

益生菌切达干酪成熟过程中细菌群落的多样性分析

贾宏信^{1,2}, 龚广予¹, 郭本恒^{1,*}

(1.光明乳业股份有限公司技术中心, 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436;

2.上海海洋大学食品学院, 上海 201300)

摘要: 采用选择性培养基和聚合酶链式反应和变性梯度凝胶电泳 (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE) 技术, 研究益生菌切达干酪成熟过程中 (6 °C, 180 d) 细菌群落构成及益生菌 (干酪乳杆菌 LC2W) 的存活情况。结果表明: SBM和MSE等选择性培养基存在选择专一性不强的缺点, 不能客观反映干酪内各种微生物的动态变化; 随着切达干酪成熟时间的增加, 发酵剂嗜热链球菌和乳酸乳球菌的数量明显下降, 而非发酵剂菌群的乳杆菌的数量和主要种类呈上升趋势; 干酪成熟180 d后, 干酪乳杆菌LC2W的存活量仍高于 1×10^8 CFU/g。切达干酪能作为干酪乳杆菌LC2W存活的良好载体; PCR-DGGE技术和选择计数法联用更加适合干酪细菌群落结构的分析。

关键词: 切达干酪; 干酪乳杆菌; 聚合酶链式反应和变性梯度凝胶电泳; 益生菌; 细菌群落

Diversity of Bacterial Communities of Probiotic Cheddar Cheese during Ripening

JIA Hong-xin^{1,2}, GONG Guang-yu¹, GUO Ben-heng^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technology Center of Bright Dairy and Food Co. Ltd., Shanghai 200436, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201300, China)

Abstract: The survival of *Lactobacillus casei* LC2W and the bacterial communities in cheddar cheese were analyzed by using selective media and polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) method during the ripening period of 180 days at 6 °C. Results demonstrated that SBM and MSE selective media could not objectively reflect the dynamic changes of various microorganisms in the cheese due to the poor selectivity. The population of the starters *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis* decreased significantly, while the population and species of the non-starter *Lactobacillus* significantly increased during the ripening period. *L. casei* LC2W survived well in the cheese and retained its viability at $> 1 \times 10^8$ CFU/g even after 180 days ripening. It is concluded that cheddar cheese can be an effective vehicle for delivery of *L. casei* LC2W and that PCR-DGGE technology combined with traditional culture-dependent methods can be more suitable for cheese microflora analysis.

Key words: cheddar cheese; *Lactobacillus casei*; polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE); probiotic; bacterial communities

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)01-0145-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201401028

干酪独特的理化特性 (相对高的pH值、低滴定酸度、强缓冲能力、高脂肪含量、低含氧量及致密的质构) 使其成为了益生菌的良好载体^[1], 为益生菌干酪的研究提供良好前提。另外干酪内微生物由发酵剂菌群 (主要是乳酸乳球菌、嗜热链球菌、德氏乳杆菌和瑞士乳杆菌) 和非发酵剂菌群 (主要是嗜常温乳杆菌、片球菌、丙酸菌、黏细菌、霉菌和酵母菌) 组成^[2]。干酪加工成熟过程中, 先是发酵剂菌群占主导优势, 而后随着成熟时

间延长非发酵剂菌株的数量会显著提高^[3-4]。干酪内微生物这一独特的组成和生长趋势为益生菌干酪的研究提供了条件。从Dinakar等^[5]研究益生菌切达干酪以来, 益生菌干酪的研究迅速成为益生菌食品的研究热点, 到目前为止新鲜奶酪、软质奶酪、半硬质奶酪、硬质奶酪和白卤奶酪等几乎所有类型的奶酪都已用于益生菌干酪的研究^[1], 而涉及到的益生菌株主要为双歧杆菌属和乳杆菌属^[6]。

收稿日期: 2012-12-31

基金项目: 国家“973”计划项目 (2010CB735705)

作者简介: 贾宏信 (1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: jiahx0607@126.com

*通信作者: 郭本恒 (1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为乳业科学。E-mail: guobengheng@brightdairy.com

目前益生菌切达干酪的研究涉及到的益生菌有嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和双歧杆菌等,而益生菌存活情况的鉴定主要是选择性培养基计数法^[6],但是这一方法在进行菌相分析时存在同一属很难分开的情况,为客观地反映益生菌在某一基质内的数量,选择合适的辅助方法就很重要。变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术已广泛应用于海洋、湖泊、河流、昆虫、动物肠道、环境和食品等各个领域内复杂微生物多样性分析,能把大小相同、序列不同的DNA片段区分开来,并能实现区分同属不同种的微生物^[7]。本实验以干酪乳杆菌LC2W(具有抗高血压及免疫调节作用^[8-9])作为切达干酪的附属发酵剂制作益生菌切达干酪,并用传统计数法和聚合酶链式反应和变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-DGGE, PCR-DGGE)技术联用对乳杆菌LC2W在干酪内的存活情况和干酪的细菌群落构成进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

益生菌干酪乳杆菌LC2W、无抗生素牛奶 光明乳业股份有限公司; CHOOZTT™ RA021发酵剂、MARZYME 150MG凝乳酶 丹尼斯克添加剂(上海)有限公司; MRS固体培养基、M17固体培养基、SBM固体培养基、PCA固体培养基 英国Oxoid公司; MSE固体培养基 法国Biokar Diagnostics公司; 2×Taq Plus PCR MasterMix 天根生化科技有限公司; 引物合成和PCR扩增产物测序 上海立菲生物技术有限公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

T50自动电位滴定仪、Inlab solids pro三合一pH计探头 瑞士Mettler公司; 厌氧培养箱 英国Ruskin公司; 隔水式恒温培养箱 上海精宏实验设备有限公司; 高速低温离心机 德国Eppendorf公司; 变性梯度凝胶电泳仪、凝胶成像仪 美国Bio-Rad公司; Veriti 96 Well Thermal Cycler PCR仪 美国Life Technologies公司。

1.3 方法

1.3.1 干酪加工

益生菌切达干酪制作在光明乳业技术中心中试车间进行,取100L新鲜无抗牛奶进行标准化(蛋白、脂肪含量比值0.85)并进行巴氏杀菌(68℃, 15s),然后冷却至31℃保温加发酵剂(包含*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*、*Streptococcus thermophiles*)和干酪乳杆菌LC2W,待乳熟化30min(31℃)后加0.001%凝乳酶进行凝乳40min左右,然后进行切割并热烫(每5min升高1℃)至38℃后排乳清、

切达化、绞碎加2.5%无碘食盐、入模压榨成型并真空包装,放入6℃成熟室成熟。

1.3.2 干酪内微生物计数实验

取成熟时间为0、10、30、60、90、120、150、180d的切达干酪进行菌相分析。将10g干酪和90mL 2g/100mL柠檬酸钠溶液混合,高速分散器匀浆2~4min,然后用蛋白胨生理盐水10倍梯度稀释。取稀释液200μL进行涂布实验, MRS、LM17、SBM、PCA和MSE培养基分别用于乳杆菌、乳球菌、粪肠球菌、总需氧菌和明串珠菌计数。培养条件: MRS和SBM平板厌氧培养(37℃, 2d); LM17和PCA平板非厌氧培养(31℃, 2d), MSE平板培养(28℃, 5d)。计数: 取菌落数在30~300 CFU/平板的计数,并收集平板菌落至离心管,用于后续DGGE分析。

1.3.3 细菌总DNA的提取和扩增条件

参照Ercolini等^[10]提取Stilton干酪总细菌DNA的方法提取,平板收集所得菌体DNA及干酪内细菌总DNA。PCR扩增总体积为50μL: 2×Taq Plus PCR MasterMix 25μL, ddH₂O 20μL, 10μmol/L正、反向引物(R518和GC-F357)各2μL,模板DNA 1μL。PCR扩增条件为: 95℃预变性5min, 95℃变性45s,退火温度从65℃起每个循环降1℃至56℃(退火40s), 72℃延伸30s, 56℃退火40s, 25个循环, 72℃延伸30s,最后72℃延伸10min。扩增引物: R518(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')和GC-F357(5'-CGCCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3')。

1.3.4 DGGE分析

聚丙烯酰胺凝胶质量浓度8g/100mL,胶厚1mm,丙烯酰胺-双丙烯酰胺(质量比37.5:1),尿素梯度40%~60%(100%变性剂含有7mol/L尿素和40%甲酰胺)。电泳条件: 电泳液1×TAE, 60℃、75V,电泳13h。电泳结束后用EB染色20~30min,凝胶成像仪拍照,然后割胶,把所割DNA放入加有50μL无菌水的离心管里,4℃过夜,作为DNA模板。DGGE条带测序: 取上述DNA浸出液2μL作为模板, 2×Taq Plus PCR MasterMix 12.5μL, ddH₂O 8.5μL, 10μmol/L引物F357和R518各1μL进行PCR扩增,测序。PCR扩增条件: 95℃预变性3min, 95℃变性45s, 56℃退火40s, 72℃延伸30s,共25个循环,最后72℃延伸7min。扩增引物: F357(5'-TACGGGAGGCAGCAG-3')和R518(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')。测序所得的16S rDNA序列在线进行BLAST序列对比分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

1.4 数据处理

显著性分析采用SPSS17.0统计软件单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)进行均值差异的显著性分析,显著水平 $P < 0.05$ 。

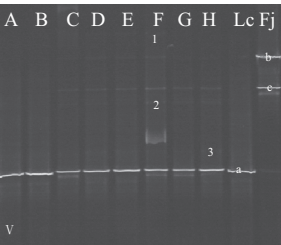
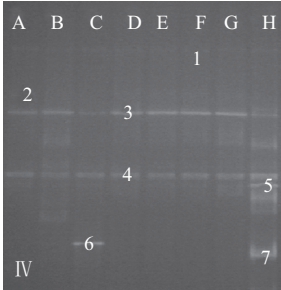
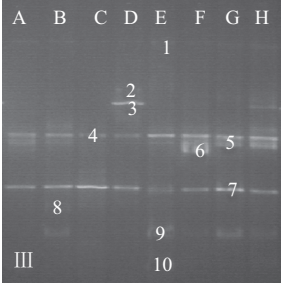
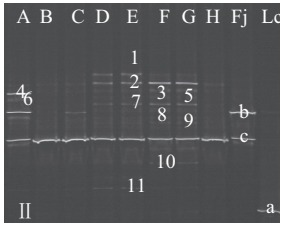
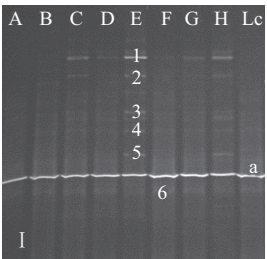
2 结果与分析

2.1 干酪内微生物平板计数结果

切达干酪内含的微生物具有多样性和动态性, 因此在不同成熟阶段, 干酪内不同种微生物的数量会有所变化。表1显示益生菌干酪在不同成熟期内pH值和微生物的变化情况。切达干酪pH值的变化表现为从干酪压榨后到成熟的前20 d在5.17左右, 到第30天下降为5.11, 而后随着成熟时间的增加, 其pH值一直下降, 到成熟180 d时为4.88。pH值下降的因素主要有: 乳酸菌利用残余糖类进行代谢产生的乳酸; 蛋白降解和脂质降解产生的酸性氨基酸及脂肪酸等; 干酪成熟过程中微生物代谢消耗掉一部分自由水。

由表1可知, 在干酪成熟180 d过程中, MRS培养基得到的乳杆菌数量一直高于 1×10^8 CFU/g, 成熟前期乳杆菌数量低于成熟后期, 这一点反映了乳杆菌在切达干酪内进行着代谢与生长。LM17培养基得到的乳球菌数量呈现逐渐降低的趋势, 不同时期相比存在显著差异, 干酪成熟90 d以前乳球菌数量高于 2.65×10^9 CFU/g, 90 d后下降为 10^8 CFU/g左右。SBM培养基计数的粪肠球菌数量成熟前为 1.38×10^4 CFU/g, 成熟时一直降低, 到180 d时下降为 5.33×10^2 CFU/g。而PCA培养基计数的好氧细菌结果和MSE培养基计数的明串珠菌结果相似, 都是在不同的成熟期内数量高于 1×10^8 CFU/g。

2.2 培养基菌落PCR-DGGE分析



I ~ V. 分别代表MRS、LM17、PCA、SBM、MSE培养基; A ~ H. 分别代表干酪成熟时间为0、10、30、60、90、120、150、180 d; Lc、a. 干酪乳杆菌LC2W; Fj. 发酵剂; b. 乳酸乳球菌; c. 嗜热链球菌。图2同。1~10代表不同细菌的条带。

图1 在不同成熟时间不同培养基收集所得细菌V3区DGGE图谱

Fig.1 Bacterial DGGE profile of PCR amplicons of the V3 region of bulk cells from different media

表1 切达干酪不同成熟期的pH值和主要细菌的数量

Table 1 Mean pH, log bacterial counts (in lg(CFU/g)) and standard deviation (SD) of the main bacteria along ripening stages of cheddar cheese

成熟时间/d	pH	MRS		LM17		PCA		SBM		MSE	
		稀释梯度	菌落数 (lg (CFU/g))	稀释梯度	菌落数菌落数 (lg (CFU/g))	稀释梯度	菌落数菌落数 (lg (CFU/g))	稀释梯度	菌落数菌落数 (lg (CFU/g))	稀释梯度	菌落数菌落数 (lg (CFU/g))
0	5.17±0.01 ^{ab}	10 ⁶	8.06±0.07 ^e	10 ⁷	10.05±0.01 ^c	10 ⁵	8.05±0.03 ^f	10 ²	4.14±0.03 ⁱ	10 ⁵	8.09±0.03 ^g
10	5.16±0.01 ^b	10 ⁶	8.26±0.01 ^c	10 ⁷	9.96±0.03 ^d	10 ⁶	8.14±0.08 ^e	10 ²	4.13±0.05 ⁱ	10 ⁵	8.06±0.01 ^e
20	5.18±0.01 ^a	10 ⁶	8.16±0.01 ^{ef}	10 ⁸	10.32±0.03 ^b	10 ⁶	8.34±0.03 ^{cd}	10 ²	4.01±0.12 ^{ab}	10 ⁵	8.23±0.04 ^d
30	5.11±0.02 ^c	10 ⁶	8.25±0.09 ^{cd}	10 ⁸	10.61±0.08 ^a	10 ⁶	8.26±0.04 ^d	10 ²	3.97±0.07 ^{bc}	10 ⁶	8.22±0.04 ^d
60	5.02±0.01 ^d	10 ⁶	8.31±0.02 ^{bc}	10 ⁷	9.93±0.01 ^d	10 ⁶	8.31±0.03 ^{cd}	10 ²	4.07±0.03 ^{ab}	10 ⁶	8.33±0.03 ^e
90	4.97±0.01 ^e	10 ⁶	8.37±0.01 ^{cd}	10 ⁷	9.42±0.09 ^e	10 ⁶	8.38±0.06 ^{bc}	10 ²	3.83±0.10 ^f	10 ⁶	8.11±0.02 ^e
120	4.92±0.01 ^f	10 ⁶	8.72±0.02 ^a	10 ⁶	8.67±0.03 ^f	10 ⁶	8.78±0.01 ^a	10 ¹	3.54±0.03 ^d	10 ⁶	8.78±0.01 ^a
150	4.88±0.01 ^f	10 ⁶	8.44±0.02 ^{bc}	10 ⁶	8.49±0.01 ^f	10 ⁶	8.44±0.04 ^b	10 ¹	3.21±0.11 ^f	10 ⁶	8.35±0.05 ^e
180	4.88±0.01 ^f	10 ⁶	8.50±0.13 ^b	10 ⁶	8.13±0.03 ^b	10 ⁶	8.44±0.05 ^b	10 ¹	2.72±0.11 ^f	10 ⁶	8.49±0.01 ^b

注: 同列数据上标字母不同表示显著差异(P<0.05)。

培养基菌落PCR-DGGE分析结果如表2所示，MRS培养基上选择生长的主要为乳杆菌，但也有链球菌的检出；LM17培养基的选择性相对较好，菌落分析结果主要为链球菌和乳球菌；SBM培养基不但有粪肠球菌，还有乳杆菌、乳球菌和链球菌等检出，并且是链球菌居多；MSE培养基这一选择生长明串珠菌的培养上反而没有明串珠菌的检出，检出的主要为乳杆菌；PCA培养基上生长的微生物较复杂，有乳杆菌、乳球菌和链球菌。

表 2 不同培养基计数得菌落16S rDNA V3区DGGE主要条带测序结果
Table 2 Sequencing of the 16S rDNA V3 region of DGGE bands of the bulk cells from different media

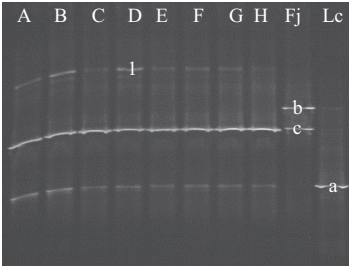
培养基	图编号-条带编号	GenBank登录号	类型	最大相似度/%
MRS	I-1	GU412716	链球菌	100
	I-2	HE962098	嗜热链球菌	100
	I-3	HQ697643	鼠李糖乳杆菌	94
	I-4	JX275817	干酪乳杆菌	95
	I-6	HM070025	干酪乳杆菌	99
LM17	II-1	GU430413	链球菌	99
	II-2	GU412716	链球菌	100
	II-3	HE974957	嗜热链球菌	100
	II-4	JX975418	解链食子酸链球菌解链食子酸亚种	100
	II-5	HE962098	嗜热链球菌	100
	II-6	AB371950	链球菌	99
	II-7	AY442818	链球菌	93
	II-8	JX535029	嗜热链球菌	98
PCA	III-1	GU430413	链球菌	99
	III-2	GU411946	副血链球菌	97
	III-3	JN618456	乳酸乳球菌	99
	III-4	GU412701	链球菌	99
	III-7	GU425013/HQ697643	副干酪乳杆菌/鼠李糖乳杆菌	99
	III-8	GU425013/12	副干酪乳杆菌	98
	III-9	HM462417/GU425776	副干酪乳杆菌/鼠李糖乳杆菌	100
SBM	IV-1	GU430413	链球菌	99
	IV-2	GU417278	粪肠球菌	99
	IV-3	AB371980	链球菌	99
	IV-4	GU412701	链球菌	99
	IV-5	JQ377065	未培养细菌	91
	IV-6	HM070025	干酪乳杆菌	99
	IV-7	JF709778	未培养细菌	100
MSE	V-1	JX975418	解链食子酸链球菌解链食子酸亚种	97
	V-2	JX681143	链球菌	99
	V-3	KC137276	鼠李糖乳杆菌	100

注：表中所列均为 BLAST 序列对比最大相似度≥ 90%的结果。

干酪在成熟过程中微生物的组成会有所变化。图1- I 和表2的结果显示，干酪乳杆菌LC2W一直是MRS培养基上的主要菌株，结合表1 MRS计数结果可以说明干酪乳杆菌LC2W在切达干酪内的存活率很高；另外随着成熟时间的增加特别是到成熟30 d后，干酪中乳杆菌的种类有所增加。图1- II 的结果显示干酪内添加的发酵剂嗜热链球菌在干酪成熟到180 d时数量很高，而乳酸乳球菌只有在干酪成熟0 d时的DNA条带较亮，说明发酵剂乳酸乳球菌（图1- II -b）在干酪成熟前期会快速死亡。对图1- II 中显示的其他链球菌而言（图1- II，条带1、2、7）只有在干酪成熟时间为60、90、120、150 d时才能检出，说明这些菌的数量随着干酪成熟时间的延长是动态变化的。图1-III结果和表2结果可以明确地表明PCA培养基上的菌

株主要为链球菌（图1-III，条带4）和乳杆菌（图1-III，条带7），而且这两条亮带也说明在干酪成熟过程中这两种菌的数量一直较高。图1-IV结合表2明确显示出SBM培养基上长出的主要为链球菌（图1-IV，条带3、5），粪肠球菌只在干酪未成熟时有检出（图1-IV，条带2）。结合图1- V 和表2再次明确了干酪乳杆菌LC2W在干酪内具有较高的存活率，也表明MSE培养基存在选择性弱的缺点。发酵剂乳酸乳球菌（图1- V，条带2）在成熟时间为60、90、120 d时在DGGE条带中有显现，在成熟时间为0、10、30、150 d和180 d时在DGGE条带中无显现。有研究表明干酪内乳球菌的活菌数和干酪的pH值存在一定的正相关关系^[11]。干酪内乳酸乳球菌的这一变化，再结合图1- II 和表1的数据可以得出干酪的pH值变化与乳酸乳球菌的变化相关，在干酪成熟前期pH值一直稳定，到成熟30 d以后pH值一直呈现下降趋势，到成熟150 d后pH值又趋于稳定。

2.3 切达干酪菌相总DNA的PCR-DGGE分析



1.链球菌（GenBank登录号GU412716）。
图 2 益生菌切达干酪不同成熟阶段细菌V3区的DGGE图谱
Fig.2 Bacterial DGGE profiles of PCR amplicons of the V3 region of ripened probiotic cheddar cheese during different ripening times

切达干酪在进行总DNA提取时由于面临干酪内菌相复杂、菌种数量不同、干酪蛋白含量高等原因，会限制干酪内某些微生物DNA的提取效果，进而影响相应的PCR-DGGE效果。图2显示干酪内总DNA的DGGE图谱，图上主要显示的3条亮带分别代表菌株发酵剂嗜热链球菌（条带c），干酪乳杆菌LC2W（条带a）以及链球菌（条带1）。这一结果和计数得出的结果相一致，都表明嗜热链球菌是切达干酪成熟过程中的优势菌。这一结果也表明干酪乳杆菌LC2W的在成熟的过程中（6℃，180 d）的存活量一直处于较高水平。干酪内数量较低的植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和副干酪乳杆菌等菌株（通过平板计数和表2结果得出）在干酪总DNA的PCR-DGGE图谱上（图2）没有显现，说明用PCR-DGGE技术直接分析干酪内菌相时只能分析出干酪内的优势菌。

3 结论与讨论

评价干酪微生态的方法主要有两种：培养基依赖法

(选择性培养基法)和非培养基依赖法(分子生物学方法)。培养基依赖法一般只能确定到菌的属,不能确定到菌所属的种或是亚种,并且对于有些离开干酪特定微生态不能培养的微生物无法检出。非培养基依赖法省去繁琐的培养步骤,直接从干酪内取得微生物的DNA或RNA,进行全局的实时分析,一步就可以研究干酪内微生物多态性,而且极易实现分析到微生物的种型,可以实现快速、实时的监控干酪内微生物的种类和数量^[12]。但是干酪内大分子物质(酪蛋白和脂质等)含量高,这些物质会和DNA提取时的洗涤剂、离液剂和螯合剂结合而影响总DNA的提取,进而使某些菌的检出存在困难^[13]。由表1、2和图1结果显示,MRS和LM17培养基在分析干酪内乳杆菌和乳球菌时相对准确,但是也存在一定的偏差,例如MRS培养基上有链球菌检出。其他研究者也发现MRS培养基存在过度评价干酪内乳杆菌数量的问题,如葡萄球菌在MRS培养基上生长^[10,14];LM17上检出的链球菌(图1-II,条带1、2、7)在发酵剂中没检出,说明这些菌很可能是原料奶本身含有的菌株,而图1-II显示的乳酸乳球菌只有在干酪成熟0 d时有明显的亮带,说明在干酪成熟的前10 d内这一菌株的数量已发生急剧下降。这和郭本恒^[15]介绍的切达干酪成熟过程中发酵剂乳球菌的变化一样,干酪成熟前期(7 d左右)发酵剂乳球菌会因为自溶而快速减少。由图1-I和表1可以看到MRS培养基上乳杆菌的变化,在干酪成熟前期乳杆菌种类较少,而到后期种类明显增加,说明随着成熟时间的增加干酪本身具有的乳杆菌在干酪内处于生长状态。

SBM培养基的选择性对干酪内粪肠球菌的分析有所局限,在SBM培养基上检出的主要是链球菌,而其选择性分析的菌株粪肠球菌只在干酪成熟0 d时有检出。这反映出SBM的对粪肠球菌的计数情况是严重失真的,没有客观地反映出干酪内粪肠球菌的数量。MSE本是选择性培养明串珠菌的培养基,但是在MSE培养基上却没有明串珠菌的检出,而检出的主要为干酪乳杆菌LC2W,这说明MSE培养基的选择性会受到乳杆菌的干扰。关于选择性培养基选择性不强的实例在其他文献上也有报道,如Ercolini等^[10]研究Stilton干酪菌相时发现,葡萄球菌能在LM17和MRS培养基上生长以及明串珠菌能在LM17上生长;Randazzo等^[16]研究Sicilian干酪菌相时发现明串珠菌和肠球菌在LM17上有检出,而MSE培养基却无明串珠菌检出。Randazzo等^[17]分析Pecorino Crotonese干酪时也发现,LM17和MSE计数出来的菌数量都很高,但是通过对LM17和MSE上菌落进行进一步鉴定发现,LM17上长出的菌株属于乳球菌的却很少,MSE上长出的菌株属于明串珠菌的更是少之又少。本实验菌相分析结果和其他研究者^[10-11,17-20]分析干酪菌相时的结果都证明单独用培养基依赖法来评价干酪的菌相存在一定误差性,而非培养基依赖法结合起来分析干酪内菌相则更加真实和客观。

乳球菌的数量(表1中LM17计数)在干酪不同成熟阶段存在显著性差异,PCR-DGGE分析发现发酵剂乳酸乳球菌仅在干酪成熟0 d时存在,发酵剂嗜热链球菌存在

于整个成熟过程中,而非添加链球菌的数量随着成熟时间的延长在升高(图1-II和图2)。明串珠菌的MSE平板计数受乳杆菌、乳球菌和链球菌的影响较大,MSE平板计数一直高于 1×10^8 CFU/g,但MSE菌落的PCR-DGGE分析却无明串珠菌的检出,仅有链球菌、干酪乳杆菌、乳酸乳球菌和鼠李糖乳杆菌的检出。MRS平板、PCA平板和SBM平板菌落的PCR-DGGE分析结果表明随着切达干酪成熟时间的延长干酪内乳杆菌(如鼠李糖乳杆菌、副干酪乳杆菌等)的种类在增多(图1-I、III、IV和表2)。培养基计数结果和PCR-DGGE分析结果表明:干酪乳杆菌LC2W在切达干酪成熟过程中(6℃,180 d)能保持较高的存活量(存活量高于 1×10^8 CFU/g),具有应用于益生菌切达干酪开发的潜力;培养基计数法和PCR-DGGE结合起来分析切达干酪的菌相组成,可以更加真实和客观的反映出干酪内微生物的动态变化。

参考文献:

- [1] KARIMI R, MORTAZAVIAN A M, CRUZ A G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review[J]. Dairy Science & Technology, 2011, 91(3): 283-308.
- [2] BERESFORD T P, FITZSIMONS N A, BRENNAN N L, et al. Recent advances in cheese microbiology[J]. International Dairy Journal, 2001, 11: 259-274.
- [3] VOIGT D D, CHEVALIER F, QIAN M C, et al. Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(1): 68-77.
- [4] RANDAZZO C L, PITINO I, RIBBERA A, et al. Pecorino Crotonese cheese: study of bacterial population and flavour compounds[J]. Food Microbiology, 2010, 27(3): 363-374.
- [5] DINAKAR P, MISTRY V V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese[J]. Journal of Dairy Science, 1994, 77: 2854-2864.
- [6] KARIMI R, MORTAZAVIAN A M, AMIRI-RIGI A. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese[J]. Food microbiology, 2012, 29(1): 1-9.
- [7] ERCOLINI D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3): 297-314.
- [8] 吴正钧. 干酪乳杆菌LC2W菌株的抗高血压作用[J]. 天然产物研究与开发, 2011(2): 228-231; 257.
- [9] 李瑞君, 郭本恒, 吴正钧, 等. LC2W胞外多糖对大肠杆菌脂多糖诱导RAW264.7细胞因子表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(3): 441-442.
- [10] ERCOLINI D, HILL P J, DODD C E R. Bacterial community structure and location in Stilton cheese[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3540-3548.
- [11] ALEGRIA A, ALVAREZ-MARTIN P, SACRISTAN N, et al. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of casin, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136(1): 44-51.
- [12] JANY J L, BARBIER G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese[J]. Food Microbiology, 2008, 25(7): 839-848.
- [13] BONAITI C, PARAYRE S, IRLINGER F. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 107(2): 171-179.
- [14] DOLCI P, ALESSANDRIA V, ZEPPA G, et al. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria[J]. Food Microbiology, 2008, 25(2): 392-399.
- [15] 郭本恒. 干酪[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 271-285.
- [16] RANDAZZO C L, TORRIANI S, AKKERMANS A D L, et al. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an Artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1882-1892.
- [17] RANDAZZO C L, PITINO I, RIBBERA A, et al. Pecorino Crotonese cheese: study of bacterial population and flavour compounds[J]. Food Microbiology, 2010, 27(3): 363-374.
- [18] CARRARO L, MAIFRENI M, BARTOLOMEOLI I, et al. Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing[J]. Research in Microbiology, 2011, 162(3): 231-239.
- [19] MARTIN-PLATERO A M, MAQUEDA M, VALDIVIA E, et al. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena[J]. Food Microbiology, 2009, 26(3): 294-304.
- [20] DOLCI P, ALESSANDRIA V, RANTSIOU K, et al. Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 143: 71-75.