

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240830004

引用格式: 张玉律, 包静, 王琳玲. 叠氮溴化丙锭-qPCR 定量检测发酵乳中动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(7): 255-261.

ZHANG YL, BAO J, WANG LL. Quantitative determination of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus plantarum* ST-III in fermented milk by propidium monoazide-qPCR [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(7): 255-261. (in Chinese with English abstract).

# 叠氮溴化丙锭-qPCR 定量检测发酵乳中动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III

张玉律<sup>1\*</sup>, 包静<sup>2</sup>, 王琳玲<sup>2</sup>

(1. 乳业生物技术国家重点实验室, 上海乳业生物工程技术研究中心, 光明乳业股份有限公司乳业研究院, 上海 200436; 2. 华测检测认证集团股份有限公司, 深圳 518101)

**摘要:** **目的** 将叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)与实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)联合, 建立一种发酵乳体系中动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III的活菌定量检测方法。**方法** 首先设计动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III的特异性基因序列的引物探针, 验证引物探针特异性, 优化 PMA 反应条件, 建立标准曲线, 验证灵敏度, 最后定量检测发酵乳样品中动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III菌株的数量。**结果** 动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 与植物乳植杆菌 ST-III经 PMA 处理受损菌的最佳质量浓度为 10 μg/mL, 处理菌液样品的最佳曝光时间为 10 min, PMA-qPCR 方法能够准确检测发酵乳体系中的动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 与植物乳植杆菌 ST-III。**结论** 本研究建立了一种快速、准确 PMA-qPCR 检测方法, 用于检测发酵乳体系中的动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 与植物乳植杆菌 ST-III, 为发酵乳产品中益生菌的定量检测提供一定的借鉴意义。

**关键词:** 叠氮溴化丙锭; 实时荧光定量聚合酶链式反应; 动物双歧杆菌乳亚种 BB-12; 植物乳植杆菌 ST-III

## Quantitative determination of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus plantarum* ST-III in fermented milk by propidium monoazide-qPCR

ZHANG Yu-Lv<sup>1\*</sup>, BAO Jing<sup>2</sup>, WANG Lin-Ling<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai Engineering Research Center of Dairy Biotechnology, Dairy Research Institute of Bright Dairy Co., Ltd., Shanghai 200436, China; 2. Centre Testing International Group Co., Ltd., Shenzhen 518101, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a quantitative detection method for the quantitative determination of the

收稿日期: 2024-08-30

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2100705); 市国资委能级提升项目(2022013)

第一作者/\*通信作者: 张玉律(1990—), 女, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为乳品科学与加工、乳酸菌基础研究。E-mail: zhangyulv@163.com

viable bacteria number of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactiplantibacillus plantarum* ST-III in fermented milk, by combining propidium monoazide (PMA) with real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Methods** Firstly, the specific primer probe of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactiplantibacillus plantarum* ST-III was designed and verified, the standard curve was established using standard strains, and the reaction conditions of the PMA were optimized. Secondly, the quantities of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactiplantibacillus plantarum* ST-III in the fermented milk samples were quantitatively detected. **Results** The optimal mass concentration of damaged bacteria of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactiplantibacillus plantarum* ST-III was 10  $\mu\text{g/mL}$ , and the optimal exposure time was 10 min. The PMA-qPCR detection method could accurately detect *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactiplantibacillus plantarum* ST-III in fermented milk. **Conclusion** In this study, a rapid and accurate PMA-qPCR detection method is established for the detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactiplantibacillus plantarum* ST-III in fermented milk system, which provides certain reference significance for the quantitative detection of probiotics in fermented milk products.

**KEY WORDS:** propidium monoazide; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12; *Lactiplantibacillus plantarum* ST-III

## 0 引言

乳酸菌主要是革兰氏阳性、不产孢子的兼性厌氧细菌,可从植物、动物和人类等多种来源中分离得到<sup>[1]</sup>。乳酸菌在发酵食品中发挥着重要作用,鼠李糖乳酪杆菌 GG 和动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) BB-12 等很多乳酸菌被证明具有益生功能<sup>[2-3]</sup>。目前公认的益生菌的定义是 2001 年提出的:摄入足够数量时,对宿主产生健康益处的活性微生物<sup>[4]</sup>。近年来 REID 等<sup>[5]</sup>重新界定并进一步阐明了益生菌的定义,指出益生菌必须是活的微生物,必须经过安全评估并证明是安全的,其有益作用必须有足够的证据,并且益生菌的健康作用具有菌株特异性并且与其剂量有关。近年来,菌株分型与菌株特异性的研究也取得了一定进展<sup>[6-9]</sup>。根据 Web of Science 数据库的数据,2022 年全球益生菌相关研究发表量继续增加,达到了 6916 篇,其中包含研究型文章 5051 篇<sup>[10]</sup>。益生菌具有改善肠道健康、增强免疫力、辅助治疗肠易激综合征等多种功效<sup>[11-13]</sup>,被广泛应用于食品、保健品、药品等诸多领域。目前市场上的益生菌产品种类繁多,质量也良莠不齐。常见的益生菌菌株主要有植物乳植杆菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳酪杆菌和动物双歧杆菌乳亚种等。

目前 QB/T 5165《食品用乳酸菌鉴定技术指南》仅适用于可用于食品的双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)的种水平鉴定,食品安全国家标准 GB 4789.35—2023《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》无法特异性定量检测发酵乳制品中的植物乳植杆菌。平板计数法是基于传统倾倒平板培养的定量方法,需要大量的培养基和

后续生化鉴定等步骤,不仅操作烦琐,而且检测周期长(3~7 d),特别是容易受到样品中其他潜在杂菌的干扰<sup>[14-15]</sup>,并且受到培养基、取样、稀释、人员、设备和环境等因素的影响<sup>[16]</sup>。

利用叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)检测活菌数已有报道。利用 PMA-PCR 技术鉴别水样中传染性噬菌体 T4 与受热损伤颗粒,结果显示 PMA-实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)方法的高效性<sup>[17]</sup>,使用 PMA-qPCR 评估幽门螺杆菌对酸性环境和尿素存在条件下的敏感性,为细菌耐酸能力研究提供了重要参考<sup>[18]</sup>,应用 PMA-qPCR 方法区分活的和死的肺炎杆菌,为细菌活力评估提供了新的可能性和技术方法<sup>[19]</sup>。

PMA 是一种能和 DNA 共价交联的光敏材料,可以选择性穿过死菌破损的细胞膜,在钨灯强光照下, PMA 的叠氮基团转化为氮宾自由基,然后与 DNA 中的碳氢氧键结合生成稳共价氮碳键,从而抑制了死菌 DNA 扩增导致的 qPCR 检测中假阳性信号的产生, PMA 特性温和、难以通过活菌的细胞膜,不影响活菌 DNA 的扩增<sup>[20-24]</sup>。qPCR 方法广泛应用于乳制品中的大肠杆菌、双歧杆菌活菌检测<sup>[25-28]</sup>。近年来研究者更倾向用 PMA 结合 qPCR 技术研究活菌检测,且使用 PMA-qPCR 方法可以比平板计数更快地获得可靠的结果<sup>[29]</sup>,大大提高了检测的效率和准确性。因此 PMA 和 qPCR 技术相结合在定量检测活菌方面有巨大的发展潜力。

动物双歧杆菌乳亚种(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) BB-12 是一种安全、耐受性良好的益生菌菌株,在婴儿配方奶粉、膳食补充剂和发酵乳制品中有着悠久的历史使用

历史<sup>[30-33]</sup>。植物乳植杆菌属于同型发酵乳酸菌, 具有减轻肠易激综合征的症状、降低胆固醇和保护肝脏的作用<sup>[34-36]</sup>, 被广泛应用于酸奶、干酪和发酵泡菜等食品中<sup>[37-39]</sup>。植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) ST-III 是从泡菜中分离得到的具有多种益生功能的乳酸菌<sup>[40]</sup>。近年来, 动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 的定量检测技术备受关注。传统的平板计数法虽然是一种常用的方法, 但其操作烦琐、耗时长且容易受到其他杂菌的干扰。因此, 需要发展一种更为快速准确的定量检测方法, 以满足对动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 数量的精准测量需求。在本发酵乳体系中, 共有德氏乳杆菌保加利亚亚种、唾液链球菌嗜热亚种、动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 4 株乳酸菌, 本研究基于核酸共价交联技术, 从分子水平寻找细菌活的状态的标志物, 建立了基于探针法的 PMA-qPCR 方法, 可以有效解决传统方法存在的烦琐、耗时长、干扰多等问题, 将其应用于快速定量检测发酵乳体系中动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III, 以期对发酵乳产品中益生菌的定量检测提供一定的借鉴意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

动物双歧杆菌乳亚种 BB-12、发酵剂(科汉森中国有限公司); 植物乳植杆菌 ST-III(光明乳业股份有限公司); PMA 染料(美国 Biotium 公司); 二甲基亚砷(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、淀粉酶 K、溶菌酶[天根生化科技(北京)有限公司]; 目标基因引物、TB Green™ Premix Ex Taq™等 PCR 扩增试剂[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

### 1.2 仪器与设备

LUYOR-3419 PMA 光解仪(美国路阳公司); ABI 7500 fast 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); Q3000 核酸蛋白分析仪(美国 Quawell 公司); PL303 电子天平(精度 0.001 g, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 受损菌液的制备

标准菌株 BB-12 和 ST-III 的菌悬液分别在 MRS (De Man, Rogosa and Sharpe)培养基厌氧培养 24 h, 用 MRS 培养基稀释 10 倍, 取 10<sup>-2</sup> 菌液于离心管中, 沸水浴 5 min, 吸取 1 mL 涂布于 MRS 琼脂培养基, 经平板法培养 24 h 均未 有菌落长出。

#### 1.3.2 PMA 试剂的配制

准确称量 1 mg PMA 染料, 溶于 20%二甲基亚砷中制成 1 mg/mL 的储存液, 置于-20 °C避光保存。将 PMA 储存液稀释 5 倍后作为工作液。

#### 1.3.3 PMA 处理条件的优化

通过沸水浴 5~10 min 获得无活菌生长的 BB-12 和 ST-III 的受损菌液, 作为 PMA 条件优化的菌液。对 PMA 工作浓度(0~50 μg/mL)、曝光时间(0~30 min)处理条件进行优化: 取 9 份 500 mL 受损菌样品, 加入 PMA 工作液, 使得 PMA 染料的最佳质量浓度分别为 0、2、5、7、10、20、30、40、50 mg/mL, 并充分混匀, 避光孵育 10 min, 然后将离心管置于光解仪中分别曝光 0、2、10、20、30 min 进行光反应。随后用试剂盒提取基因组 DNA, 进行荧光 PCR 检测, 最终确定区分 PMA 处理受损菌的最佳浓度和最佳曝光时间。

#### 1.3.4 引物探针的设计与筛选

为实现对动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 的特异性检测和绝对定量分析, 本研究选取双歧杆菌具有种属特异性且高度保守的单拷贝植物乳杆菌素基因(*plnF*, GenBank no. AP018405.1)作为靶序列, 通过美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)在线工具进行序列分析和比对, 利用 Prime Express 软件 V3.0 (ABI, Foster City, CA, USA)设计出探针 5'端标记 VIC, 3'端标记 TAMRA。引物/探针由上海生工生物有限公司合成。本研究植物乳杆菌选取 GB 4789.35 中探针 5'端标记 FAM, 3'端标记 TAMRA。引物序列见表 1。

表 1 动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 的引物序列  
Table 1 Primer sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactiplantibacillus plantarum* ST-III

菌株	引物序列
动物双歧杆菌乳亚种 BB-12	正向: 5'-GATGGACGAGGCCGGAGTGC-3'
	反向: 5'-CCTGCGTGAAGCGGAAGATG-3'
	探针: 5'-VIC-GATGTGCAGAATCAGGACGTG-TAMRA-3'
植物乳植杆菌 ST-III	正向: 5'-AGCTTGAAAGATGGCTTCGG-3'
	反向: 5'-GGTCGGCTACGTATCATTGC-3'
	探针: 5'-FAM-ACGCCGCGGGACCATCCAAA-TAMRA-3'

#### 1.3.5 实时荧光 PCR 反应

按照表 2 的 qPCR 反应体系, 将制备得到 20 μL 的 qPCR 反应体系, 置于荧光 PCR 仪上进行扩增, 50 °C持续 2 min, 95 °C预变性 3 min, 进而 94 °C持续 15 s、60 °C退火延伸 40 s, 总共 40 个循环。反应完成后利用 Excel 软件(Microsoft Office 专业增强版 2019)进行分析。以 10 倍梯度稀释纯菌液中提取的 DNA 作为标准品, 根据公式(1)计算出的标准品浓度的对数值为横坐标, 以对应循环数阈值(cycle threshold, Ct)值为纵坐标, 绘制 qPCR 标准曲线, 根据回归公式和 qPCR 检测 Ct 值计算未知样品的靶基因拷贝数。

表 2 qPCR 反应体系(20  $\mu$ L)  
Table 2 Reaction system of qPCR (20  $\mu$ L)

20 $\mu$ L 探针法 PCR 反应体系	使用量/ $\mu$ L
2 $\times$ 探针法 PCR 预混液	10
50 $\times$ ROX II	0.4
上游引物(10 $\mu$ mol/L)	0.4
下游引物(10 $\mu$ mol/L)	0.4
探针(10 $\mu$ mol/L)	0.2
DNA 模板(1~20 ng/ $\mu$ L)	3.0
RNase Free dH <sub>2</sub> O	5.6
总计	20.0

基因组 DNA 的拷贝浓度按公式(1)计算:

$$\text{细菌浓度}(C)/(\text{CFU/g}) = \frac{\text{基因拷贝数}/L}{[m \times 10^{(-9)}]/(n \times 660) \times (6.02 \times 10^{23})} \quad (1)$$

式中:  $m$  代表核酸蛋白仪测得的核酸浓度, ng/L;  $n$  代表细菌基因组的长度, bp, 根据 NCBI 上已经发布的测序数据, 植物乳杆菌基因组平均长度为  $3.23 \times 10^6$  bp, 动物双歧杆菌基因组平均长度为  $1.94 \times 10^6$  bp。

### 1.3.6 平板计数

将经过 10 倍系列稀释后的菌液各取 1 mL 加入无菌平皿中, 每个平皿加入 15~20 mL MRS 琼脂培养基, 在厌氧条件下于 36  $^{\circ}$ C 培养 48 h $\pm$ 2 h。选取菌落数在 30~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数来确定菌落总数, 每个稀释度的菌落数应取 2 个平板计数结果的平均值, 最终得到植物乳杆菌的计数结果(CFU/mL)。在选择 2~3 个连续适宜的稀释度后, 吸取 1 mL 样品匀液于灭菌平皿中, 每个稀释度需做两个平皿。将稀释液移入平皿后, 将冷却至 48~50  $^{\circ}$ C 的莫匹罗星锂盐和半胱氨酸盐酸盐 MRS 琼脂培养基倾倒入平皿 15~20 mL, 转动平皿均匀混合。培养基凝固后倒置于 36  $^{\circ}$ C 厌氧条件下培养 48 h, 可得双歧杆菌的计数结果(CFU/mL)。

### 1.3.7 人工添加样品及发酵乳样品的检测

选择无植物乳杆菌、双歧杆菌添加的发酵乳样品作为添加基质, 基质中添加了德氏乳杆菌保加利亚亚种、唾液链球菌嗜热亚种。采用传统的平板计数和 PMA-qPCR 方法分别检测发酵乳制品中活菌数。为保证发酵乳制品中存在的 PCR 抑制剂不会影响 qPCR 的结果, 称取待测发酵乳样品 1 g, 经 PBS 缓冲液稀释 50~100 倍后, 取 1 mL 加入到 2 mL 离心管中, 按照 1.3.1 制备受损菌液后, 细菌基因组提取试剂盒说明书进行 DNA 的提取, 最终将核酸溶解在 60  $\mu$ L TE [Tris-乙二胺四乙酸(Tris-ethylenediaminetetraacetic acid, Tris-EDTA)]缓冲液中。用核酸蛋白仪测定 DNA 浓度和纯度, 确保提取  $A_{260}/A_{280}$  在 1.7~2.0 之间。

## 1.4 数据处理

实际样本验证时, 采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计学分析, 两组数据间的比较采用独立样本  $T$  检验进

行分析,  $P < 0.05$  时存在显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 PMA 实验条件的确认

通过热致死法分别制备动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳杆菌 ST-III 的受损菌, 加入 PMA 处理, 并对 PMA 工作浓度、曝光时间等处理条件进行优化。由表 3、图 1 和图 2 可看出, 最终确定区分 PMA 处理受损菌的最

表 3 乳酸菌热致死时间的筛选

热致死时间/min	平板计数结果/(CFU/mL)
0	$1.2 \times 10^8$
5	0
10	0
20	0

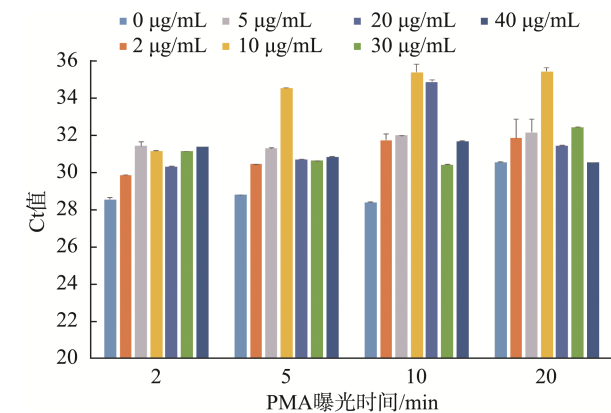


图 1 不同 PMA 浓度及曝光时间对动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 致死菌的影响

Fig.1 Effects of different PMA concentration and exposure time on lethal bacteria of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

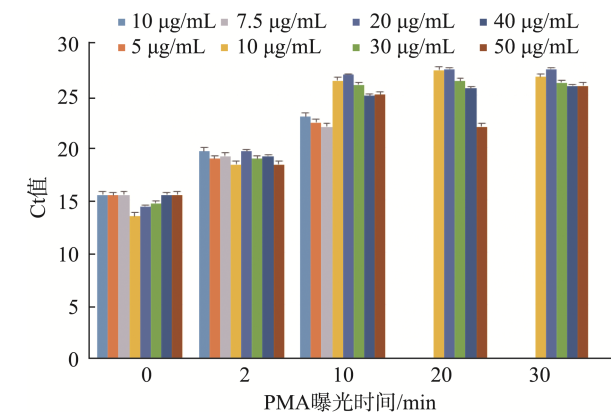


图 2 不同 PMA 浓度及曝光时间对植物乳杆菌 ST-III 致死菌的影响

Fig.2 Effects of different PMA concentration and exposure time on lethal bacteria of *Lactobacillus plantarum* ST-III

佳质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ , 处理菌液样品的最佳曝光时间为 10 min, 处理发酵乳样品的最佳曝光时间需要延长至 20 min。导致 PMA 处理时间差异的原因可能是发酵乳中蛋白质会影响蓝光的穿透率, 进而干扰 PMA 处理效果。

## 2.2 植物乳杆菌和双歧杆菌标准曲线的建立

将含有德氏乳杆菌保加利亚亚种、唾液链球菌嗜热亚种基础发酵乳培养 6 h 后, 分别添加高、中、低不同浓度的动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 标准菌株培养物, 混合物经 PMA 处理后, 提取核酸, 进行荧光 PCR 反应。以不同拷贝数的阳性模板的对数为横坐标、荧光定量 PCR 反应过程中达到的 Ct 值为纵坐标绘制标准曲线, 结果如图 3 和图 4 所示, 表明 Ct 值与 Log (DNA 拷

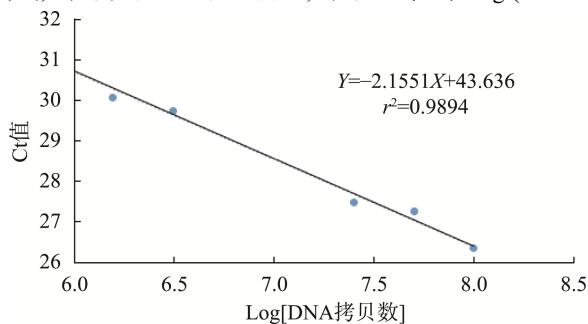


图3 动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 的标准曲线

Fig.3 Standard curve of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12

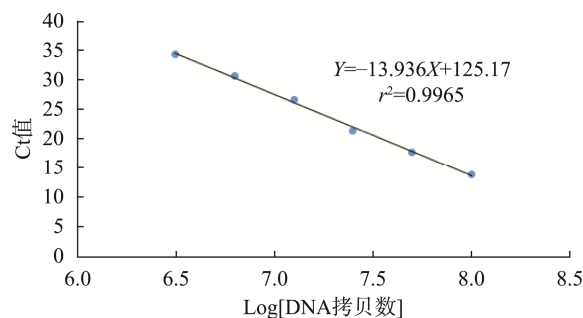


图4 植物乳植杆菌 ST-III 的标准曲线

Fig.4 Standard curve of *Lactobacillus plantarum* ST-III

贝数)存在良好的线性关系, 在培养物水平扩增的 Ct 值均未受到影响, 抗干扰能力较好。纯菌液稀释的最低浓度可达  $10^3$  CFU/mL, 而实际发酵乳中样品稀释的最低浓度是  $10^3$  CFU/mL, 低于  $10^3$  CFU/mL 时荧光信号杂乱, 因而该方法中发酵乳里动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 的最低检出限均为  $10^3$  CFU/mL。

## 2.3 实际样品的检测及重复性验证

动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 的标准菌株培养至  $10^8$  CFU/mL, 梯度稀释并提取 DNA 做阳性模板, PMA 处理后, 提取总 DNA, 进行荧光 PCR 扩增。以标准菌株浓度的对数值作为横坐标, 以对应的 Ct 值作为纵坐标, 绘制标准曲线。得出模板质量与 Ct 值之间的关系公式, 并求出  $R^2$  值。不同批次发酵乳样品经 PMA 处理后, 提取总 DNA 为模板, 进行荧光 PCR 反应。将扩增所得 Ct 值带入标准曲线方程, 并根据公式推算出实际样品中所添加的菌种数量。同时采用传统的平板计数法、PMA-qPCR 的方法同时检测不同批次发酵乳储存期间的活菌数变化, 结果如表 4 和表 5 所示。由于传统的平板计数法无法检测活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态下的细菌, 因此利用 qPCR 检测活菌数通常会略微高于平板计数。VBNC 状态是细菌的一种存活方式, 处于该状态下的细菌, 往往无法在常规培养基上形成菌落, 但仍具有代谢活性。在特定条件下, 处于 VBNC 状态的细菌可以重新激活、恢复在培养基上形成菌落的能力, 并恢复其原有的致病性<sup>[41]</sup>。

根据已建立的方法进行实际样品的检验, 不同批次的产品均可以同时检出动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III, 检测值与平板计数之间的差异较小, 证明在符合方法质控的要求下, 实验室实际达到的荧光 PCR 法重复性符合实验室规定的要求, 可准确地检测出样品中添加的活菌数量。

表4 发酵乳样品中动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 定量检测结果

Table 4 Quantitative test results of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in fermented milk samples

样品编号	贮藏时间/d	未经 PMA 处理			经 PMA 处理			平板计数 /(CFU/g)
		Ct 值	稀释倍数	qPCR 检测活菌数	Ct 值	稀释倍数	qPCR 检测活菌数	
样品 1	15	33.28	100	$1.6 \times 10^7$	33.63	100	$1.6 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$
样品 2	15	30.61	50	$1.4 \times 10^8$	31.08	50	$4.9 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$
样品 3	15	24.36	100	$1.3 \times 10^8$	25.18	100	$1.1 \times 10^7$	$6.3 \times 10^7$

表5 发酵乳样品中植物乳植杆菌 ST-III 定量检测结果

Table 5 Quantitative test results of *Lactobacillus plantarum* ST-III in fermented milk samples

样品编号	贮藏时间/d	PMA 未处理			PMA 处理			平板计数 /(CFU/g)
		Ct 值	稀释倍数	qPCR 检测活菌数	Ct 值	稀释倍数	qPCR 检测活菌数	
样品 1	15	17.40	50	$1.3 \times 10^8$	18.63	50	$6.4 \times 10^7$	$5.1 \times 10^7$
样品 2	15	16.98	50	$1.7 \times 10^8$	17.57	50	$1.2 \times 10^8$	$6.0 \times 10^7$
样品 3	15	20.94	100	$2.3 \times 10^8$	21.10	100	$6.0 \times 10^7$	$3.5 \times 10^7$

实际样品检测结果表明, PMA 处理后的荧光 pCR 活菌数检出的样品结果与平板培养法结果无明显差异, 证明建立的方法是可行的。本研究建立了 PMA-PCR 计数方法, 并用此方法对常见的发酵乳体系进行检测, 将平板计数法的检测结果与两者对产品中活菌的检测结果进行对比, 最终实验结果证明该方法可以准确、快速地检测样品中的活菌数, 并准确地检测出植物乳杆菌和双歧杆菌的含量。检测准确性高、重复性好, 与国标法对比, 两种检测结果与平板计数法一致, 该方法可以用于发酵乳中植物乳杆菌和双歧杆菌的定量检测, 成为企业监控发酵乳中乳酸菌含量的快速检测方法。

### 3 结论与讨论

本研究采用 PMA 和 qPCR 相结合的方法, 成功建立了同时快速检测发酵乳中动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 的定量方法。动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 经过 PMA 处理后, 动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 受损菌的最佳质量浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 处理菌液样品的最佳曝光时间为 10 min。检测结果与传统的平板计数法无明显差异。在方法优化过程中, 研究人员设计了特异性基因序列的引物探针, 并验证了其特异性。通过优化 PMA 反应条件、建立标准曲线以及验证灵敏度, 研究人员成功实现了对发酵乳样品中动物双歧杆菌乳亚种 BB-12 和植物乳植杆菌 ST-III 菌株数量的定量检测。

本研究为发酵乳产品中益生菌的定量检测提供了一种快速、准确的方法, 检测效率高、重复性好、准确度高, 并为相关领域的研究和实践带来了新的启示, 为进一步全面开展发酵乳、奶酪等乳制品甚至整个食品领域中乳酸菌的定量分析提供了数据支撑。

### 参考文献

- [1] O'SULLIVAN O, O'CALLAGHAN J, SANGRADOR-VEGAS A, *et al.* Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set [J]. *BMC Microbiology* 2009, 9(50): 1–9.
- [2] BAI Y, MENG Q, WANG C, *et al.* Gut microbiota mediates *Lactobacillus rhamnosus* GG alleviation of deoxynivalenol-induced anorexia [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(21): 8164–8181.
- [3] UTTARWAR RG, MEKONNEN SA, VAN BW, *et al.* Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and yogurt on mice during oral antibiotic administration [J]. *Microbiological Research*, 2024, 286: 127794.
- [4] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food [Z]. 2002.
- [5] REID G, DHIR R. Probiotics reiterating what they are and what they are not [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 1: 1–21.
- [6] LEE I, TOMITA S, KLEEREBEZEM M, *et al.* The quest for probiotic effector molecules—unraveling strain specificity at the molecular level [J]. *Pharmacological Research*, 2012, 69(1): 1–14.
- [7] 张玉律. 鼠李糖乳杆菌生长代谢特性与多位点序列分型的相关性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.  
ZHANG YL. Study on correlation between growth and metabolism characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* and multilocus sequence typing [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2019.
- [8] 虞星彤. 基于 DNA 屏蔽和 qPCR 的乳酸菌菌株水平活菌计数研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2022.  
YU XT. DNA shielding and qPCR based live bacteria enumeration of *Lactobacillus* strains at the level [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2022.
- [9] YU P, JIANG Y, PAN Y, *et al.* Strain-specific effect of *Streptococcus thermophilus* consumption on host physiology [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2023(10).
- [10] 北京热心肠生物技术研究院有限公司. 2023 肠道产业发展白皮书[Z]. 2023.  
Beijing Warm-hearted Biotechnology Research Institute Co., Ltd.. 2023 White Paper on intestinal industry development [Z]. 2023.
- [11] TUOHY KM, PROBERT HM, SMEJKAL CW, *et al.* Using probiotics and prebiotics to improve gut health [J]. *Drug Discovery Today*, 2003, 8(15): 692–700.
- [12] RAJPUT IR, LI WF. Potential role of probiotics in mechanism of intestinal immunity [J]. *Pakistan Veterinary Journal*, 2012, 32(3): 303–308.
- [13] MOAYYEDI P, FORD AC, TALLEY NJ, *et al.* The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome a systematic review [J]. *Gut*, 2010, 59: 325–332.
- [14] 陈臣, 任婧, 周方方, 等. 一种快速定量检测益生菌制品中植物乳杆菌的方法[J]. *中国微生态学杂志*, 2013, 25(12): 1439–1443.  
CHEN C, REN J, ZHOU FF, *et al.* A rapid quantitative detection method of *Lactobacillus plantarum* in the probiotics products [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2013, 25(12): 1439–1443.
- [15] DICKSON EM, RIGGIO MP, MACPHERSON L. A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum* [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2005, 54: 299–303.
- [16] 刘笑笑, 李胜男, 樊慧梅, 等. 平板计数法测定传统发酵酸菜中乳酸菌检验结果不确定度的评定[J]. *东北农业科学*, 2021, 46(3): 126–129.  
LIU XX, LI SN, FAN HM, *et al.* Uncertainty evaluation of *Lactobacillus* in traditional fermented *Lepidium sativum* [J]. *Journal of Northeast Agricultural Sciences*, 2021, 46(3): 126–129.
- [17] FITTIPALDI M, NOCKER A, CODONY F, *et al.* Discrimination of infectious bacteriophage T4 from heat-damaged particles in water samples by propidium monoazide-qPCR [J]. *Water Resources Research*, 2012, 48(4): 1–5.
- [18] DENES T, ADAMS JL, KNORR D. Use of propidium monoazide-quantitative PCR to assess the sensitivity of *Helicobacter pylori* to acid stress in the presence of urea [J]. *Journal of Applied Microbiology* 2013, 115(1): 137–146.
- [19] SOEJIMA T, IIDA K, QIN YX. Discrimination of viable and dead *Legionella pneumophila* by ethidium monoazide bromide and two real-time PCR methods [J]. *Microbiology and Immunology*, 2012, 56(9): 643–646.
- [20] 卓玛, 钱炳旭, 吴晓东, 等. 非洲猪瘟病毒多重 PMA-qPCR 检测方法

- 的建立及应用[J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(4): 93-101.
- ZHUO M, QIAN BX, WU XD, *et al.* Establishment and application of a single-tube ASFV detection platform based on the multiplex PMA-qPCR technology [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(4): 93-101.
- [21] CHAI A, WANG Q, KANG H, *et al.* Rapid quantification of infectious cucumber green mottle mosaic virus in watermelon tissues by PMA coupled with RT-qPCR [J]. *Viruses*, 2022, 14(9): 2046.
- [22] STINSON LF, KEELAN JA, PAYNE MS. Characterization of the bacterial microbiome in first-pass meconium using propidium monoazide (PMA) to exclude nonviable bacterial DNA [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 68: 378-385.
- [23] 阳瑾, 丁宇, 于吕健, 等. PMA-qPCR 联用快速检测苹果中扩展青霉活菌[J]. 食品工业科技, 2023, 44(16): 331-338.
- YANG J, DING Y, YU LJ, *et al.* Rapid detection of viable *Penicillium expansum* in apple by PMA-qPCR [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(16): 331-338.
- [24] YANG Y, LIU Y, SHU Y, *et al.* Modified PMA-qPCR method for rapid quantification of viable *Lactobacillus* spp. in fermented dairy products [J]. *Food Analytical Methods*, 2021. DOI: 10.1007/s12161-021-02022-3
- [25] 盖冬雪, 任洪林, 卢士英, 等. 乳品中大肠杆菌 PMA-qPCR 活菌检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(2): 493-498.
- GE DX, REN HL, LU SY, *et al.* Establishment of PMA-qPCR assay for detection of viable *E. coli* in milk [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 43(2): 493-498.
- [26] 肖其胜, 杨捷琳, 杨惠琴, 等. 实时荧光 PCR 法鉴定食品中双歧杆菌[J]. 食品科学, 2016, 37(20): 177-182.
- XIAO QS, YANG JL, YANG HQ, *et al.* Identification of *Bifidobacterium* strains in foods by real-time PCR [J]. *Food Science*, 2016, 37(20): 177-182.
- [27] 赵一苹, 郭益文, 刘龙飞, 等. TaqMan-MGB 探针荧光定量聚合酶链式反应法检测酸奶制品中动物双歧杆菌 BB-12[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(24): 9362-9370.
- ZHAO YP, GUO YW, LIU LF, *et al.* Determination of animal *Bifidobacterium* BB-12 in yogurt products by TaqMan-MGB fluorescent quantitative polymerase chain reaction [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(24): 9362-9370.
- [28] 张力文, 王宗润, 吴秀丽, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测人粪便中双歧杆菌方法的建立及评价[J]. 吉林大学学报(医学版), 2014, 40(3): 686-691.
- ZHANG LW, WANG ZR, WU XL, *et al.* Establishment and evaluation of detection method of bifidobacteria in human fecal using real-time fluorescence quantitative PCR [J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2014, 40(3): 686-691.
- [29] SCARIOT MC, VENTURELLI GL, PRUDÊNCIO ES, *et al.* Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 264: 1-7.
- [30] UTTARWAR RG, MEKONNEN SA, VAN BW, *et al.* Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and yogurt on mice during oral antibiotic administration [J]. *Microbiological Research*, 2024, 286: 1-12.
- [31] JUNGENSEN M, WIND A, JOHANSEN E, *et al.* The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB-12® [J]. *Microorganisms*, 2014, 2: 92-110.
- [32] MERENSTEIN D, TAN TP, MOLOKIN A, *et al.* Safety of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* (*B. Lactis*) strain BB-12 supplemented yogurt in healthy adults on antibiotics: A phase I safety study [J]. *Gut Microbes*, 2015, 6(1): 66-67.
- [33] HASCHKE F, WANG W, PING G, *et al.* Clinical trials prove the safety and efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium* BB12 in follow-up formula and growing-up milks [J]. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 1998, 146(S1): S26-S30.
- [34] 郭本恒, 刘振民. 益生菌[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- GUO BH, LIU ZM. *Probiotics* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015.
- [35] 靳志强, 王延祥. 植物乳杆菌在人体肠道的益生特性[J]. 中国乳品工业, 2007(9): 30-34.
- JIN ZQ, WANG YY. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* in the human intestinal tract [J]. *China Dairy Industry*, 2007(9): 30-34.
- [36] JEUN J, KIM S, CHO S, *et al.* Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice [J]. *Nutrition*, 2010, 26: 321-330.
- [37] 陈绮, 雷文平, 肖茜, 等. 产胞外多糖植物乳杆菌 XN1904E 发酵乳特性研究[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(6): 4-8.
- CHEN Q, LEI WP, XIAO Q, *et al.* Characteristics of milk fermented by exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* XN1904E [J]. *China Dairy Industry*, 2020, 48(6): 4-8.
- [38] WANG J, FANG X, WU T, *et al.* Exopolysaccharide producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 as adjunct culture in cheddar cheese production [J]. *LWT-Food Science and Technology* 2018, 1: 1-32.
- [39] 刘玮, 邱崇顺, 何宇星, 等. 一株降解亚硝酸盐植物乳杆菌的生长特性及其在泡菜制作中的应用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(9): 119-125.
- LIU W, QIU CS, HE YX, *et al.* Growth characteristics of a nitrite-degrading *Lactobacillus plantarum* and its application in pickle production [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(9): 119-125.
- [40] 陈臣. 植物乳杆菌 ST-III 全基因组序列分析及其对低聚果糖代谢通路的解析[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- CHEN C. Characterization of the complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* ST-III and its pathways for fructooligosaccharides metabolism [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [41] 吴斌. 霍乱弧菌进入活体的非可培养状态的影响因素及调控机制[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2016.
- WU B. Factors influencing the entry of *Vibrio cholerae* into the viable but non-culturable state and regulatory mechanisms [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2016.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)