



发酵豆乳主要乳酸菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

孙 畅,安 彬,杨 柳,王国超,冯时荣,于寒松,王玉华,任大勇

(吉林农业大学 食品科学与工程学院/国家大豆产业技术体系加工研究室,吉林 长春 130118)

摘 要:为快速检测发酵豆乳中主要乳酸菌植物乳杆菌、副干酪乳杆菌含量,建立实时荧光定量聚合酶链式反应检测方法。根据植物乳杆菌、副干酪乳杆菌保守区域设计特异性引物和探针,验证建立的实时荧光定量 PCR 法的特异性、灵敏度和重复性,并与国标法进行比较。结果表明:引物特异性强,实时荧光定量 PCR 法特异性及重复性较好;植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的检验灵敏度分别达到 1.3×10^{-4} 和 $1.0 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。分别建立植物乳杆菌和副干酪乳杆菌标准菌株的实时荧光定量 PCR 检验法的标准曲线,得出 R^2 分别为0.994 3和0.999 6,表明线性关系较好,可进行发酵豆乳中2种菌株含量的检测,测得供试发酵豆乳中植物乳杆菌与副干酪乳杆菌比例为4:1。实时荧光定量 PCR 法测得发酵豆乳中乳酸菌总量为 $(5.5 \pm 0.26) \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,国标法检测为 $(5.3 \pm 0.43) \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,2种方法检测结果无差异($P > 0.05$),表明建立的实时荧光定量 PCR 方法可快速、准确地检测出发酵豆乳中植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的含量。

关键词:发酵豆乳;植物乳杆菌;副干酪乳杆菌;实时荧光定量 PCR

Establishment of Real-time Fluorescent Quantitative PCR Method for the Detection of Lactic Acid Bacteria in Fermented Soybean Milk

SUN Chang, AN Bin, YANG Liu, WANG Guo-chao, FENG Shi-rong, YU Han-song, WANG Yu-hua, REN Da-yong

(School of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University / National Processing Laboratory for Soybean Industry and Technology, Changchun 130118, China)

Abstract: In order to detect the contents of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracei* in fermented soybean milk rapidly, we established a real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction method. Specific primers and probes were designed according to the conserved regions of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracei*, and the established real-time fluorescence quantitative PCR method was verified for specificity, sensitivity and repeatability, and we compared it with the national standard method. The results showed that the specificity of the primer was strong, and the specificity and repeatability of real-time fluorescence quantitative PCR were stable. The sensitivity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracei* was 1.3×10^{-4} and $1.0 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, respectively. The standard curve of real-time fluorescence quantitative PCR was established for the standard strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paramei*, and the R^2 was 0.994 3 and 0.999 6, respectively, indicating a good linear relationship, and the content of the two strains in fermented soybean milk could be detected. The ratio of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paramei* in fermented soybean milk was 4:1. The total amount of lactic acid bacteria in fermented soybean milk was $(5.5 \pm 0.26) \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ by real-time fluorescence quantitative PCR, and was $(5.3 \pm 0.43) \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ by national standard method. There was no difference between the two methods ($P > 0.05$), indicating that the established real-time fluorescence quantitative PCR method could quickly and accurately detect the contents of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracei* in fermented soybean milk.

Keywords: Fermented soybean milk; *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus paracei*; Quantitative real-time fluorescence PCR

益生菌发酵豆乳是以豆乳为原料,利用益生菌发酵制成的一种食品^[1]。近几年,发酵豆乳作为有降血脂和抑制肝损伤等功效的功能性食品,在全球

备受欢迎^[2-3]。与酸奶发酵剂相比,目前发酵豆乳生产中使用的菌种类别较少,大多数采用植物乳杆菌和副干酪乳杆菌为发酵剂^[1,4]。植物乳杆菌和副

收稿日期:2019-10-30

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20190926KJ);国家重点研发项目(2017YFE0105400);吉林农业大学大学生科技创新基金(2018088)。

第一作者简介:孙畅(1994-),女,硕士,主要从事食品微生物学研究。E-mail:sc15764@163.com。

通讯作者:任大勇(1979-),男,博士,副教授,主要从事食品微生物学研究。E-mail:rdy79@163.com。

干酪乳杆菌是重要的益生菌,这两类菌种在发酵过程中能产生一系列代谢产物,影响发酵产品的风味、颜色和质地^[5-6],还可以产生抗菌物质有效抑制食品腐败和病原微生物生长^[7],此外还有很强的降胆固醇^[8-9]、预防肥胖、缓解便秘、维持肠道菌群平衡和改善免疫功能^[10-11]等益生特性。张莉丽等^[12]发现不同乳酸菌的添加对发酵豆乳的风味有很大的影响,并且证明用植物乳杆菌发酵的豆乳口味酸甜适口,质地细腻。陈晓华等^[13]和陈红霞^[14]的研究发现发酵豆乳中添加菌株的数量和比例也对豆乳的风味和品质有较大影响。如何定量产品中 2 个菌种的数量及比例对于优化发酵豆乳的工艺参数,开发优质的产品具有重要意义。目前中国关于食品中益生菌计数的标准方法是 GB 4789.35—2016^[15],然而此标准只能检测出乳酸菌活菌数,并不能确定其中不同种类乳酸菌其所占的比重。同时,并没有探究这两种乳酸菌在发酵豆乳中的比例和含量的研究。

三代测序技术可以在种水平上对微生物进行鉴定,但检测方法成本较高,不利于大量样本的检测。实时荧光定量 PCR 具有准确、快速、特异性强、灵敏度高、操作简便、污染小等优点,解决了国标法不能在种水平上检测食品中微生物含量和比例的问题。本研究采用植物乳杆菌和副干酪乳杆菌复合发酵菌株制作豆乳,预试验结果表明 2 种乳杆菌在产品中的比例能够显著影响产品的风味、质地等重要感观性能。本研究基于植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的保守区域序列,确定 2 种菌株的特异性引物,快速、准确、便捷地定量检测发酵豆乳中的植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的含量及比例。本研究对于应用两种菌株特异性引物精确控制发酵豆乳工艺条件、维持产品品质稳定性等具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

发酵豆乳,实验室自制(专利号:201910557209.0); $2\times Taq Plus Master$,南京诺唯赞生物科技有限公司;PCR 引物,生工生物工程有限公司;DL2000,上海捷瑞生物工程有限公司;质粒提取试剂盒和质粒测序试剂盒,艾美捷科技有限公司;植物乳杆菌(H6)、副干酪乳杆菌(Y12)、鼠李糖乳杆菌(Y1)、嗜酸乳杆菌(Y2)、罗伊氏乳杆菌(Y15)、德氏乳杆菌(Y18)、清酒乳杆菌(K5)、类肠膜魏斯氏菌(K6)、发酵乳杆菌(F5)、肠膜明串珠菌(F6)、沙克乳酸杆菌(E7)、乳酸链球菌(T20)均由吉林农业大学食品毒理学实

验室提供。

1.2 主要仪器

PCR 仪,杭州朗基科学仪器有限公司;双稳定时电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;旋涡混合器,合肥艾本森科学仪器有限公司;孔式离心机,湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司;精密移液器,Eppendorf(Germany);微量紫外分光光度计,北京浩晖仪器有限公司。

1.3 试验设计

在 GenBank 下载植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的基因组,借助 ClustalW 软件进行序列比对,根据植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的保守区域序列设计常规 PCR 和荧光定量 PCR 检测特异性引物,优化反应条件,检测扩增反应的特异性、灵敏度和重复性。构建含有 2 种乳酸菌保守区域片段特异性扩增序列的质粒,绘制检测乳酸菌含量的荧光 PCR 扩增标准曲线。取利用实时荧光定量法和国标方法检测成品发酵豆乳(保存第 1 天)中乳酸菌总量,验证本研究的荧光定量法的准确性。并将此国标方法与荧光定量 PCR 法检测发酵豆乳中乳酸菌含量对比。

1.4 方法

1.4.1 发酵豆乳菌株及标准菌株的培养 菌株培养按照国标方法^[15](GB 4789.35—2016《食品微生物学检验 乳酸菌检验》)进行。具体操作为:根据待检样品活菌总数的估计,选择 2~3 个连续的适宜稀释度,每个稀释度吸取 1 mL 样品匀液于灭菌平皿内,每个稀释度做两个平皿。稀释液移入平皿后,将冷却至 48 ℃ 的 MRS 琼脂培养基倾注入平皿约 15 mL,转动平皿使混合均匀。36 ℃ \pm 1 ℃ 厌氧培养 72 h \pm 2 h。从样品稀释到平板倾注要求在 15 min 内完成。稀释液的制备:液体样品应先将其充分摇匀后以无菌吸管吸取样品 25 mL 放入装有 225 mL 生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中,充分振摇,制成 1:10 的样品匀液。同理可用此方法继续稀释。

1.4.2 引物设计 引物和探针均由北京美吉桑格生物医药科技有限公司使用 Primer Express 3 软件设计,引物合成由生工生物工程有限公司完成。

1.4.3 样品 DNA 的提取 标准菌株及发酵豆乳 DNA 的提取均参照张娜娜等^[16]方法。

1.4.4 PCR 反应体系和程序 常规 PCR 扩增反应体系为: $2\times Taq Plus Master Mix$, 10 μ L;引物 F, 0.8 μ L;引物 R, 0.8 μ L;模板(DNA), 1 μ L;ddH₂O, 7.4 μ L。反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性

30 s,退火 30 s,循环 35 次;72 ℃延伸1 min。退火温度按照 1.4.5 方法优化。

荧光定量 PCR 反应体系(20 μL): 2 × ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix,16.5 μL;引物 F,0.8 μL;引物 R,0.8 μL;模板(DNA),2 μL。反应条件:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 5 s,循环 40 次;退火 30 s,循环 40 次;72 ℃延伸 40 s,循环 40 次。退火温度与常规 PCR 退火温度相同。

1.4.5 退火温度的优化 为提升常规 PCR 的扩增效果及荧光定量 PCR 扩增特异性,优化退火温度。将退火温度分别设置为 64,62,60,58,56,54,52 和 50 ℃,选择最优退火温度进行试验。

1.4.6 扩增效果检测 特异性测试:以标准菌株、其它 10 种乳酸菌、发酵豆乳的核酸为模板,采用建立的实时荧光定量 PCR 体系进行检测。

灵敏度测试:采用微量分光光度计测定标准菌株的 DNA 浓度,按 10 倍梯度稀释法获得起始浓度 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-8}$ 倍的稀释液,进行实时荧光定量 PCR,每个浓度 5 个平行,3 次重复。根据荧光值的大小判断检出与否,Ct ≤ 35 为检出,Ct > 35 为未检出,评价引物在荧光定量 PCR 技术下对标准菌株 DNA 检测的灵敏度^[1]。

重复性测试:利用起始浓度 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-8}$ 倍的稀释液进行实时荧光定量 PCR 扩增,每个浓度 5 个平行,3 次技术重复。计算 Ct 值的标准差(standard deviation,SD)。根据标准差的大小对该方法的重复性进行判断。

1.4.7 重组质粒的制备 对 PCR 扩增产物进行纯化、质检,并与克隆载体连接,经过蓝白斑筛选后进行重组质粒提取并对质粒测序。克隆载体连接、蓝白斑筛选的步骤为:两种菌株的特异性引物扩增产物经纯化后,与 pMD18-T 于 25 ℃连接后,转至 Trans1-T1 感受态细胞中,37 ℃过夜培养,挑取白色

单菌落,转于 LB 液体培养基中,37 ℃、200 r·min⁻¹ 振荡培养 12 h,既得到重组质粒。重组质粒提取、测序均使用试剂盒。质粒载体名称为 pMD18-T,质粒载体大小为 2 692 bp。质粒起始拷贝数(copies·μL⁻¹) = 浓度(ng·μL⁻¹) × 10⁻⁹ × 6.02 × 10²³/(分子量 × 660),分子量指载体和目的基因的总碱基数。

1.4.8 标准曲线的制备 构建好的质粒经测序鉴定无误后用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀,通过公式换算成拷贝数,并以 10 倍梯度稀释(45 μL 稀释液 + 5 μL 质粒)进行荧光定量预试验。选择标准品荧光值稳定且线性比例良好的稀释液浓度范围,利用 real-time PCR soft 3.2 软件,以 Ct 值为 y 轴、拷贝数对数值为 x 轴,绘制标准曲线,根据其相关系数、斜率、扩增效率等验证该曲线的有效性。

1.4.9 检测结果与国标法比较 由于实时荧光定量 PCR 法可能检测到部分死菌,为了保证试验的准确性,在发酵豆乳成品的第一天利用实时荧光定量 PCR 法和国标方法测定发酵豆乳中的乳酸菌含量。

2 结果与分析

2.1 引物设计及常规 PCR 退火温度的选择

利用设计的两种乳酸菌的检测引物(表 1)和两菌株 DNA 进行常规 PCR 扩增,结果显示:两种引物的扩增均出现明显条带(图 1),植物乳杆菌和副干酪乳杆菌最适退火温度分别为 52 和 56 ℃。

表 1 植物乳杆菌和副干酪乳杆菌检测引物
Table 1 Detection primers of *L. plantarum* and *L. paracasei*

目标菌种	引物名称	序列(5'-3')
Target strain	Primer name	Sequence(5'-3')
植物乳杆菌	<i>L. plantarum</i> -R	AGGTGTTATCCCCGCTTCT
<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> -F	TTACATTTGACTGACTGCGCAACT
副干酪乳杆菌	<i>L. paracasei</i> -F	TCCGGGAAGTCTCAGC
<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> -R	TGTTTCACGAACAGGTG

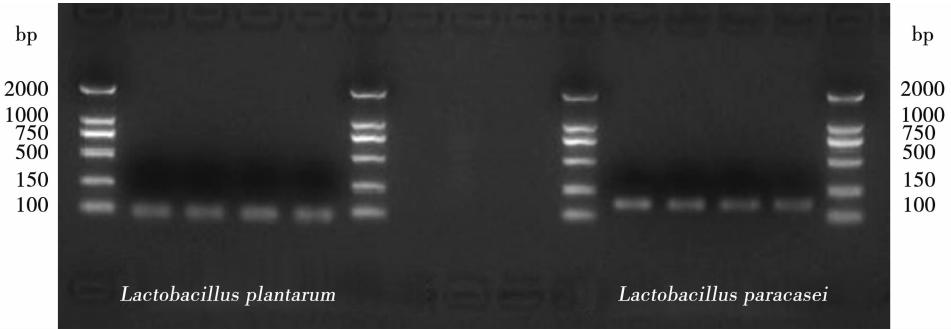


图 1 两株乳酸菌 DNA 的 PCR 扩增凝胶电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR amplification of the two lactic acid bacteria strains

2.2 实时荧光定量方法检测特异性分析

使用标准菌株的特异性引物对标准菌株及其它 10 株乳酸菌进行的 PCR,凝胶电泳检测结果所示:只有标准菌株出现明显条带,其余菌株均无明显条带(图 2)。

利用两种标准菌株特异性引物的实时荧光定

量 PCR 检测结果显示:标准菌株都出现明显扩增,含有标准菌株的豆乳也出现了扩增但与标准菌株不同,而另外的菌株没有出现扩增(图 3)。2 种菌株的熔解曲线都只出现了单峰(图 4)。以上结果表明两种引物的特异性较高^[17]。

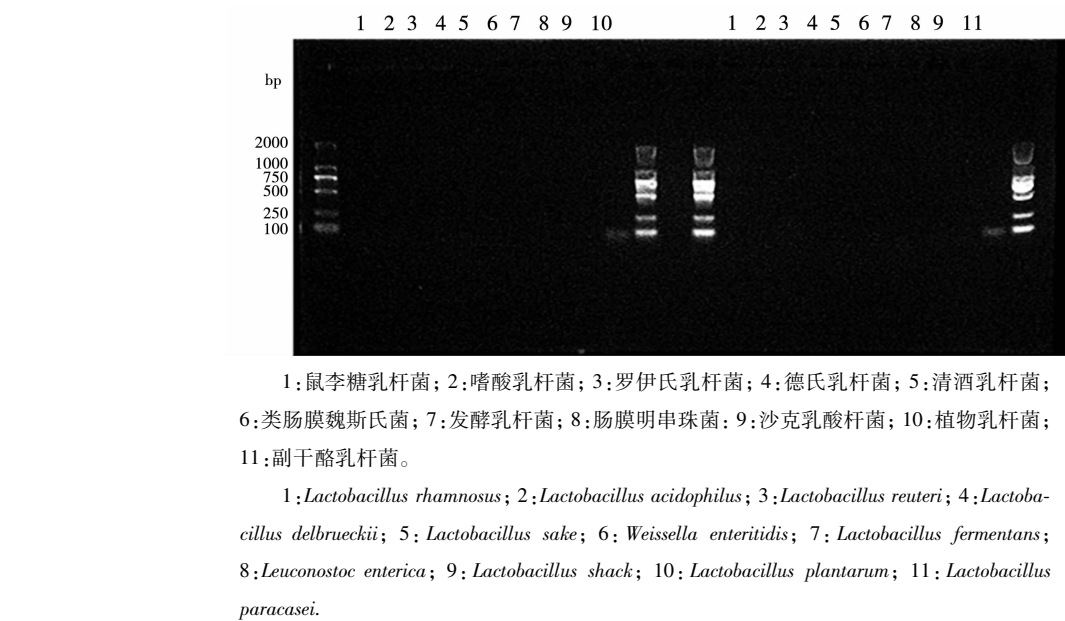


图 2 标准菌株及 10 种菌乳酸菌 DNA 的 PCR 凝胶电泳图

Fig. 2 PCR gel electrophoresis of standard strain and 10 strain lactic acid bacteria DNA

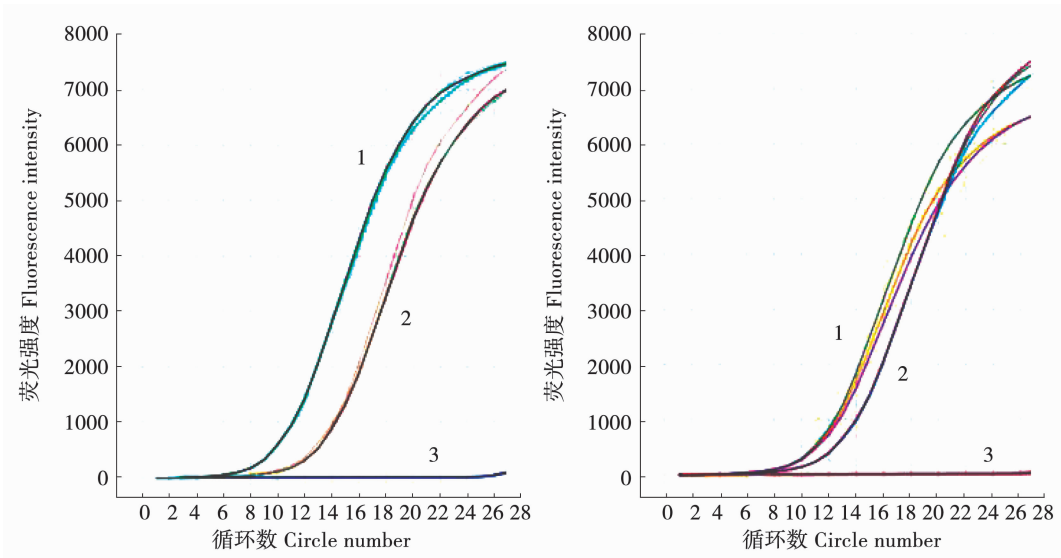
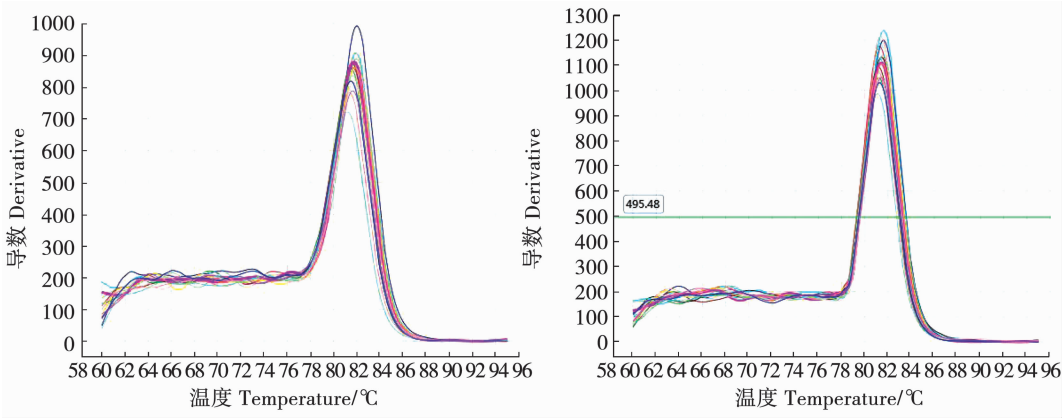


图 3 两株乳酸菌实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig. 3 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification curve of the two lactic acid bacteria strains



A:植物乳杆菌标准品；B:副干酪乳杆菌标准品。
A:*Lactobacillus plantarum* standard；B:*Lactobacillus paracei* standard.

图4 两株乳酸菌标准品荧光 PCR 溶解曲线

Fig. 4 Fluorescence PCR melting curves of standard products of the two lactic acid bacteria strains

2.3 实时荧光定量法灵敏度分析

表2为每个浓度15组结果中Ct < 35的扩增曲线数量,曲线数量少于测定总数一半则视为没有检

出。由表2可知,植物乳杆菌和副干酪乳杆菌可稳定检出的最低稀释度分别为10⁻⁶和10⁻⁷。

表2 实时荧光定量 PCR 检测的灵敏度分析

Table 2 Sensitivity analysis of real-time fluorescence quantitative PCR

目标菌种 Target strain	稀释度 Dilution degree							
	1.0 × 10 ⁻¹	1.0 × 10 ⁻²	1.0 × 10 ⁻³	1.0 × 10 ⁻⁴	1.0 × 10 ⁻⁵	1.0 × 10 ⁻⁶	1.0 × 10 ⁻⁷	1.0 × 10 ⁻⁸
植物乳杆菌 <i>L. plantarum</i>	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15	14/15	2/15	0/15
副干酪乳杆菌 <i>L. paracasei</i>	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15	14/15	13/15	2/15

2.4 实时荧光定量 PCR 重复性检测

表3为标准菌株稀释不同浓度后,经过4次平行试验求得Ct值的SD值,通过SD值判断重复性好坏。如表3所示:实时荧光定量PCR的重复性检测结果的Ct值标准差为0.21~0.56,根据张娜娜

等^[16]的实时荧光定量PCR法重复性检测的判断方法,SD值在0.14~0.56间代表重复性在可接受范围内、则方法重复性好,本研究SD值为其中间值,表明实时荧光定量PCR的重复性在可接受范围内。

表3 实时荧光定量的重复性检测

Table 3 Real-time fluorescence quantitative repeatability detection

目标菌种 Target strain	Ct值 ± 标准差 (SD) Ctvalue ± Standard deviation (SD)							
	1.0 × 10 ⁻¹	1.0 × 10 ⁻²	1.0 × 10 ⁻³	1.0 × 10 ⁻⁴	1.0 × 10 ⁻⁵	1.0 × 10 ⁻⁶	1.0 × 10 ⁻⁷	1.0 × 10 ⁻⁸
植物乳杆菌 <i>L. plantarum</i>	12.23 ± 0.28	16.56 ± 0.32	20.11 ± 0.29	24.69 ± 0.35	28.58 ± 0.42	32.75 ± 0.38	36.55 ± 0.45	38.75 ± 0.54
副干酪乳杆菌 <i>L. paracasei</i>	11.64 ± 0.39	15.56 ± 0.21	18.98 ± 0.43	22.42 ± 0.29	25.78 ± 0.51	29.46 ± 0.29	34.26 ± 0.47	36.46 ± 0.56

2.5 基因标准曲线绘制

选择荧光值稳定且线性比例良好的浓度范围 $1.0 \times 10^{-2} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ 制作基因标准曲线。植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的实际浓度分别为 132.08 和 101.9 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 拷贝数分别为 $4.5386\text{E}+10$ 和 $3.2607\text{E}+10$ (表 4)。植物乳杆菌的标准曲线为 $y = -3.4525x + 37.644$, 相关系数 $R^2 = 0.9943$, 斜率为 -3.4525 , 扩增效率为 95.69%(图 5A)。副干酪乳杆菌的标准曲线为 $y = -3.3451x + 36.912$, 相关系数 $R^2 = 0.9996$, 斜率为 -3.3451 , 扩增效率为 97.41%(图 5B), 表明两条标准曲线有较好的线

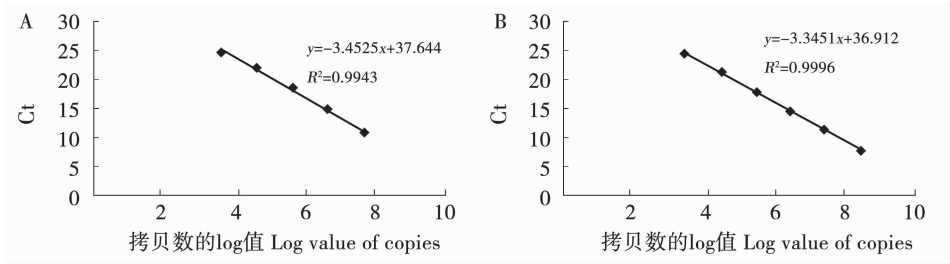


图5 *L. plantarum* (A)和 *L. paracasei*(B)检测基因标准曲线

Fig. 5 Standard curve of the target gene of *L. plantarum*(A) and *L. paracasei*(B)

2.6 荧光定量 PCR 法测定发酵豆乳中菌株比例

利用建立的实时荧光定量 PCR 法,测量两种菌株在发酵豆乳中的比例,植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的比例为 4:1(表 5)。

2.7 实时荧光定量 PCR 法与国标法对比

实时荧光定量 PCR 法和国标法测定发酵豆乳中的乳酸菌含量分别为 $(5.5 \pm 0.26) \times 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(5.3 \pm 0.43) \times 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 6),两种方法检测结果没有明显差异 ($P > 0.05$),表明实时荧光定量 PCR 法的准确性高。

性关系^[18]。根据实时荧光定量 PCR 的灵敏度,植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的可稳定检出的最低浓度为 1.3×10^{-4} 和 $1.0 \times 10^{-5} \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (表 4)。

表 4 质粒的起始浓度及拷贝数

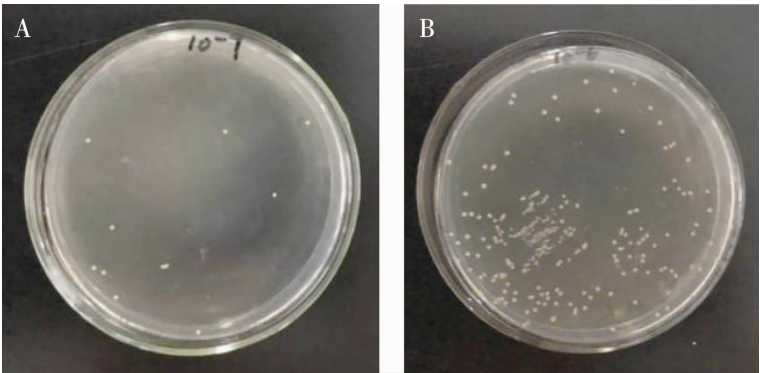
Table 4 Initial concentration and copy number of plasmids

目标菌种 Target strain	浓度 Concentration /($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	拷贝数 Copy number /($\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
植物乳杆菌 <i>L. plantarum</i>	132.08	$4.5386\text{E}+10$
副干酪乳杆菌 <i>L. paracasei</i>	101.99	$3.2607\text{E}+10$

表 5 实时荧光定量 PCR 检测发酵豆乳中两种菌株含量

Table 5 The strain content detected with real time PCR

目标菌种 Target strain	Ct	拷贝数 Copy number	定量值 Quantitative value
<i>L. plantarum</i>	10.17 ± 0.27	$4.5361\text{E}+07$	$(4.5361 \pm 0.85)\text{E}+09$
<i>L. sparacasei</i>	12.43 ± 0.04	$1.0417\text{E}+07$	$(1.0417 \pm 0.03)\text{E}+09$



A:发酵豆乳稀释 7 倍; B:发酵豆乳稀释 6 倍。
A:7 times dilution of fermented soybean milk; B:6 times dilution of fermented soybean milk.

图 6 国标法检测发酵豆乳中乳酸菌总量

Fig. 6 Total amount of lactic acid bacteria in fermented soybean milk detected by national standard method

3 讨论

发酵豆乳作为调节血脂的保健食品在全球备受欢迎^[3,19]。近年来,中国也越来越重视发酵豆乳的开发和研究。发酵豆乳的发酵剂多采用对其风味、质地有显著影响的植物乳杆菌和副干酪乳杆菌。预试验结果表明,植物乳杆菌和副干酪乳杆菌在产品中的比例也会显著影响产品的风味、质地等重要感观性能。随着监管食用乳酸菌的法律法规逐渐增多,发酵豆乳中乳酸菌定性定量的检测备受关注,传统国标法检测耗时费力,影响因素多,结果误差较大,且不能对样品中每种乳酸菌进行定量,很难满足市场精确、快速鉴定的需求。

目前,利用分子手段对食品微生物检测得到了应用,Guo 等^[20]和包秋华等^[21]研究了发酵乳中嗜酸乳杆菌的实时荧光定量 PCR 检测技术,牛犇等^[22]对传统方法和实时荧光定量 PCR 方法进行比较,表明实时荧光定量 PCR 法快速、高效、节约人力物力且能检测实际食品基质中的微生物。目前,国内外对植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的定性定量检测方法的研究报道较少,且对副干酪乳杆菌的特异性引物设计很少见。因此,本研究所建立的能够快速检测发酵豆乳中植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的方法具有重要意义。

本研究通过设计植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的特异性引物,建立实时荧光定量 PCR 法并在发酵豆乳的检测中得到应用。结果表明,该方法特异性好,灵敏度高,植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的灵敏度检测分别达到 132.08 和 101.9 ng·μL⁻¹,且重复性较好;检测结果与传统国标法相同,且较传统方法更快速、简便。说明该方法可应用在发酵豆乳中植物乳杆菌和副干酪乳杆菌的快速检测,为发酵豆乳的开发和质量监管提供了技术支持,对快速准确检验发酵豆乳加工和贮存过程中乳酸菌的变化具有重要意义^[23]。

4 结论

本研究设计了 2 种发酵豆乳主要乳杆菌的特异性引物,植物乳杆菌:*L. plantarum*-R(5'-AGGTGT-TATCCCCGCTTCT-3'),*L. plantarum*-F(5'-TTA-CATTTGAGTGAGTGCCGA-3'),副干酪乳杆菌:*L. paracasei*-F(5'-TCCGGGA-3'),*L. paracasei*-R(5'-TGTTTCACGAACAGGTG-3')。反应体系为 2 × ChamQ SYBR Color qPCR Master

Mix,16.5 μL;上游引物,0.8 μL;下游引物,0.8 μL;模板(DNA),2 μL。反应条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 5 s,循环 40 次;退火 30 s,循环 40 次;72℃延伸 40 s,循环 40 次,植物乳杆菌和副干酪乳杆菌最适退火温度分别为 52 和 56℃。该方法特异性好,灵敏度高,重复性较好;检测结果与传统国标法相同,且较传统方法快速、简便。

参考文献

[1] 李学莉,胡海娥,张金桃,等. 乳酸菌发酵豆乳研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(12): 385-390. (Li X L, Hu H E, Zhang J T, et al. Progress in researches on lactic acid bacteria-fermented soymilk[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(12): 385-390.)

[2] Zhang X L, Wu Y F, Wang Y S, et al. The protective effects of probiotic-fermented soymilk on high-fat diet-induced hyperlipidemia and liver injury[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 30: 220-227.

[3] 叶春苗. 发酵酸豆乳生产工艺及问题研究[J]. 农业科技与装备, 2016(4): 33-34. (Ye C M. Research on manufacturing technique and problems of fermentation sour soybean milk[J]. Agricultural Science and Technology and Equipment, 2016(4): 33-34.)

[4] 沈建华. 基于植物乳杆菌的发酵豆乳制品研究[J]. 食品工业, 2017, 38(7): 216-218. (Shen J H. Processing research of fermented soybean milk products based on *Lactobacillus plantarum* [J]. The Food Industry, 2017, 38(7): 216-218.)

[5] Alan Y, Topalcengiz Z, Diğrak M. Biogenic amine and fermentation metabolite production assessments of *Lactobacillus plantarum* isolates for naturally fermented pickles[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 98: 322-328.

[6] 舒梨,刘苑皓,何义国,等. 副干酪乳杆菌发酵冷吃兔[J]. 食品工业, 2019, 40(4): 203-208. (Shu L, Liu Y H, He Y G, et al. Fermentation condition of piquancy rabbit meat with *Lactobacillus paracasei* [J]. The Food Industry, 2019, 40(4): 203-208.)

[7] 张晨曦,贺雅非. 乳酸菌细菌素研究进展及其在肉制品防腐保鲜领域的应用[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(7): 271-277. (Zhang C X, He Z F. Research of bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in preservation of meat products [J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(7): 271-277.)

[8] 唐雅茹,于上富,国立东,等. 一株降胆固醇乳杆菌的筛选及其益生作用的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(1): 142-144, 152. (Tang Y R, Yu S F, Guo L D, et al. Screening and study on probiotic characteristics of a cholesterol-lowering *Lactobacillus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(1): 142-144, 152.)

[9] Chiang S S, Pan T M. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei*

sub sp. paracasei NTU 101 and its fermented products [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93 (3): 903-916.

[10] Zhang H, Sun J, Liu X T, et al. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC-01 positively modulates intestinal microflora in healthy young adults [J]. Journal of Microbiology, 2013, 51 (6): 777-782.

[11] Arasu M V, Al-Dhabi N A, Ilavenil S, et al. *In vitro* importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2016, 23 (1): 6-10.

[12] 张莉丽, 崔宪, 马微, 等. 6 株乳酸菌在豆乳中的发酵特性 [J]. 食品科学, 2014, 35 (15): 141-144. (Zhang L L, Cui X, Ma W, et al. Fermentation characteristics of different lactic acid bacteria in soymilk [J]. Food Science, 2014, 35 (15): 141-144.)

[13] 陈晓华, 李建周, 董艺凝, 等. 豆乳发酵饮料的研制 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35 (15): 57-60. (Chen X H, Li J Z, Dong Y N, et al. The development of fermented soybean-yoghurt [J]. Food Research and Development, 2014, 35 (15): 57-60.)

[14] 陈红霞. 发酵豆乳的研制 [J]. 当代畜禽养殖业, 2012 (11): 23-31. (Chen H X. Development of fermented soybean milk [J]. Modern Animal Husbandry, 2012 (11): 23-31.)

[15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准—饮料 [S]. GB 7101-2015, 北京: 中国标准出版社, 2015. (National Health and Family Planning Commission of the people's Republic of China. National food safety standard: Beverage [S]. GB 7101-2015, Beijing: China Standard Press, 2015.)

[16] 张娜娜, 刘洋, 俞漪, 等. 乳酸菌饮料中嗜酸乳杆菌的实时荧光定量 PCR 检测方法 [J]. 食品科学, 2019, 40 (8): 27-32. (Zhang N N, Liu Y, Yu Y, et al. Real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic beverages [J]. Food Science, 2019, 40 (8): 27-32.)

[17] 姜鸿瑞, 韩紫音, 夏海磊, 等. 荧光定量 PCR 检测原料乳中粘质沙雷氏菌 [J]. 中国奶牛, 2019 (5): 48-51. (Jiang H R, Han Z Y, Xia H L, et al. Fluorescence quantitative PCR detection of *Serratia marcescens* in raw milk [J]. China Dairy Cattle, 2019 (5): 48-51.)

[18] 李文学, 肖瑞刚, 吕苗苗, 等. 葡萄霜霉病菌实时荧光定量 PCR 检测体系的建立和应用 [J]. 中国农业科学, 2019, 52 (9): 1529-1540. (Li W X, Xiao R G, Lyu M M, et al. Establishment and application of real-time PCR for quantitatively detecting *Plasmopara viticola* in *Vitis vinifera* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52 (9): 1529-1540.)

[19] Tyug T S, Prasad K N, Ismail A. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products [J]. Food Chemistry, 2010, 123 (3): 583-589.

[20] Guo Z H, Fang H, Xia Z S, et al. Detection of *Lactobacillus acidophilus* in fermented material by real-time fluorescent quantitative PCR [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2016, 8 (1): 54-57.

[21] 包秋华, 李梅花, 徐洁, 等. 一种检测发酵乳中嗜酸乳杆菌的定量定性方法 [J]. 食品研究与开发, 2012, 33 (11): 153-155. (Bao Q H, Li M H, Xu J, et al. Study on the methods of qualitative and quantitative detection *L. acidophilus* in the fermented milk [J]. Food Research and Development, 2012, 33 (11): 153-155.)

[22] 牛犇, 洪斌, 穆丽丽, 等. 荧光定量 PCR 在预测微生物学中的应用 [J]. 食品工业科技, 2019, 40 (5): 275-282. (Niu B, Hong B, Mu L L, et al. Application of fluorescent quantitative PCR in predictive microbiology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40 (5): 275-282.)

[23] 韦兰芳. 关于荧光定量关于荧光定量 PCR 在预测微生物学中的运用分析 [J]. 现代农业研究, 2019 (1): 111-112. (Wei L F. Application and analysis of fluorescent quantitative PCR in predicting microbiology [J]. Modern Agriculture Research, 2019 (1): 111-112.)