (以乳酸生成量计算的世代时间)的

大小可知, 发酵剂在细胞生长速度和产酸速率之间存在明显的不同步差异。在本实验中, 经过计算可知 $T_{0.9}$ 为1.03h左右, 而 $T_{0.9}$ 值则为2.87h左右, 这表明乳脂乳球菌在复原脱脂乳中的细胞增长速度快于产酸速度。在母发酵剂的制备过程中, 这种生长特性是比较理想的^[5]。

2.4 乳脂乳球菌CH5在保存期间活菌数及产酸性能的变化

稳定的发酵剂活力是干酪品质稳定的必要条件之一。通常4℃条件下的冷藏可以反应发酵菌株的稳定性。为此我们测定了CH5菌株作为发酵剂时它在4℃下保存过程中的活菌数和活力变化情况。

2.4.1 乳脂乳球菌CH5在保存过程中的存活曲线

将乳脂乳球菌CH5接入复原脱脂奶中30℃培养至稳定期, 活菌数达到 10^9 CFU/mL以后, 放于4℃冰箱中进行贮藏, 定期测定其中的活菌数及pH值, 其关系如图4所示。结果表明发酵剂在低温保存过程中, 虽然菌种代谢减慢, 发酵得到有效控制, 但微生物活动并未完全停止, 酸度仍在上升, 到11d时, pH值下降至4.2。这可能是由于部分幼龄菌体继续代谢, 发酵乳糖生成乳酸所致。通过活菌记数可看出, 在保存的前11d, 乳脂乳球菌CH5的活菌数变化不大, 这表明菌株在该阶段的生长和衰亡数基本持平, 此后菌数下降较快, 进入衰亡期。

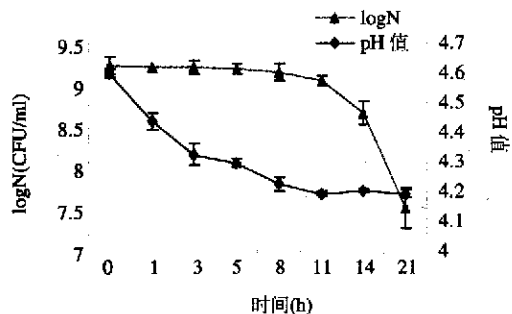


图4 乳脂乳球菌CH5在4℃保存期间菌数和酸度变化情况

Fig.4 Change of cell counts and acidity of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CH5 during storage under 4°C

2.4.2 乳脂乳球菌在保存过程中的产酸性能变化情况

为进一步确定保存菌种的最佳使用时间和传代时间, 对菌种的最大产酸速率 μ_{acid} 进行了定期测定, 以观察菌种在保存期间的活力变化情况。将保存1、3、5、8、11和14d的发酵剂分别按1%接种到复原奶中, 每隔1h定期测乳酸生成量, 计算出最大产酸速率, 结果见图5。

图5的数据表明, 新制备的发酵剂菌种在冷却前发酵活力并未达到最大值, 在第3d时, 发酵过程中的 μ_{acid} 值最高, 生成的乳酸量最大, 故菌种的最佳使用时间应为冷却保存期中的第3d。当保存至14d时, 菌种

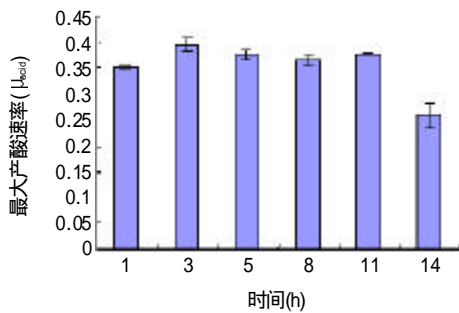


图5 乳脂乳球菌CH5在4℃保存期间的最大产酸速率变化情况
Fig.5 Change of μ_{acid} of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CH5 during storage under 4℃

的 μ_{acid} 值明显下降。结合图 4 可知, 由于活菌数的下降, 导致菌株生长繁殖的迟滞期延长, 对数生长期推迟, 从而造成产酸速率下降, 由此可引起发酵时间的延长。因此, 乳脂乳球菌 CH5 菌株在保存过程中应 11d 转移一次, 这样可以保持较高的活菌数和较稳定的菌株活力。

3 结论

乳脂乳球菌 CH5 菌株在脱脂奶中 30℃ 下培养 8h 时生长程度最大, 进入稳定期, 活菌数达到 10^8 CFU/ml 以上, 凝乳状态良好, 可作为培养终点; 此时复原乳 pH 为 4.52, 滴定酸度为 0.65%, T_{d_0} 为 1.03h 左右, T_{d_a} 为 2.87h 左右, 这表明乳脂乳球菌在复原脱脂乳中的细胞增长速度快于产酸速度。在母发酵剂的制备过程中, 这种生长特性是比较理想的。

乳脂乳球菌 CH5 菌株培养至稳定期培养物于 4℃ 冰箱中保存时具有很好的稳定性, 在前 11d 活菌数和 μ_{acid} 基本保持不变, 因此在保存过程中可每 10~11d 继代一次, 以保持较高的活菌数和稳定的活力; CH5 菌株

发酵剂在 4℃ 冷藏 3d 时, 发酵能力达最佳状态, 在发酵过程中产酸速率稳定, 产酸量大, 为最佳生产使用时间。

参考文献:

- [1] Guinee T P, Pudja P D, Farkye N Y. Fresh Acid-Curd Cheese Varieties. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology [M]. Fox P. F. (ED.), London: Chapman and Hall, 1993, 363-419.
- [2] Marshall R T. Major defects of quality in today's cottage cheese[J]. Cultured Dairy Products Journal, 1975, (10): 6.
- [3] Thunell R K, Sandine W E. Defined Strains and Phage-Insensitive mutants for commercial manufacture of cottage cheese and cultured buttermilk[J]. Journal of Dairy Science, 1984, 67: 1175-1180.
- [4] Mistry V V, Kosikowski F V. Growth of lactic bacteria in highly concentrated ultrafiltered skim milk retentates[J]. Journal of Dairy Science, 1985, 68: 2536-2543.
- [5] Richardson G H, Ernstrom C A, Kim J M, et al. Protease negative variants of lactococcus lactis ssp. cremoris for cheese starters[J]. Journal of Dairy Science, 1983, 66: 2278-2286.
- [6] Sri Lanka S, Ozimek L, Stiles M E. Growth and activity of Lactococcus lactis ssp. cremoris in ultrafiltered skim milk[J]. Journal of Dairy Science, 1989, 72: 2435-2443.
- [7] Meijer W C, Tacken M, Noomen A. Determination of growth parameters of lactococci in milk and ultrafiltered milk[J]. Journal of Dairy Science, 1995, 78: 17-23.
- [8] 冯友军, 张淑娟, 等. 保加利亚乳杆菌生长动力学性质的初步研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(4): 40-41.
- [9] 王天云, 陈振风, 王福源. 嗜酸乳杆菌在不同 pH 条件下生长和存活情况的研究[J]. 工业微生物, 2000, 30(3): 12-15.

· 信息 ·

国家质检总局和国家标准委联合发布

《食品中苏丹红染料的检测方法 - 高效液相色谱法》国家标准

苏丹红属于偶氮系列化工合成染色剂, 主要应用于蜡、油彩、汽油等产品, 我国禁止苏丹红染料应用于食品生产。

2005 年 2 月英国食品标准管理局宣布收回受苏丹红污染的食品后, 为了保证食品安全, 维护消费者权益, 国家质检总局立即发出紧急通知, 要求生产企业召回受苏丹红污染的食品, 对使用苏丹红的食品生产企业进行查处。同时, 国家标准委组织有关部门参考国外标准, 研究相应的检测方法, 对其进行反复验证和比对, 经北京、广东、上海等 18 个省级产品质量检测机构的实际应用, 其准确性得到进一步验证。在此基础上, 国家质检总局和国家标准委于 2005 年 3 月 29 日批准发布《食品中苏丹红染料的检测方法 - 高效液相色谱法》国家标准, 该标准自发布之日起实施。

该标准规定了苏丹红系列染料的测定方法, 适用于食品中苏丹红染料的检测, 使用普通的高效液相色谱仪就能够准确完成。标准的制定充分考虑我国的实际情况, 采用正相吸附和固相萃取原理, 一次性去除样品中辣椒色素和番茄色素对食品中苏丹红检测结果的影响, 解决了国外检测标准适用范围窄、设备昂贵、操作复杂、成本高等不足。