DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251222004
引用格式: 王英, 张嵘, 张瑜, 等. 鼓盖果粒酸奶相关酵母的分离、鉴定及实时荧光定量聚合酶链式反应检测方法建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(7): 325–333.
WANG Y, ZHANG R, ZHANG Y, *et al*. Isolation and identification of yeast in bulging fruit flavored yogurt and development of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction detection method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(7): 325–333. (in Chinese with English abstract).

鼓盖果粒酸奶相关酵母的分离、鉴定及实时荧光定量聚合酶链式反应检测方法建立

王 英[1*], 张 嵘[1], 张 瑜[1], 杨仁琴[2,3], 范琳琳[1], 刘小莉[1]
(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 南京 210014; 2. 扬州市扬大康源乳业有限公司, 扬州 225001; 3. 江苏省乳业生物工程技术研究中心, 扬州 213127)

摘 要: 目的 分离鉴定导致果粒酸奶鼓盖的污染酵母, 并针对主要污染酵母建立一种快速检测的方法。**方法** 从不同的鼓盖酸奶样品中分离酵母菌, 分析其产气特性, 利用分子生物学方法对分离株进行鉴定, 基于 *26S rDNA* 序列设计特异性引物, 应用 SYBR Green I 染料的实时荧光定量聚合酶链式反应法快速检测酵母。**结果** 从鼓盖的蓝莓果粒酸奶、芒果果粒酸奶和黄桃果粒酸奶的 3 个样品中分离出 9 株酵母, 经分子生物学方法鉴定为异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)、平常假丝酵母(*Pichia inconspicua*)、葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae*)和喜仙人掌毕赤酵母(*Pichia cactophila*), 其中葡萄牙棒孢酵母为主要优势酵母, 且产气能力最强。根据 *26S rDNA* 基因设计的引物特异性良好; 所构建的标准曲线相关系数均大于 0.99; 该方法检测酵母菌的灵敏度为 10^2 CFU/mL; 重复性检验中组内与组间的变异系数均小于 2%, 表明方法具有良好的可靠性与稳定性。**结论** 导致果粒奶产气的主要污染酵母为葡萄牙棒孢酵母, 构建的检测方法可用于果粒发酵乳酵母菌的快速检测, 为果粒发酵乳的食品安全提供了技术保障。

关键词: 鼓盖果粒酸奶; 污染酵母; 快速检测; 实时荧光定量聚合酶链式反应法

Isolation and identification of yeast in bulging fruit flavored yogurt and development of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction detection method

WANG Ying[1*], ZHANG Rong[1], ZHANG Yu[1], YANG Ren-Qin[2,3], FAN Lin-Lin[1], LIU Xiao-Li[1]
(1. *Institute Agro-product Processing*, *Jiangsu Academy of Agricultural Sciences*, *Nangjing* 210014, *China*; 2. *Yangzhou Yangda Kangyuan Dairy Co.*, *Ltd.*, *Yangzhou* 225001, *China*; 3. *Jiangsu Dairy Bioengineering Technology Research Center*, *Yangzhou* 213127, *China*)

ABSTRACT: Objective To separate and identify the contaminated yeast that causes the fruit yogurt to bulge and establish a rapid detection method for the main contaminated yeast. **Methods** Yeasts were isolated from different

收稿日期: 2025-12-22
基金项目: 2023 年江苏省乳业生物工程技术研究中心开放课题项目(KYRY2023004); 2024 年市级科技计划社会发展项目(YZ2024056)
第一作者/*通信作者: 王英(1978—), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品生物技术研究。E-mail: wy116009@126.com

samples of fermented yogurt and theirs gas production characteristics were also analyzed. Molecular biology methods were used to identify isolated strains. Specific primers were designed based on the *26S rDNA* sequence, and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction using SYBR Green I dye was applied for the rapid detection yeasts. **Results** The 9 yeast strains were isolated from 3 samples of *Vaccinium uliginosum* L. yogurt, *Mangifera indica* L. fruit yogurt and *Prunus persica* 'Yellow Peaches' fruit yogurt. The 9 yeasts were identified as *Wickerhammomyces anomalus*, *Pichia inconspicua*, *Clavispora lusitaniae* and *Pichia cactus* through molecular biology methods. Among them, *Clavispora lusitaniae* was the main dominant yeast and had the strongest gas production ability. The primer designed based on the *26S rDNA* gene had good specificity. The correlation coefficients of the constructed standard curves were all greater than 0.99. The sensitivity of this method for detecting yeast was 10^2 CFU/mL. The coefficient of variation within and between groups in the repeatability test was less than 2%, indicating that the method had good reliability and stability. **Conclusion** In this study, the main contaminating yeast causing gas production in fruit milk is *Clavispora lusitaniae*. The developed detection method can be used for rapid detection of yeast in fruit fermented milk. It provides a technical support for the food safety of fermented fruit milk.

KEY WORDS: bulging fruit flavored yogurt; contaminated yeast; rapid detection; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction

0 引 言

经乳酸菌发酵后的鲜牛乳生成酸奶，不仅含有牛奶的基础营养成分，而且富含乳酸菌活菌及其代谢产生的各种代谢产物，这些成分赋予酸奶调节肠道菌群、降血脂、降血糖、抗氧化损失等多种益生功能[1–4]。随着市场需求的多元化，含有蓝莓、芒果、草莓、苹果等各种果粒的酸奶出现消费市场上[5–7]。

酸奶的营养成分在赋予其价值的同时，也提高了微生物污染的风险[8–9]，其酸性环境抑制了大部分细菌，使得具有耐酸能力的酵母和霉菌成为关键污染源[10–11]。研究证实，腐败酵母能耐受高糖、酸性及高温等多种胁迫环境[12]。酵母污染不仅能引发食品变质，部分酵母菌还具有致病性，危害健康[13–16]。果粒酸奶中典型的酵母污染症状是导致发酵乳产品发生涨袋鼓包[17–19]。研究酸奶胀包产品中污染酵母菌的结果显示，葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae*)、假丝酵母(*Candida* spp.)、季也蒙毕赤酵母(*Meyerozyma guilliermondii*)、毕赤酵母(*Pichia* spp.)等是主要的污染酵母[20–24]。如何快速检测并控制果粒发酵乳中酵母菌等微生物的污染、保障产品品质，成为发酵乳安全生产的重点研究内容。

实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitive polymerase chain reaction, RT-qPCR)技术具有卓越的检测特异性和极高的灵敏度[25–26]，在食源性致病菌、寄生虫的快速检测和转基因食品的检测等方面广泛应用[27–29]。SYBR Green I 染料在游离状态下荧光微弱，一旦与 DNA 双链特异性结合，荧光信号显著增强，从而实现对扩增产物的实时检测[30–32]。

果粒奶中的果粒和胶体易包裹微生物，导致取样不均，酸奶高黏度也影响稀释和涂布操作，造成结果偏差较大。另外果粒酸奶样品中的脂肪、蛋白质、多糖和稳定剂等都是强效的 PCR 抑制剂，会严重干扰 DNA 扩增，导致假阴性结果。聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpolypyrroliddone, PVP)对蛋白质、多酚类物质具有特定的络合吸附作用[33]，能够高效去除复杂基质中的 PCR 抑制剂。

本研究从多种鼓盖的果粒酸奶样品中分离鉴定主要污染酵母，并对分离酵母的产气性能进行测定；提取果粒酸奶样品微生物总基因组 DNA 过程中，在试剂盒的裂解体系中额外添加 PVP；同时根据酵母的 *26S rDNA* 可变区设计特异性检测引物，利用 SYBR Green I 染料-RT-qPCR 建立一种用于检测果粒发酵乳中酵母菌的灵敏度高、特异性强、检验时间短的 qPCR 法，旨在为保障果粒发酵乳食品安全提供更有力的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株来源和鼓盖果粒酸奶

酸奶常用的乳酸菌，主要包括唾液链球菌嗜热亚种(*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*)、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)、副干酪乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus paracasei*)、干酪乳酪杆菌(*Lacticaseibacillus casei*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)各 1 株，酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、膜璞

毕赤酵母(*Pichia membranifaciens*)、马克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、东方伊萨维酵母(*Issatchenkia orientalis*)和鼓盖酸奶中分离的酵母菌株, 具体菌株信息见表 1。

表 1　实验菌株
Table 1　Experimental strains

序号	菌株名称	编号	来源
1	唾液链球菌嗜热亚种	1-6	发酵剂
2	德氏乳杆菌保加利亚亚种	D2	发酵剂
3	植物乳植杆菌	1-3	新疆酸奶
4	干酪乳酪杆菌	10-3	新疆酸奶
5	副干酪乳酪杆菌	LP-4	新疆骆驼奶
6	大肠埃希氏菌	ATCC25922	本实验室保藏
7	沙门氏菌	ATCC 51812	本实验室保藏
8	金黄色葡萄球菌	ATCC25923	本实验室保藏
9	酿酒酵母	2-9	蓝莓果
10	膜璞毕赤酵母	cmp	黑莓果酒
11	马克斯克鲁维酵母	N2-4	新疆酸奶
12	东方伊萨维酵母	N3-7	新疆

1.2　材料与试剂

鼓盖果粒酸奶: 来源于某公司的鼓盖黄桃果粒酸奶、蓝莓果粒酸奶和芒果果粒酸奶。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、孟加拉红培养基(北京陆桥技术有限公司); De Man-Rogosa-Sharpe (MRS)培养基(青岛海博生物科技有限公司); 2×Talent qPCR Premix (SYBR Green I)、酵母基因组 DNA 快速抽提试剂盒、细菌基因组提取试剂盒[天根生物科技(北京)有限公司]; Taq PCR Mix 预混液[生工生物工程(上海)股份有限公司]; 无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.3　仪器与设备

LRH-150 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); DSX18L-1 手提式高压蒸气灭菌器(上海申安医疗机械厂); SW-CJ-1C 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司); AllegraX-30RCentrifuge 冷冻离心机(贝克曼库尔特有限公司); UV-1800 紫外分光光度计(广州晓分仪器有限公司); T100 PCR 仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]; QuantStudio5 实时荧光 PCR 仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; SHA-B 水浴恒温振荡器(常州润华电器有限公司); BSA124S-CW 电子天平[精度 0.1 mg, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.4　实验方法

1.4.1　鼓盖果粒酸奶中污染酵母的分离

按照 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》第一法测定酸奶中酵母菌。取 25 g 产品置于 225 mL 磷酸盐缓冲液中, 进行梯度稀释, 取 1 mL 倾注孟加拉红培养基后于(28±1) ℃培养 5 d。采用结晶紫染色和显微镜观察的方法查看分离菌的细胞形态, 根据菌落形态、细胞形态和生长状态, 挑取不同单菌落于 PDA 上进行分离纯化培养(根据菌落形态和生长速度挑取单菌落进一步纯化, 采用结晶紫染色法进行菌体染色并利用显微镜观察菌体形态, 综合菌体形态、菌落形态和大小, 从鼓盖的蓝莓果粒酸奶、芒果果粒酸奶和黄桃果粒酸奶的 3 个样品中分离出 9 株酵母, 编号为 YN-1、YN-2、YN-5、YN-6、YN-7、YN-8、YN-9、YN-11 和 YN-12)。

1.4.2　污染酵母产气特定分析

采用杜氏试管法测定分离出的酵母的产气能力, 提取分离纯化后的单菌落接种与含有杜氏管的 PDA 液体的试管中, 置于 28 ℃培养箱中静止培养, 培养 14 h 观察杜氏管的充气情况。

1.4.3　总 DNA 提取

将乳酸菌、酵母菌株及分离菌株划线分别接种至孟加拉红培养基和 MRS 培养基上进行活化, 28~30 ℃培养 2~4 d, 传代接种两次。分别使用酵母基因组提取试剂盒和细菌基因组提取试剂盒进行基因组 DNA 的提取, 并在试剂盒的裂解液中添加 0.50%~2.00% (*m*/*V*)的聚乙烯吡咯烷酮, 具体提取步骤参照说明书。使用微量核酸蛋白测定仪对 DNA 的质量和浓度进行测定。提取 DNA 储存于–20 ℃备用。

1.4.4　分离酵母的鉴定

分子鉴定参考 KURTZMAN 等[34]的方法, 首先采用 26S 通用引物 NL1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'和 NL4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'对提取 DNA 进行扩增, 反应体系总体积为 25 μL: 12.5 μL Taq PCR Mix (2X, 含蓝染料)、上下游引物各 1 μL(质量浓度 μmol/L)、1 μL DNA 模板, 并用无菌超纯水补足至 25 μL, 经低速离心使液体集中于管底; PCR 扩增的反应条件: 95 ℃预变性 3 min, 随后进行 35 个循环(95 ℃变性 30 s, 57 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 60 s), 最后 72 ℃保温 10 min; 0.75%的凝胶电泳检测扩增结果。将符合预期的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 所得序列利用美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中的查询工具(BLAST)进行比对分析, 采用分子进化遗传分析(MEGA 5.0)软件建立系统发育树[35–36]。

1.4.5　检测引物的设计

根据分离出的酵母的鉴定结果, 依据酵母的 26S RNA gene 保守序列, 采用 NCBI 的引物设计工具设计检测引物, 通过引物的特异性检测结果, 选出 1 对特异性强的

引物为检测引物, 引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列信息如下: 正向引物: 3'-CAGACACGGTTTTACCGGGC-5', 反向引物: 3'-GCTTGCAACCATTACGCCAG-5'。

1.4.6 qPCR 法的建立

qPCR 法反应体系为 25 μL, 包括 2×Talent qPCR Premix (SYBR Green) 12.5 μL, 上下游引物各 1 μL (10 μmol/L), 分别以提取分离 9 菌株的总 DNA 为模板 1 μL, 无菌超纯水将体系补齐。反应条件为 95 ℃预变性 2 min, 95 ℃变性 30 s, 58 ℃退火 25 s, 并进行荧光信号采集, 68 ℃延伸 25 s, 共 40 个循环。

熔解曲线程序为 95 ℃加热 15 s, 60 ℃冷却 1 min, 逐渐加热 20 min 至 95 ℃, 并保持 15 s。

1.4.7 特异性检验

分别以提取嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌、发酵乳杆菌、嗜酸乳杆菌、大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌基因组 DNA 为模板, 应用本研究建立的 qPCR 方法, 使用特异性上下游检测引物进行扩增, 同时以无菌超纯水为模板设置空白对照, 验证引物的特异性。

1.4.8 PVP 添加提取 DNA 对 qPCR 的影响

取 25 mL 无酵母污染的蓝莓果粒奶, 人工污染 $(1.01\pm0.02)\times10^5$、$(1.01\pm0.02)\times10^4$ 和 $(1.01\pm0.02)\times10^3$ CFU/mL 的酿酒酵母, 提取 DNA 方法参照提取试剂盒, 在裂解步骤中的裂解液中以添加 2.0% (*m*/*V*) PVP 和不添加两种方法进行提取 DNA, 以提取 DNA 为模板, 应用建立的 qPCR 方法, 使用特异性上下游检测引物进行扩增, 检测两种方法提取 DNA 的扩增差异。

1.4.9 标准曲线和灵敏度检验

选取从鼓盖果粒酸奶中分离的产气能力强的 YN-1 为污染菌的代表菌株, 挑取单菌落接种至液体培养基中, 待菌液培养至对数生长期后, 将菌液浓度为 $(1.05\pm0.01)\times10^8$ CFU/mL, 使用液体 MRS 对菌液进行 10 倍梯度稀释, 共设置 8 个浓度。将不同浓度的菌液采用酵母基因组 DNA 试剂盒进行菌液 DNA 的提取。并设置 ddH_2O 为模板作为空白对照。同时对不同浓度的样品进行平板计数, 以菌液浓度的对数值为横坐标, 以 qPCR 检测的循环阈值(cycle threshold, Ct)为纵坐标建立标准曲线。以 Ct>35 定义为阴性结果。

1.4.10 稳定性与重复性检验

分别以 5 个梯度浓度的酵母菌基因组 DNA 为模板, 并采用不含 DNA 酶及 RNA 酶 H_2O 为空白对照, 采用建立的 qPCR 法进行检测, 每个浓度设置 3 个平行, 整个实验独立重复 3 次, 根据检测获得的 Ct, 计算各浓度水平下的平均值和标准偏差(standard deviation, SD)。方法的稳定性和重复性通过计算变异系数(coefficient of variation, CV)来评估, 按照公式(1)计算:

$$CV/\%=(SD/Ct\ 平均值)\times100\% \quad (1)$$

1.5 数据处理

实验中所有数据统计、制表及绘图均采用 Office 2016 进行。所涉及的实验数据均取 3 次重复实验的平均值。

2 结果与分析

2.1 鼓盖果粒酸奶中酵母的分离和鉴定

根据菌落形态和生长速度挑取单菌落进一步纯化, 采用结晶紫染色法进行菌体染色并利用显微镜观察菌体形态, 综合菌体形态、菌落形态和大小, 从鼓盖的蓝莓果粒酸奶、芒果果粒酸奶和黄桃果粒酸奶的 3 个样品中分离出 9 株酵母, 编号为 YN-1、YN-2、YN-5、YN-6、YN-7、YN-8、YN-9、YN-11 和 YN-12, 其菌落和菌体形态见图 1, 从图 1 中可以看出, 分离出的菌落多呈现典型性酵母菌落形态, YN-1、YN-2、YN-7、YN-8、YN-9 菌落颜色乳白, 表面圆润, 中间凸起, YN-5、YN-6、YN-11 和 YN-12 菌落颜色偏黄, 表面呈蜡状, 菌落形态规则, 呈圆形, YN-5 菌落圆形, 表面偏干, 有皱褶, 菌落边缘呈锯齿状。从菌体形态来看, 菌体大多呈现椭圆或棒状, 出芽生殖。

酵母菌的 *26S rDNA* 包含高度保守的序列, 中间隔着具有较大变异性的区域, 这些区域在种内高度保守, 但种间差异明显, 可用于鉴定酵母菌的种类。本研究中选择 *26S rDNA* 基因 D1/D2 区域序列进行菌种鉴定。分别以分离菌株 YN-1、YN-2、YN-5、YN-6、YN-7、YN-8、YN-9、YN-11 和 YN-12 基因组总 DNA 为模板, 采用 *26S rDNA* 基因 D1/D2 区域的通用引物进行 PCR 扩增, 得到约 500 bp 的特异性扩增产物。委托上海生物工程有限公司对扩增产物进行测序, 获得序列利用 NCBI 数据库中 BLAST 同源序列的搜索工具, 对所得序列进行同源性比对, 并下载同源性相近的序列, 利用 MEGA 5.0 软件对测定序列和同源序列进行比较分析, 并用 Neighbor-Joining 方法进行构建分子系统树, 结果见图 2, 从图 2 中可以看出, YN-5 与异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)自然聚为一支, 且自展值为 100, YN-7 和 YN-12 与平常假丝酵母(*Pichia inconspicua*)自然聚为一支, YN-2、YN-11、YN-1、YN-8 和 YN-9 与葡萄牙棒孢酵母, 但从分支来看, YN-2 和 YN-11 聚类更紧密, YN-6 与喜仙人掌毕赤酵母自然聚为一支。目前国际上通行的酵母菌鉴定依据主要是 *26S rDNA* 基因 D1/D2 区域的序列组成[37], 种内不同菌株之间 D1/D2 序列差异应该在 1%以内, 如果株间该序列碱基差异在 1%以上则基本可以判定为不同种类[38]。从表 2 的序列比对结果可以看出, 分离菌株与已知对应的菌株 *26S rDNA* 基因 D1/D2 序列相似性在 99%以上, 因此, 把分离菌株 YN-5 鉴定为异常威克汉姆酵母, YN-7 和 YN-12 鉴定为平常假丝酵母, YN-2、YN-11、YN-1、YN-8 和 YN-9 鉴定为葡萄牙棒孢酵母, YN-6 鉴定为喜仙人掌毕赤酵母。

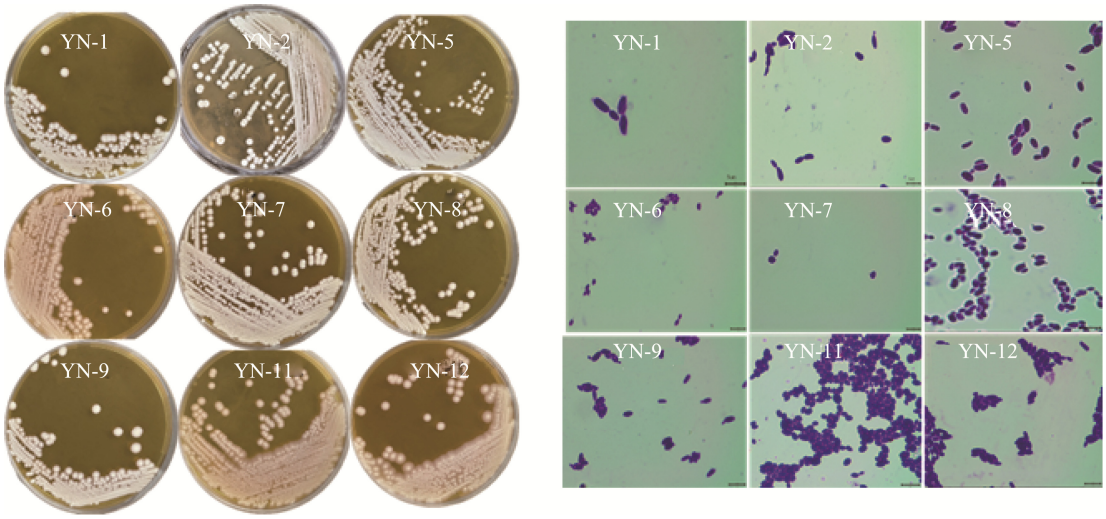


图 1　分离菌株的菌落(A)和菌体形态(×1000 倍)(B)

Fig.1　Colony (A) and bacterial morphology (×1000) (B) of isolated strains

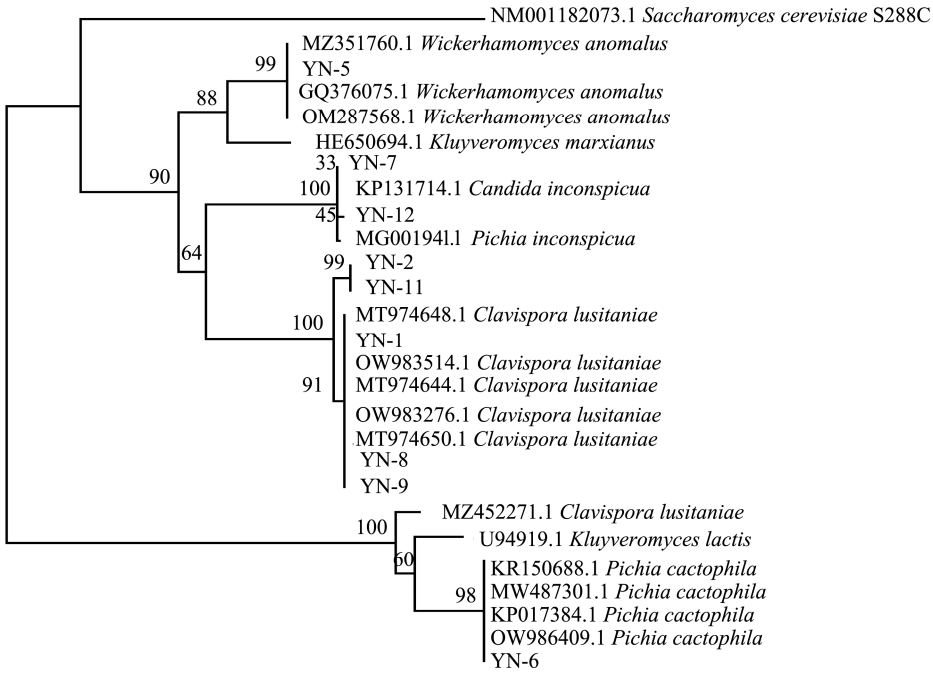


图 2　基于 *26S rDNA* 序列的系统发育树

Fig.2　Phylogenetic tree based on *26S rDNA* sequences

表 2　分离菌株序列比对结果

Table 2　Sequence alignment results of isolated strains

菌株编号	比对结果	序列一致度/%	查询覆盖度/%	比对菌株序列登录号	分离菌株鉴定结果
YN-5	异常威克汉姆酵母 CBS 5759	99.80	100	MH545921.1	异常威克汉姆酵母
YN-7	平常假丝酵母 CBS 180	99.84	100	MK394166.1	平常假丝酵母
YN-12	平常假丝酵母 CBS 180	100.00	100	MK394166.1	平常假丝酵母
YN-6	喜仙人掌毕赤酵母 TR 14	99.17	100	KP017390.1	喜仙人掌毕赤酵母
YN-8	葡萄牙棒孢酵母 D9	99.43	98	MZ452271.1	葡萄牙棒孢酵母
YN-9	葡萄牙棒孢酵母 XJURML-1	99.22	98	EF221825.1	葡萄牙棒孢酵母
YN-1	葡萄牙棒孢酵母 E1LL15	99.24	98	MW587731.1	葡萄牙棒孢酵母
YN-11	葡萄牙棒孢酵母 DMic 154963	100.00	100	MG009533.1	葡萄牙棒孢酵母
YN-2	葡萄牙棒孢酵母 50 Ca	100.00	100	LC534378.1	葡萄牙棒孢酵母

2.2 鼓盖果粒酸奶中分离酵母产气能力分析

当果粒酸奶在生产过程中带入了酵母，酵母在营养丰富的酸奶中进行生长代谢，部分酵母可消耗糖类物质产生代谢产物 CO_2，当 CO_2 积累到一定的量时就使酸奶产品产生鼓盖或涨袋现象，导致产品变质。因此，对鼓盖果粒奶中分离酵母的产气能力进行了测定，不同的酵母的代谢产生 CO_2 的能力不同，其中，YN-1、YN-8、YN-9 和 YN-11 的产气能力最强，在相同的培养条件下，杜氏管中已完全充满气体，其次是 YN-2 和 YN-5，杜氏管中气体已占管体积过半；YN-12 的杜氏管内只有少量气体，YN-6 和 YN-7 的产气能力最弱，在本研究的观察时间内，杜氏管中没有气体存在。另外，从液体试管中还可以看到，酵母在生长过程，YN-5 和 YN-6 在液体表明形成了一层膜璞状物质，其他几株酵母表面未见膜状物质生成。在果粒酸奶中，由于果粒的加入，使酵母菌污染的机会大大提高[39-40]。在适宜的条件下酵母菌大量繁殖，会使酸奶再度发酵，其中的糖分被转换为酒精和 CO_2，致使产品胀袋[17−18]。在本研究中，分离出的 9 株酵母，其产气能力存在明显差异，其在酸奶中导致产品涨袋的能力也会存在明显的差别。

2.3 qPCR 方法的建立及检测引物的特性

以来源于鼓盖果粒酸奶中的 9 株酵母，前期在酸奶和发酵果蔬中分离的 4 株酵母，同时包括酸奶发酵中常用的发酵剂菌株嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌，酸奶加工中常用的植物乳杆菌和发酵乳杆菌，另外也包括了酸奶检测中常检测的两种菌，大肠杆菌和金黄色葡萄球菌，分别以这些菌的 DNA 为模板，以设计的检测引物为扩增引物，加入 2×Talent qPCR Premix (SYBR Green)，进行 qPCR 检测，扩增结果如图 3 所示，从图 3 中可以看出，检测的 13 株酵母都有检出荧光信号，有明显的扩增曲线，从扩增曲线可以看出该方法具有良好的指数增长阶段以及平台期，Ct<35，判定为阳性结果，其他非酵母菌株均未产生假阳性结果。以上结果表明，本研究设计检测引物的特异性良好，可以针对性检测低温酸乳中的酵母菌。

2.4 标准曲线和灵敏度的检测

酵母菌标准曲线方程为 $Y = -2.6987X + 37.859$ (r^2 = 0.9941)，斜率为−2.6987，相关系数 r^2=0.9941，拟合程度良好。随着酵母菌悬液浓度降低，Ct 也逐渐降低，且两者之间具有良好的线性关系。如图 4 所示，酵母菌在 10^2~10^8 CFU/mL 浓度范围内均有明显的扩增曲线，能检测到的最低浓度为 10^2 CFU/mL，表明该方法灵敏度较高。在检测市售样品时，可以根据标准曲线，通过检测所得到的 Ct 可推算出样品中酵母菌的污染程度。

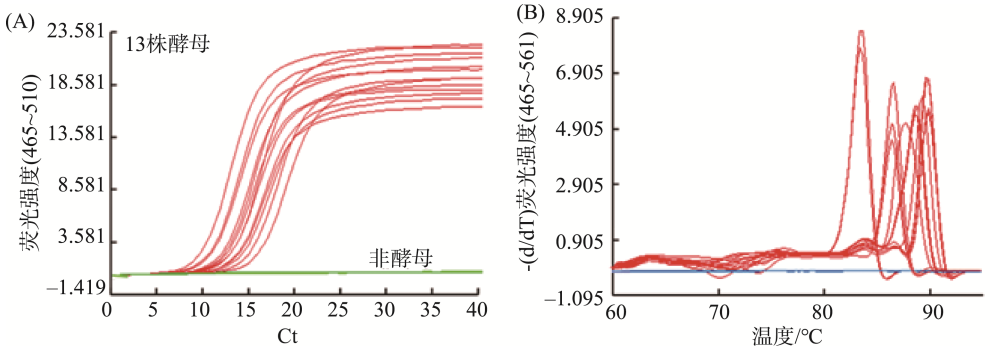


图 3 qPCR 扩增曲线(A)和溶解曲线(B)

Fig.3 qPCR amplification curves (A) and dissolution curves (B)

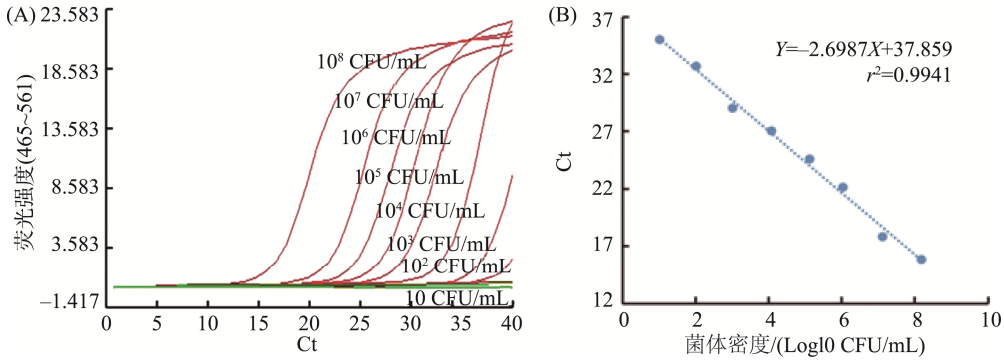


图 4 qPCR 灵敏度(A)以及标准曲线(B)

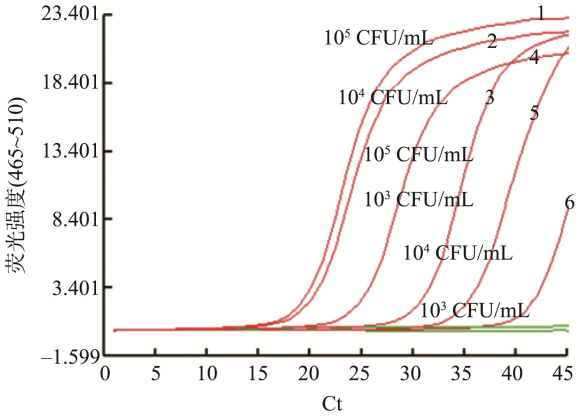
Fig.4 qPCR sensitivity (A) and standard curves (B)

2.5　PVP 添加提取 DNA 对 qPCR 扩增效率的影响

以两种方法的提取的 DNA 为模板的 qPCR 扩增结果见图 5, 从图 5 中可以看出, 在相同的菌浓度条件下, 在提取的过程中, 添加了具有吸附蛋白和酚类物质性能的 PVP, 其提取的 DNA 扩增曲线要比直接使用试剂盒提取样品的 DNA 的扩增效率要提高许多, 菌浓度为 10^3 CFU/mL 的样品, PVP 添加提取 DNA 的 qPCR 的 Ct 值为 27.3, 仍然可以检测到, 但利用常规的 DNA 提取方法的检测结果为阴性, 因此, 当添加了 PVP, 可以提高 qPCR 扩增效率, 增加检测的灵敏度。

2.6　方法稳定性与重复性

利用所建立的 qPCR 方法对不同批次和浓度的酵母菌 DNA 进行组内和组间检测, 如表 3 所示, 在检测的菌浓度范围内, Ct 位于 15 和 35 范围之内; 另一方面, 该方法 Ct 批次内与批次间重复性实验结果的 CV<2%, 结果表明该方法具有良好的稳定性与可靠性。



注: 1~3 扩增曲线为以添加 PVP 提取 DNA 为模板, 4~6 扩增曲线为不添加 PVP 提取 DNA 为模板。

图 5　PVP 添加提取 DNA 对 qPCR 扩增效率的影响

Fig.5　Effects of adding PVP to extract DNA on qPCR amplification efficiency

表 3　qPCR 检测酵母方法的稳定性和重复性检验结果

Table 3　Results of stability and repeatability tests for the qPCR assay in yeast detection

酵母菌浓度/(CFU/mL)	组内			组间		
	Ct 平均值	SD	CV/%	Ct 平均值	SD	CV/%
10^2	33.27	0.34	1.01	33.30	0.30	0.89
10^3	29.37	0.26	0.87	29.07	0.39	1.33
10^4	27.32	0.20	0.73	27.59	0.29	1.04
10^5	25.09	0.34	1.34	25.20	0.24	0.97
10^6	21.54	0.41	1.88	22.11	0.16	0.74
10^7	16.72	0.14	0.81	16.69	0.10	0.59
10^8	15.75	0.09	0.55	15.52	0.14	0.88

3　讨论与结论

本研究基于酵母的 *26S rDNA* 基因设计了特异性的检测引物, 应用 SYBR Green I 染料, 通过特异性、灵敏性、重复性和准确性的分析, 建立了特异性良好、标准曲线相关系数大于 0.99 的果粒酸奶中酵母检测方法, 与张婕等[19]研究的基于伸长因子(elongation factor-1α, EF-1α)序列的设计的特异性引物建立的检测方法的灵敏度相当, 但本研究在 10^2~10^8 CFU/mL 浓度范围内, 菌液浓度的对数值与 Ct 具有良好的线性关系。另外, 本研究的所涉及的样品为果粒酸奶, 样品的物质基质更复杂, 其中的脂肪、蛋白质、多糖和稳定剂等都是强效的 PCR 抑制剂, 会严重干扰 DNA 扩增, 导致假阴性结果, 为解决此类问题, 在基因组提取试剂盒的裂解液中, 添加了 0.5%~2% (*m*/*V*)的聚乙烯吡咯烷酮, 提升了 DNA 的纯度, 提高了 qPCR 扩增效率。因此本研究建立的方法更适合含有果粒等的复杂物质基质型酸奶。

发酵乳在贮存和销售等过程中出现胀包、鼓盖现象一般是由于污染了酵母菌[17]。针对发酵乳中酵母菌的研究结果显示, 假丝酵母、毕赤酵母、棒孢酵母、孢圆酵母、季也蒙酵母和克鲁维酵母是主要存在的酵母种类[21,19–22]。添加水果的发酵乳酵母污染问题更为突出, 王雯等[24]对我国江苏地区发酵乳中酵母菌的污染状况的研究结果显示, 风味(果粒)发酵乳的酵母菌污染率(19.15%), 明显高于原味发酵乳的酵母菌污染率(1.89%)。SENSES-ERGUL 等[41]从添加水果的发酵乳中主要分离到假丝酵母, 其中香蕉发酵乳主要为近平滑假丝酵母和葡萄球菌, 草莓发酵乳主要为克柔假丝酵母菌、郎比可假丝酵母和乳酒假丝酵母。本研究从鼓盖的蓝莓果粒酸奶、芒果果粒酸奶和黄桃果粒酸奶的 3 个样品中分离出 9 株酵母, 分别为异常威克汉姆酵母、平常假丝酵母、葡萄牙棒孢酵母和喜仙人掌毕赤酵母, 其中葡萄牙棒孢酵母为主要优势酵母, 同时对分离菌株的产气能力进行了分析, 发现葡萄牙棒孢酵母产气能力最强。结合前人的研究结果, 可以看出, 导致不同的果粒酸奶胀

包的酵母种类多种多样，但不同的酵母其产气能力存在明显差异，导致产品胀包的程度也不同，如何针对产气能力强的酵母建立更精确的检测方法是后期的主要研究方向。

参考文献

[1] 张会, 孙晓琛, 夏依旦•买买提, 等. 乳酸菌对羊乳酸奶体外降血糖和抗氧化功能的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(18): 156–163.
ZHANG H, SUN XC, XIAYIDAN MMT, *et al*. Effects of lactic acid bacteria fermentation on hypoglycemic and antioxidant activities of goat yoghurt *in vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(18): 156–163.

[2] 孙晓琛, 张晓千, 李玲玉, 等. 降血脂功能乳酸菌的体外筛选、驯化及鉴定[J]. 食品工业科技, 2024, 45(24): 125–132.
SUN XC, ZHANG XQ, LI LY, *et al*. *In vitro* screening, domestication and identification of lipid-lowering functional lactic acid bacteria [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(24): 125–132.

[3] SHORI AB. Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk [J]. Journal of Taibah University for Science, 2013, 7: 202–208.

[4] CHAKMA S, ACHARJEE MR, TONNI IJ, *et al*. Probiotic potential of yogurt: Exploring lactic acid bacteria for health-enhancing benefits [J]. Applied Food Research, 2025, 5: 101383.

[5] 康超, 刘凤听, 伍淑婕. 响应面法优化荸荠百香果果奶工艺[J]. 食品工业, 2021, 42(4): 192–196.
KANG C, LIU FT, WU SJ. Optimization of process condition of water chestnut and passion fruit milk beverage by response surface methodology [J]. Food industry, 2021, 42(4): 192–196.

[6] NING X, LUO ZH, CHEN ZL. Fortification of set yogurt with passion fruit juice: Effects on fermentation kinetics, physicochemical properties, and functionality [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(4): 4084–4093.

[7] ZHONG ML, MIAO YZ, LAN Y. Effects of exidia yadongensis olysaccharide as emulsifier on the stability, aroma, and antioxidant activities of fat-free stirred mango buffalo yogurt [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 276: 133785.

[8] 柴艳兵, 李兴佳, 张耀广, 等. 酸奶生产中酵母菌分布及产品污染研究[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(5): 61–64.
CHAI YB, LI XJ, ZHANG YG, *et al*. Yeast distribution in yogurt producing process and spoilage products [J]. China Dairy Industry, 2018, 46(5): 61–64.

[9] 杜莹, 潘佩平, 李敏, 等. 酸奶中常见真菌的分离、鉴定与快速检测[J]. 中国酿造, 2018, 37(4):57–60.
DU Y, PAN PP, LI M, *et al*. Isolation, identification and rapid detection of common fungi in yogurt [J]. China Brewing, 2018, 37(4): 57–60.

[10] 张祁, 裴晓燕, 黄小平. 发酵乳霉菌酵母污染和控制的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(5): 1133–1137.
ZHANG Q, PEI XY, HUANG XP. Research progress of contamination and control of moulds and yeasts in fermented milk [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(5): 1133–1137.

[11] 赵泰霞, 孟祥晨, 张巧云. 酸奶中污染酵母菌和霉菌的分离及鉴定[J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 189–192.
ZHAO TX, MENG XC, ZHANG QY. The isolation and identification of yeast and molds from the spoilage yogurts [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(2): 189–192.

[12] 张诺, 邹纯, 余启明, 等. 现制饮料中腐败微生物及其检测与防控技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(9): 1–10.
ZHANG N, ZOU C, YU QM, *et al*. Research progress of spoilage microorganism and its detection and control technology in freshly-made beverages [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(9): 1–10.

[13] 李芳, 王静, 李雯, 等. 2017—2018 年我院侵袭性真菌感染的病原谱及药敏性分析[J]. 西北药学杂志, 2021, 36(4): 674–677.
LI F, WANG J, LI W, *et al*. Pathogenic spectrum and susceptibility profile of invasive fungal infection in our hospital from 2017—2018 [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2021, 36(4): 674–677.

[14] PANDE A, NON LR, ROMEE R, *et al*. *Pseudozyma* and other non-Candida opportunistic yeast bloodstream infections in a large stem cell transplant center [J]. Transplant Infectious Disease, 2017, 19(2): e12664.

[15] SCHMIEDEL Y, ZIMMERLI S. Common invasive fungal diseases: An overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and Pneumocystis pneumonia [J]. Swiss Medical Weekly, 2016, 146: w14281.

[16] 刘丽苹, 王秋平, 刘健, 等. 一株从临床分离的奥默儿玉氏酵母的生物学特征及其致病毒力相关特性[J]. 菌物学报, 2023, 42(2): 484–494.
LIU LP, WANG QP, LIU J, *et al*. Biological characteristics and virulence-related properties of a clinical *Kodamaea ohmeri* strain [J]. Mycosystema, 2023, 42(2): 484–494.

[17] 张雪, 赵玉娟, 张莉, 等. 胀包酸奶有害酵母菌的分离鉴定[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(1): 27–30.
ZHANG X, ZHAO YJ, ZHANG L, *et al*. Isolation and identification of harmful yeasts from bulging package yogurt [J]. China Dairy Industry, 2014, 42(1): 27–30.

[18] 卢鑫. 引起酸奶涨包的马克思克鲁维酵母的分离鉴定及特性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
LU X. Study of isolation, identification and properties of *Kluyveromyces marxianus* from deteriorative yogurt [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2019.

[19] BUEHLER AJ, EVANOWSKI RL, MARTIN NH, *et al*. Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(11): 8814–8825.

[20] 赵兴文, 董雪凤, 初雅洁. 酸奶鼓盖原因分析研究[J]. 中国奶牛, 2024, 4: 46–49.
ZHAO XW, DONG XF, CHU YJ. Analysis and study on the causes of yogurt bulging [J]. China Dairy Cattle, 2024, 4: 46–49.

[21] GARNIER L, VALENCEBERTEL F, PAWTOWSKI A, *et al*. Diversity of spoilage fungi associated with various french dairy products [J]. International Journal Food Microbiology, 2017(241): 191–197.

[22] HERNÁNDEZ A, PÉREZ-NEVADO F, RUIZ-MOYANO S, *et al*. Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages? [J]. International Journal Food Microbiology, 2018(286): 98–110.

[23] PETRA W, RIVAS EM, ELENA DP, *et al*. Assessment of the factors contributing to the growth or spoilage of *Meyerozyma guilliermondii* in organic yogurt: Comparison of methods for strain differentiation [J]. Microorganisms, 2015, 3(3): 428–440.

[24] 王雯, 陈晓蔚, 张蕾. 江苏地区酸奶中酵母菌的污染状况及货架期内污染状态变化分析[J]. 检验检疫学刊, 2013, 23(3): 35–37.

WANG W, CHEN XW, ZHANG L. Yeasts in the spoilage yogurts in Jiangsu province and the spoilage status during the shelf-life [J]. J Inspect Quar, 2013, 3: 35–37.

[25] 丁博群, 刘珊娜. 荧光定量 PCR 技术在食品快速检测中的应用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(7): 366–373.
DING BQ, LIU SN. Application of real-time quantitative PCR technology in food rapid detection [J]. Science and Technology of Food Industyr, 2021, 42(7): 366–373.

[26] 王树茂, 王桂花, 王安冉, 等. 针对猪瘟病毒 *Erns* 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医科学, 2023, 53(12): 1488–1494.
WANG SM, WANG GH, WANG ANR, *et al*. Establishment and application of a real-time fluorescent quantitative PCR assay for the detection of Erns gene of swine fever virus [J]. Chinese Veterinary Science, 2023, 53(12): 1488–1494.

[27] TEMESGEN TT, ROBERTSON LJ, TYSNES KR. A novel multiplex real-time PCR for the detection of *Echinococcus multilocularis*, *toxoplasma gondii*, and *Cyclospora cayetanensis* on berries [J]. Food Research International, 2019, 125: 108636.

[28] TAN LL, AHMED SA, NG SK, *et al*. Rapid detection of porcine DNA in processed food samples using a streamlined DNA extraction method combined with the SYBR Green real-time PCR assay [J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125654.

[29] 王一霖, 王燕, 梁纤纤, 等. 肺炎克雷伯菌与链球菌双重 PCR 检测方法的构建[J]. 草食家畜, 2024(3): 51–59.
WANG YL, WANG Y, LIANG XX, *et al*. Construction of a dual PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Streptococcus pneumoniae* [J]. Grass-Feeding Livestock, 2024(3): 51–59.

[30] 陈佳圣, 赵天琪, 刘东华, 等. 鸡圆环病毒 SYBR Green I实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国家禽, 2024, 46(1): 56–61.
CHEN JS, ZHAO TQ, LIU DH, *et al*. Development of SYBR Green I fluorescence quantitative PCR method for detection of chicken circovirus [J]. China Poult, 2024, 46(1): 56–61.

[31] 刘利强, 沈洁, 刘建钗, 等. 鸡烟曲霉菌 SYBR Green I荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(9): 1135–1139.
LIU LQ, SHEN J, LIU JC, *et al*. Development of SYBR Green I real-time PCR for detecting *Aspergillus fumigatus* in chicken [J]. Chinese Veterinary Science, 2017, 47(9): 1135–1139.

[32] 孔文迪, 陈曦, 杨金先, 等. 美洲鳗鲡腺瘤病毒(AEAdoV)普通 PCR 和 SYBR Green I实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J]. 水产学报, 2024, 48(4): 214–221.
KONG WD, CHEN X, YANG JX, *et al*. Establishment and application of routine PCR and SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR for detection of American eel adomavirus [J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(4): 214–221.

[33] 严鑫, 胡陆军, 邹永芳, 等. 果酒的澄清度与色泽稳定性研究进展[J]. 酿酒科技, 2025, 9: 107–116.
YAN X, HU LJ, ZOU YF, *et al*. Research progress in clarity and color stability of fruit wine [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2025, 9: 107–116.

[34] KURTZMAN CP, ROBNETT CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5’ end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(5): 1216–1223.

[35] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406–425.

[36] PAGE RDM. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers [J]. Bioinformatics, 1996, 12(4) : 357–358.

[37] KURTZMAN CP, ROBNETT CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(4): 331–371.

[38] FELL JW, BOEKHOUT T, FONSECA A, *et al*. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(3): 1351–1371.

[39] TRANQUILLINI R, SCARAMUZZA N, BERNI E. Occurrence and ecological distribution of heat resistant moulds spores (HRMS) in raw materials used by food industry and thermal characterization of two talaromyces isolates [J]. Internal Journal of Food Microbiology, 2016(242): 116–123.

[40] 张捷, 李献, 张瑞, 等. SYBR Green I 染料-实时荧光定量聚合酶链式反应法检测发酵乳中的霉菌和酵母含量[J]. 食品安全质量检测学报 2024, 15(16): 31–38.
ZHANG J, LI X, ZHANG R, *et al*. Determination of mold and yeast in fermented milk by SYBR Green I dye-real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(16): 31–38.

[41] SENSES-ERGUL S, KARASU-YALCIN S, OZBAS ZY. Molecular identification of some yeast strains isolated from various sugary foods [J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(4): 1501–1516.

(责任编辑: 蔡世佳　韩晓红)