

# 发酵乳活性双歧杆菌种类快速识别及定量研究

王立平, 刘晓莉, 蔡雪凤, 曹悦, 张帆  
(国家食品质量监督检验中心, 北京 100094)

**摘要:** 本文建立了发酵乳制品中双歧杆菌种类和数量快速测定方法。以发酵乳中双歧杆菌为靶标, 采用 PCR-DGGE 技术快速识别双歧杆菌种类; 采用 Real-Time PCR 手段测定双歧杆菌数量。研究表明, PCR-DGGE 能准确、快速鉴别双歧杆菌种类, 检出限为  $10^5$  CFU/g; Real-Time PCR 能准确、快速定量双歧杆菌, 检出限为  $10^4$  CFU/g。该方法可用于发酵乳中双歧杆菌的快速识别和定量。

**关键词:** 发酵乳; 双歧杆菌; PCR-DGGE; Real-Time PCR

文章编号: 1673-9078(2013)4-858-862

## Isolation of *Bifidobacteria* from Yoghurts and Assessment of the *Bifidobacterial* Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR

WANG Li-ping, LIU Xiao-li, CAI Xue-feng, CAO Yue, ZHANG Fan

(China National Food Quality & Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China)

**Abstract:** In this article, a rapid identification and numberation method for *bifidobacterium* in fermented milk products was established. Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) technique was used to identify *Bifidobacterium* present in commercial probiotic yoghurts. Real-Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR) technique was used to detect *Bifidobacteria*. The results showed that PCR-DGGE assays enabled identification of the species of *bifidobacterium* initially present in commercial fermented milk products with a detection threshold of  $10^5$  cells per gram. Real-Time PCR assays enabled numbering *Bifidobacterium* with a detection threshold of  $10^4$  cells per gram of product. Established PCR-DGGE analysis method was suitable for identification and detection of *Bifidobacterium* in commercial probiotic yoghurts.

**Key words:** fermented milk products; *Bifidobacterium*; PCR-DGGE; real-Time PCR

双歧杆菌是一种典型的益生菌, 因具有维持肠道内正常微生物菌群的平衡, 提高人体免疫力, 延缓衰老以及重要的营养功能等特点, 被广泛应用于乳品发酵生产中。目前我国市售的含双歧杆菌发酵乳制品中, 乳酸菌菌株组成主要有两种, 其一为发酵乳基础发酵剂(嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌)中添加双歧杆菌; 另一种组合为基础发酵剂中添加双歧杆菌和嗜酸乳杆菌。

研究表明, 乳品中双歧杆菌含量在  $10^6$  CFU/mL 以上时, 才能发挥其应有的生理功效。发酵乳中双歧杆菌活菌数量及菌株类别是判断乳制品质量好坏和保健功能的重要指标<sup>[1-2]</sup>。

现有研究表明, 益生菌的益生性具有菌株特异性。因此, 对益生菌鉴定非常有必要到株的水平<sup>[3-4]</sup>。此观

点也获得了FAO/WHO的支持, 在准则中规定食品中的商用益生菌应鉴定到株的水平。同时, 对特定益生菌株的鉴定也为生产商提供了一个有用质控工具及对益生菌株的有效性和安全性进行跟踪。菌株鉴定也有助于监测和流行病学调查。

Lahtinen等研究表明, 益生菌制品在储藏期间, 其中所含有的双歧杆菌属会处于一种“休眠”状态<sup>[5]</sup>。目前对发酵乳中双歧杆菌检验标准方法仍为传统平板培养法, 费力、耗时<sup>[6]</sup>。所采用的选择性培养基中添加的抗生素类抑菌物质抑制菌体细胞重现性和灵敏性, 导致一些菌体细胞处于有代谢活力但难以培养状态<sup>[7]</sup>。近年来国内外也开展了利用分子生物学手段鉴别双歧杆菌的研究, 以期达到准确、快速地检测双歧杆菌制品<sup>[8-9]</sup>。变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术具有分辨率高、加样量小、重复性好、节约时间等优点可快速实施细菌种类识别鉴定。实时PCR(Real-Time PCR)技术因其高特

收稿日期: 2012-11-26

作者简介: 王立平(1968-), 女, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物

异性、高灵敏性、检测时间短、无污染等优点而备受推崇,广泛应用于混合样品的直接定量<sup>[10~11]</sup>。鉴于此,本研究将PCR-DGGE技术与Real-Time PCR技术相结合,建立更准确、可靠的快速测定发酵乳中双歧杆菌种类和数量技术手段和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

冷冻干燥的乳酸菌菌株首先转接于脱脂乳培养基中,37℃厌氧培养24h后,按2%厌氧过夜培养后用于后续试验。每次实验前,菌株均活化两次,以使菌株活力达到最大。

表1 实验菌株

Table 1 Bacterial strains used in this study

菌种名称	简写	编号	来源
嗜热链球菌	ST	1.2471	中国普通微生物菌种保藏中心
保加利亚乳杆菌	LB	1.4680	中国普通微生物菌种保藏中心
嗜酸乳杆菌	LA	1.1854	中国普通微生物菌种保藏中心
乳双歧杆菌	/	1.2226	中国普通微生物菌种保藏中心
短双歧杆菌	/	1.2213	中国普通微生物菌种保藏中心
动物双歧杆菌	/	1.2268	中国普通微生物菌种保藏中心
长双歧杆菌	/	1.2186	中国普通微生物菌种保藏中心

#### 1.1.2 培养基

##### 1.1.2.1 脱脂乳培养基

10.0 g 脱脂乳, 0.1 g 酵母浸膏, 90.0 g 水。采用115℃灭菌15 min。

##### 1.1.2.2 MRS 培养基

见 GB4789.35-2010<sup>[6]</sup>。

##### 1.1.2.3 MRS-莫匹罗星培养基

见 GB4789.35-2010<sup>[6]</sup>。

#### 1.1.3 仪器

PCR 仪, AB, 美国; 实时荧光 PCR 仪, AB 7300, 美国; 高速离心机, SIGMA, 德国; 核酸蛋白微量定量仪, NanoDrop, 美国; 变性凝胶梯度电泳仪, Bio-Rad, 美国。

#### 1.1.4 引物和探针

##### 1.1.4.1 PCR-DGGE引物

PCR采用细菌16S rDNA的V3区为靶序列的引物<sup>[12]</sup>。上游引物F357: 5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'下游引物518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'在F357的5'端添加一个40bp富含GC的夹子, 序列为5'-CGCCCCGCCGCGCCC-CGCGCCCGTCCCGCCGC CCCCCCCG-3'。目的片段大小约为200 bp。引物由上海Invitrogen公司合成。

##### 1.1.4.2 Real-Time PCR引物和探针

本试验所用引物和分子信标探针<sup>[13]</sup>均由上海Invitrogen公司合成。

正义引物: 5'-TCTGGCTCAGGATGAACGC-3'

反义引物: 5'-CACCGTTACACCGGGAATTC-3'

探针: 5'-FAM-CCAGGCATCCGGCATTACCACC CGTCCTGG-3'-DABCYL

使用前加无RNase去离子水配成100 μmol/L储备液。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 发酵乳中双歧杆菌平板计数方法

见GB4789.35-2010<sup>[6]</sup>。

##### 1.2.2 参考菌株DNA提取

用灭菌的接种环刮取半环上述中各参考菌株的纯培养物接种于9.0 mL灭菌水中。震荡混匀, 吸取1.0 mL于1.5 mL的倒伏管中, 3000 g离心15 min, 弃上清, 用天根DNA提取试剂盒提取DNA。核酸蛋白微量定量仪在260、280及234nm处评估DNA浓度及质量。-20℃冰箱中保存。

##### 1.2.3 发酵乳总DNA提取

称1.0 g样品于5.0 mL柠檬酸盐溶液(含10.0 mg蛋白酶E)置37℃水解3 h加625.0 μLSDS (8.0%), 37℃放置30 min后, 13000 g离心10 min, 弃上清, 天根DNA提取试剂盒提取DNA, -20℃冰箱中保存。

##### 1.2.4 PCR-DGGE分析

###### 1.2.4.1 PCR体系 (25.0 μL)

天根Mastermix 12.5 μL, 引物各1.0 μL, 模板DNA 200 ng(按体积折算), 用去离子水补足体积至25 μL。

###### 1.2.4.2 PCR反应条件

94℃预变性5 min; 94℃、20 S, 55℃、45 S, 72℃、1 min, 循环30次后, 72℃保温6 min, 置于4℃冰箱保存待用。PCR产物用2.0%的琼脂糖凝胶进行电泳, 检测PCR扩增目标片段。

###### 1.2.4.3 DGGE分析

制备8.0%聚丙烯酰胺凝胶, 其中变性剂浓度30~70%。电泳的条件: 温度为60℃, 电压为70 V, 电泳时间为16 h。缓冲液: 1×TAE。

##### 1.2.5 Real-Time PCR

###### 1.2.5.1 Real-time PCR 初步扩增体系

反应体系为25 μL。Master Mix: 10 μL; 上、下游引物(10 μmol/L): 各2 μL; 分子信标探针(5 μmol/L): 2 μL; probe Enhancer solution: 1.25 μL; DNA模板: 7.75 μL。实时荧光反应反应条件: 94℃×3 min→94℃×15s→40℃×35s→57℃×30s→68℃×40s, 40个循环。

注：有下划线的步骤表示在此温度下采集荧光信号。

### 1.2.5.2 绘制标准曲线

乳双歧杆菌标准株(1.2226)纯培养液提取DNA做阳性模板进行Real-Time PCR检测,以乳双歧杆菌标准株已知量的不同菌数对数值(Log CFU/mL)为横坐标,以反应过程中出现荧光信号的初始循环数(Ct)为纵坐标绘制标准曲线。

### 1.2.6 实际样品测定

从市场购买不同厂家含双歧杆菌及不含双歧杆菌的发酵乳产品,分别采用传统的平板菌落计数法、PCR-DGGE种类识别以及实时定量PCR测双歧杆菌的数量。SAS软件进行方差分析,并用邓肯氏极大复差法进行多重比较,检验误差水平为0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 DGGE 鉴定参考阶梯的建立

将参考菌株和样品提取DNA后进行PCR扩增,2.0%琼脂糖检测目标片段,结果见图1。无论是参考菌株还是样品均有目标条带生成,长度在200 bp左右。构建两个鉴定参考阶梯BB ladder 和Lac ladder。构成

BB ladder参考菌株为双歧杆菌属的不同种,分别是 *Bifidobacterium lactis*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium animalis*及*Bifidobacterium longum*。Lac ladder包括常见乳酸菌种类,主要种类有*S.thermophilus*、*L.bulgaricus*、*L.acidophilus*、*L.plantarum*及*L.casei*。从图1中可看出,双歧杆菌及乳酸菌各种DNA扩增条带在凝胶中因迁移距离不同而被清晰分开。

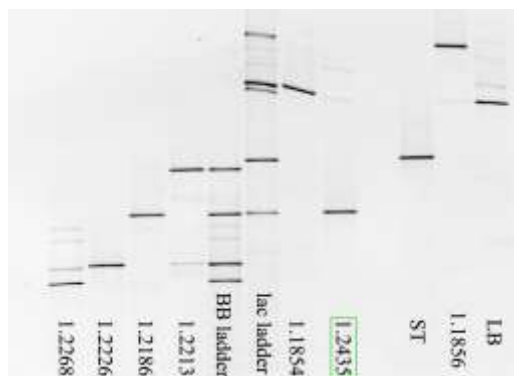


图1 双歧杆菌 DGGE 参考阶梯

Fig.1 Construction of the DGGE identification ladders of *Bifidobacterium*

表2 市售发酵乳制品测定结果 (log<sub>10</sub>CFU/g)

Table 2 Comparison of quantitative PCR, PCR-DGGE, and the culture method for detection and quantification of bifidobacteria in

yoghurts products					
生产厂家编号	产品编号	标签菌株组成	平板计数 (log <sub>10</sub> CFU/g)	Real-Time PCR (log <sub>10</sub> CFU/g)	DGGE-PCR 结果
A	1	<i>ST+LB+LA+B.lactis+B.longum</i>	8.01	8.24	<i>B. lactis</i>
	2	<i>ST+LB+ B. lactis</i>	7.35	7.44	<i>B. lactis</i>
	3	<i>ST+LB+LA+B. lactis</i>	4.12	4.01	-
	4	<i>ST+LB</i>	-	-	-
B	1	<i>ST+LB+LA+B. lactis</i>	7.25	7.54	<i>B. lactis</i>
	2	<i>ST+LB+LA+B. lactis</i>	3.65	-	-
	3	<i>ST+LB</i>	-	-	-
C	1	<i>ST+LB+LA+B. lactis</i>	7.54	7.29	<i>B. lactis</i>
	2	<i>ST+LB+LA+B. lactis</i>	5.40	5.58	<i>B. lactis</i>
	3	<i>ST+LB</i>	-	-	-
D	1	<i>ST+LB+LA+B. lactis</i>	2.93	-	-
	2	<i>ST+LB</i>	-	-	-
E	1	<i>ST+LB+LA+B. lactis</i>	7.19	7.34	<i>B. lactis</i>
	2	<i>ST+LB</i>	-	-	-

注：“-”表示“未检出”。

### 2.2 标准曲线的绘制

采用单一参考菌株(1.2226)菌液10倍逐步稀释液分别提取DNA后进行Real-Time PCR。以乳双歧杆菌标准株已知量的不同菌数对数值(Log CFU/mL)为横坐标,以反应过程中出现荧光信号的初始循环数

(Ct)为纵坐标绘制Real-Time PCR标准曲线,结果见图2。

将市售的不同厂家生产的发酵乳制品分别按参考文献6中方法计数双歧杆菌数量;提取样品DNA采用PCR-DGGE方法进行双歧杆菌种类鉴定及通过

Real-Time PCR 手段测定样品中双歧杆菌数量, 结果见表 2。

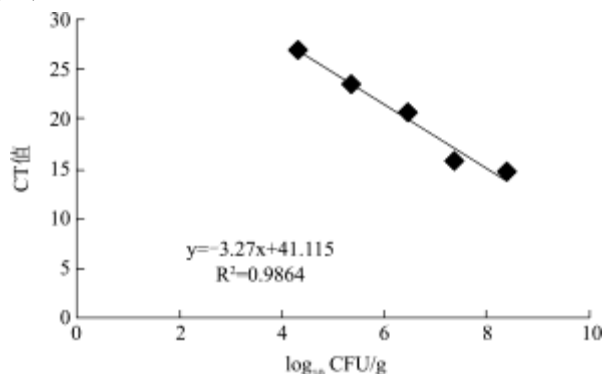


图2 Real-Time PCR标准曲线

Fig 2 Real-Time PCR standard curve

2.3 实际样品测定结果

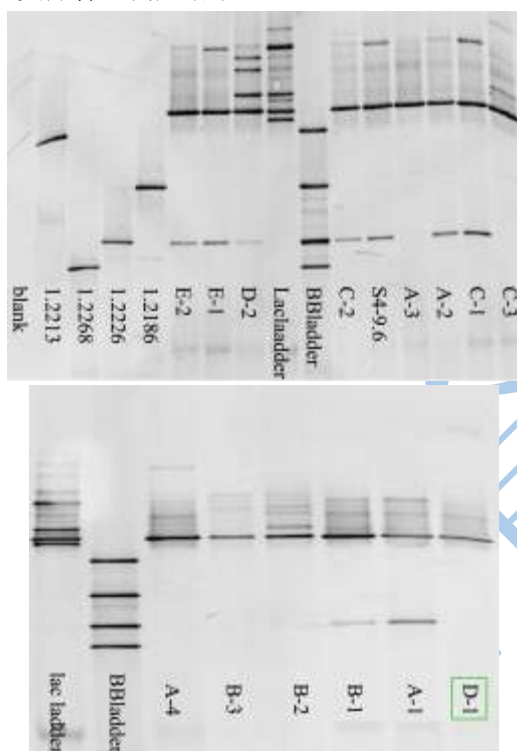


图3 实际样品 PCR-DGGE 测定结果

Fig.3 DGGE analysis of the yoghurts products

从表 2 中可知, 测试的发酵乳样品中, 营养标签上含有双歧杆菌的样品, 其双歧杆菌数量因不同厂家之间、同一厂家不同产品之间数量差异较大。只有样品中双歧杆菌数量 $\geq 10^5$  CFU/mL 时, 在 DGGE 凝胶上有目标条带呈现, 且条带清晰程度与样品中双歧杆菌数量呈正相关。有些产品标注的双歧种类未在 DGGE 中检测到, 可能原因数量未达到检出限, 如, A-1 中 *B.longum*。运用 Real-Time PCR 手段测定双歧杆菌数量与平板计数结果无显著性差异, 均在同一数量级上; 且数量低于  $10^4$  CFU/mL 时, Real-Time PCR 手段无法测定。同时从测定结果看, 不同厂家生产的发酵乳中

双歧杆菌数量有所不同, 有些产品中双歧杆菌数量并未达到其所产生生理功效所应达到的数量级。

3 结论

3.1 发酵乳实际样品测定过程中, 只有样品中双歧杆菌数量 $\geq 10^5$  CFU/g, 才能在变性凝胶上有目标条带呈现。原因在于混合菌株 DNA 在扩增反应过程中存在模板竞争, 导致不同 DNA 模板扩增效率有所差异。发酵乳中双歧杆菌数量基本在  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL, 嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌数量分别在在  $10^8$  CFU/mL 和  $10^7$  CFU/mL<sup>[4]</sup>。因此, 数量差异及 PCR 模板竞争是导致双歧杆菌在实际样品中检出限升高的缘由。研究表明, 在复杂的微生物群落, 数量低于群落微生物总数 1% 的种类难以在通过 DGGE-PCR 检测<sup>[15]</sup>。在本研究中, 由于发酵乳中菌株均为人工添加, 种类较为单一和确定, 为简单的微生物群落, 因此, 检出限较复杂微生物群落检出限低 1 个数量级。利用 PCR-DGGE 技术可实现双歧杆菌或其他乳酸菌种类的快速识别。

3.2 有研究表明, 酸乳中的益生菌在低温贮藏期间, 有些菌体处于休眠状态难于准确平板计数<sup>[2]</sup>。特别是双歧杆菌选择性计数培养基, 大多是在基础培养基中添加抗生素或抑菌剂等抑制其他菌株的生长。对于处于冷链发酵乳而言, 处于休眠状态的菌体活力下降, 对抗生素或抑菌剂的抵抗力有所降低, 影响其在选择性计数培养基上重现率。从实际样品测定结果也证实了这一观点。多数样品中, 同一样品双歧杆菌数量 Real-Time PCR 计数结果较平板培养基计数结果稍高一些, 约在 0.1 log。可能原因在于, Real-Time PCR 计数结果依赖于菌体细胞 DNA 量, 而与菌体细胞活力无关。因此, 采用 Real-Time PCR 可实现快速、准确计数发酵乳产品中双歧杆菌的数量, 能满足实际生产需要, 可用于发酵乳产品质量控制。

参考文献

[1] Sanders M E, Huiint J, Veld M. Bringing a probiotic containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues [J]. Antonie Leewenhoek, 1999, 76: 293-315

[2] Shin H S, Lee J H, Pestka J J, et al. Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage [J]. Journal of food protection, 2000, 63: 327-331

[3] Saarel M, Mogensen F R, et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties [J]. Journal of

- Biotechnol, 2000, 84(3): 197-215
- [4] Borriello S P, Hammes W P, Holzapfel W, Marteau P, et al. Safety of probiotics that contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria* [J]. Clinical Infectious Diseases, 2003, 36: 775-780
- [5] Sampo J, Lahtinen, Miguel Gueimonde, et al. Reinikainen, and Seppo J. Salminen. Probiotic bacteria may become dormant during storage. Applied and Environmental Microbiology [J]. 2005, 71(3): 1662-1663
- [6] GB 4789.35-2010, 食品安全国家标准, 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S].
- [7] Mukamolova G V, Kaprelyants A S, Kell D B, et al. Adoption of the transiently non-culturable state – a bacterial survival strategy [J]. Advances in Microbial Physiology, 2003, 47: 65-129
- [8] Rocío M., Esther J, Hans H, et al. Isolation of *Bifidobacteria* from breast milk and assessment of the *Bifidobacterial* population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(4): 965-969
- [9] 史燕强, 庄桂. 双歧杆菌的检测与鉴定研究进展[J]. 现代食品科技, 2007, 23(5): 86-90
- [10] Juste A, Thomma B P, Lievens B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes [J]. Food Microbiology, 2008, 25: 745-761
- [11] 童睿, 张媛, 郑秋月, 等. 食品中乳酸杆菌的实时荧光PCR的快速检测[J]. 现代食品科技, 2008, 24(1): 86-88
- [12] Temmerman R, Scheirlinck I, Huys G and Swings. J. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 220-226
- [13] 王超, 孟祥晨. 分子信标-实时PCR法快速检测双歧杆菌的研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1163-1168
- [14] 徐进, 杨宝兰, 李志刚, 等. 发酵奶中乳酸菌菌种检出及活菌计数调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(4): 378-380
- [15] Zoetendal E G, Akkermans A D L, De Vos W M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 3854-3859