

乳酸菌定量分析方法研究进展*

赵文静, 刘文俊, 李妍, 孙志宏, 张和平

(内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 国家奶牛产业技术研发中心

乳制品加工研究室, 内蒙古 呼和浩特, 010018)

摘要 传统的微生物定量检测方法主要运用纯培养技术根据细胞的形态特征或通过使用细胞计数仪来进行定量。近年来,随着分子生物学及生物技术的发展,依赖于特异核酸序列的分子生物学定量技术如:点杂交和狭线杂交、荧光原位杂交、PCR-DGGE 以及实时荧光定量 PCR 技术已经被广泛应用。文中综述了用于乳酸菌定量检测的几种方法,简单概括了各种方法的原理、特点以及其研究应用现状。

关键词 乳酸菌, 定量, 研究进展

乳酸菌是一类革兰氏染色阳性,发酵可利用的碳水化合物产生以乳酸为唯一或主要代谢产物的细菌^[1]。是人和动物体内重要的生理菌群,有重要的生理功能、理想的保健和医疗效果,它可以阻止致病菌的定植、刺激肠道粘膜免疫、降低胆固醇水平、维持肠道菌群平衡等^[2]。然而其益生作用会受到乳酸菌的数量和分布的影响,因此,进行食品、药品或是人体、动物肠道中乳酸菌的准确定量分析,对于提高我国益生菌的定量检测能力、完善保健食品的质量监管,并对益生菌产业的长远发展具有很重要的意义。纵观国内外研究现状,用于乳酸菌定量的方法主要分为传统的定量方法和现代分子生物学的定量方法。

1 传统的定量方法

传统的乳酸菌定量方法主要是平板菌落计数方法,根据每个活菌可以长出一个菌落的原理来进行计数。取一定量的菌悬液,作一系列的倍比稀释,然后将定量的稀释液接种于适宜的平板培养基培养,根据培养出的菌落数即可以计算出培养物中的活菌数量。此方法的关键是选择适当的培养基以及合适的培养条件,培养基及培养条件的合适与否可对计数结果产生数量级的影响^[1]。

平板菌落计数方法是一种经典的计数方法,是目前国际上普遍认同的方法。但是计数过程费时费力,而且对于一些未知的微生物或是已知但是不可培养

的微生物不能计数,所以有时不能提供准确的信息。此外,还有计数器测定方法,采用光学显微镜,摄像系统及细菌计数板结合进行显微计数,同时结合活体染色方法可以对活菌计数,但是由于很多菌在显微镜下形态差异很不明显,很难对混合菌中的每一种乳酸菌计数;比浊法、电子计数器计数法、涂布厌氧胶法^[3]等,这些传统的定量计数方法都各有其计数特点,同时存在一定的缺陷,而且随着生物学技术的发展,一些现代分子生物学的方法已经广泛应用于乳酸菌的定量。

2 现代分子生物学定量方法

2.1 点杂交,狭线杂交定量

点杂交和狭线杂交的基本工作原理如下:将待测样品中总 DNA 或 RNA 或是几种核酸样品直接点样或者用真空抽滤将样品固定在同一固相支持物上(尼龙膜或纤维素膜),然后用特异性探针与样品杂交,以已知浓度的靶核酸序列作为标准品,通过估计样品点发出的信号强度,与标准品发出的信号强度进行比较,确定待测样品中靶序列的含量;也可以通过通用探针和特异性探针在相同条件下分别对同一样品进行杂交,通过杂交后显示出的相应信号强度比可以计算特异探针所对应的靶序列占通用探针所对应的靶序列的百分含量^[4]。

点杂交和狭线杂交是 2 种类似的快速检测特异核酸(DNA 或 RNA)分子的核酸杂交技术。在许多研究中都使用此方法对核酸进行定量分析。2000 年 Sghir 等^[5]研究中分析了人类排泄物中微生物的群落结构,其中双歧杆菌和乳酸杆菌的数量只占总微生物数量很少一部分(<2%)。较之前的研究比例较小,

第一作者:在读博士研究生(张和平教授为通讯作者)。

*国家自然科学基金项目(30660135,30760156);教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-06-0269);国家科技基础条件平台建设项目(2005KA21208-12)

收稿日期:2008-08-26,改回日期:2008-09-16

这种偏差产生的一部分原因可能是所使用的探针是根据 16S rRNA 分子的不同序列区域的设计而导致; 2001 年 Marteau^[6]等在研究中通过寡核苷酸探针点杂交对人排泄物和盲肠中的双歧杆菌、拟杆菌属等进行了定量, 结果表明严格厌氧细菌拟杆菌属在盲肠中的含量低于排泄物中的含量, 而兼性厌氧乳杆菌属的含量显示出相对较高的比例; 2003 年, Seksik^[7]等以 16S rRNA 为目的基因用 6 种不同细菌属的特异寡核苷酸探针与样品中所提取的 RNA 杂交, 检测了不同条件下双歧杆菌以及一些其他的细菌的数量变化。

2.2 荧光原位杂交技术

荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 是在放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性分子细胞遗传技术, 以荧光标记取代放射性同位素标记而形成的一种新的原位杂交方法^[8]。FISH 的基本原理是将以微生物 16S rRNA 为靶序列设计的寡核苷酸探针进行荧光标记, 与固定好的微生物样品的特异互补核酸序列进行原位杂交, 通过激发杂交探针的荧光发出信号, 用荧光显微镜或细胞图像计数仪进行计数。

FISH 方法的优点是所使用的荧光试剂和探针经济、安全、稳定, 探针可以长期保存; 其实验的过程相对简单、实验周期较短、可以快速得到结果; FISH 特异性好、灵敏度高、检测效率较高; 多色 FISH 能同时显示多种颜色, 所以可以同时检测多种序列。但是这种方法产生的杂交信号较弱, 不同探针进入细胞内靶序列的位点的难易及敏感性的不同会影响到结果的稳定性^[9]。

1995 年 Langendijk^[10]等人用 FISH 技术, 以种属特异性 16S rRNA 为靶序列设计的探针定量了人类排泄物中的双歧杆菌, 结果显示出 16S rRNA 的可变区 V2, V4 以及 V8 序列适宜于作为双歧杆菌属寡核苷酸探针设计的特异序列, 研究中同时使用传统培养计数方法对双歧杆菌进行了定量, 由 2 种方法所得结果具有一致性, 表明几乎所有的双歧杆菌都是可以培养计数的, 而如果由单一的菌落计数时则会高估菌数将近 10 倍左右; 2004 年 Arthur 等人^[11]报道用 FISH 方法检测摄食益生菌产品后人粪便样品中的乳酸双歧杆菌 Bb-12, 同年 Monique 等人^[12]在研究中也使用荧光原位杂交技术对摄食益生菌配方食品的婴儿肠道中的总细菌数和双歧杆菌的数量进行了测定; 2006 年 Lahtinen 等人^[13]用 FISH 技术对发

酵燕麦饮料贮藏期间益生双歧杆菌的变化进行了研究, 同时与菌落平板计数、real-time PCR 等方法作一比较, 结果表明通过 FISH 与 real-time PCR 方法所得计数结果相似, 可以很好的定量食品中的益生双歧杆菌; 2007 年 Olsen 等人^[14]以 16S rRNA 为靶序列的寡核苷酸探针用于全细胞原位杂交分析鉴定, 且定量分析了嗜温乳品发酵剂中的明串珠菌属, 其所得结果与通过标准平板菌落计数法所得到的结果具有显著的相关性, 证明了此方法适用于鉴定和定量发酵中的明串珠菌数量。

2.3 PCR-DGGE 技术

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), 即变性梯度凝胶电泳, 最初的应用是在医学上, 用来检测 DNA 序列中的点突变。DGGE 是依据核酸片段大小相同而序列不同进行 DNA 序列分离的一种电泳方法。同样大小的 DNA 序列由于含有的碱基组成不同及排列差异造成解链温度不同, 在含有变性剂的聚丙烯酰胺凝胶中电泳时, 不同 T_m 值的片段在不同的时间发生变性, 从而造成电泳速度的不同, 使具有不同序列的 DNA 片段停留于凝胶的不同位置, 经过染色后, 可以使条带清晰的显现出来, 通过分析 DGGE 图谱中条带的数量和亮度则可以得到微生物的数量及组成的变化。

DGGE 技术可以分辨具有片段大小相同的 DNA 序列差异, 可以检测到单一碱基的变化^[15]。通过以 16S rDNA 基因序列设计的引物的 PCR-DGGE 方法可以很好的用于复杂微生物群落结构的研究以及监测一些生态系统中与环境因素相关的微生物的动态变化。

2001 年 Satokair 等人^[16]通过种属特异性 PCR 结合 DGGE 的方法定量分析了复杂的双歧杆菌群落结构, 先用双歧杆菌属特异性引物扩增 16S rDNA 基因大约 520bp 的片段, 然后 PCR 产物进行 DGGE 分析, 结果表明通过 DGGE 可以很好的将不同双歧杆菌属的相同片段的条带分离开来, 对条带进行分析可以得出定性及定量结果; 2002 年 Randazz 等人^[17]采用 PCR-DGGE 技术研究手工制作的西西里岛干酪生产过程中菌群的多样性及动态变化, 而且是以 16S rRNA 转录 PCR-DGGE 对该干酪进行了活菌的分析; 2003 年 Meroth 等人^[18]采用以乳杆菌属特异性的 16S rDNA 为靶序列设计的引物的 PCR-DGGE 方法监测了面包发酵过程中乳酸菌数量的变化, 所得结果与通过传统方法计数结果一致, 表明在

整个发酵过程中乳酸菌是优势菌群;2007年 Camu 等人^[19]用 DGGE 方法研究了可可豆自然堆积发酵过程中乳酸菌的动态变化和生物多样性;此外,王晓谊等^[20]也采用 PCR-DGGE 技术对不同益生菌样品中的乳酸菌进行了分析,通过对不同乳酸菌组成的电泳图谱的分析得出了各种乳酸菌的含量。

2.4 实时荧光定量 PCR

实时定量 PCR 是在 PCR 定性基础上发展起来的核酸定量技术。它是一种在 PCR 反应体系中加入荧光染料或荧光基团,利用过程中荧光信号的累积实时监测整个 PCR 过程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

Real-time PCR 具有普通 PCR 的快速、高灵敏度检出等优点,同时克服了普通 PCR 不能准确定量、容易污染等的不足,其特异性强、重现性好、定量准确、交叉污染较小^[21]。Real-time PCR 使 PCR 技术发生了质的飞跃,目前在国内外已得到广泛应用。

2004年,Grattepanche 等人^[22]通过实时定量 PCR 方法监测了在 3 种菌混合培养时微生物数量的变化,结果表明由于产细菌素菌株 *Lc. diacetylactis* 的存在,*Lc. cremoris* 及 *Lb. rhamnosus* 菌株的数量都有所降低,而由平板菌落计数方法是不可能检测出 *Lc. cremoris* 菌株细胞数量的这种变化;2005年 Monique 等^[17]通过 real-time PCR 方法对食用益生菌配方食品的婴儿排泄物中的几种双歧杆菌进行了鉴定和定量,并与传统的 PCR 方法和 FISH 方法做了比较,实验结果显示用 FISH 与 real-time PCR 方法定量双歧杆菌所得结果是相似的,表明这 2 种方法都可以在种属水平上对细菌进行计数;2006年 Martin 等人^[23]成功地建立了一种简便快速的 real-time PCR 方法用于发酵肉制品中 *Lactobacillus sakei* 的定量检测;2007年 Masco 等人^[24]运用以 16S rRNA 多拷贝基因和 *recA* 单拷贝基因为靶序列的 real-time PCR 方法对 29 种益生菌制品中的双歧杆菌计数,结果表明相比于传统方法,使用单拷贝基因为靶序列的 real-time PCR 分析方法是一种快速、重现性好的鉴定、定量益生菌制品中双歧杆菌的方法;2008年童睿等^[25]运用实时荧光 PCR 技术建立了对食品中常见的乳酸杆菌进行检测的快速方法,结果表明用实时荧光 PCR 法检测乳酸杆菌快速、敏感而且特异性较高。

3 定量研究方法的发展趋势

传统的平板菌落计数方法一直是许多微生物实

验室所选择的经典计数方法,在计数时首要选择适宜的培养基及培养条件,但是对于未知的微生物或不能培养的微生物则不能计数,而且在监测微生物数量动态变化时费时费力,不能准确快速地对样品中微生物的多样性及动态变化提供信息。一些光学仪器的应用,如显微镜计数、分光光度计测定光密度值、流式细胞仪计数等,都可以直接地对细胞进行计数,但是在计数过程中不能区分死菌或活菌,结合活体染色方法也只能对单一的微生物进行计数,而且流式细胞计数仪计数还会受到颗粒的影响,因此都不能区分是否为微生物。所以这些传统的定量方法在对样品中的乳酸菌进行分析时会有一定的弊端。为了克服这些问题,新型的分子生物学定量技术应用而生,例如点杂交技术、FISH 技术、PCR-DGGE 技术、T-RFLP 技术、real-time PCR 技术等,这些方法主要依据 16S rDNA 或是其他特异基因序列设计引物或探针进行分析,相比于传统的计数方法,其简便快速,精确性及灵敏性都比较高。然而在分析过程中探针设计比较困难、杂交信号不稳定、rDNA 基因序列分析同样不能区分死菌或是活菌,这些缺点也对分子生物学的定量方法提出挑战。因此近年来的研究中有使用荧光原位杂交结合流式细胞计数仪的方法进行定量,以 16S rRNA 转录的 PCR-DGGE 方法对活菌进行定量等。所以对于乳酸菌及微生物的定量研究方法在不断改进,不断发展,同时,这几种方法的综合运用不失为实现乳酸菌定量高准确性、高灵敏性以及较高重复性的可靠,科学的研究方法,而且也是未来乳酸菌定量检测和菌群结构动态分析研究的新趋势。

4 结语

综上所述,用于乳酸菌定量的方法有好多种,各种方法都有其优点和缺陷。为了实现样品中的乳酸菌进行准确定量,可以将各种方法结合起来或者同时使用几种方法定量,这样可以提高定量结果的准确性以及可靠性。

参考文献

- 1 张刚. 乳酸细菌—基础、技术和应用[M]. 北京:化学工业出版社,2007. 193~194
- 2 郭兴华. 益生乳酸细菌—分子生物学及生物技术[M]. 北京:科学出版社,2008. 3
- 3 曾理,江晓. 培养方式对乳酸菌计数的影响[J]. 职业与健康

- 康,2004,20(4):41
- 4 淡瑞芳. Real Time PCR 和 DGGE 技术研究放牧藏系绵羊瘤胃微生物数量及区系季节动态[D]. 甘肃农业大学草业学院博士论文,2002
- 5 Sghir A, Gramet G, Suau A, et al. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization[J]. Applied and Environmental Microbiology,2000, 66(5):2263~2266
- 6 Marreau P, Pochart P, Dore J, et al. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota[J]. Applied and Environmental Microbiology,2001, 67(10):4939~4942
- 7 Seksik P, Rigottier Gois L, Gramet, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon[J]. Gut,2003, 52: 237~242
- 8 Levsky J M, Singer R H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and Future[J]. Journal of Cell Science, 2003,116:2 833~2 838
- 9 邢卉春,李兰娟. 基于核糖体 RNA 的分子生物学技术在肠道菌群分析中的应用[J]. 中华传染病杂志,2006,24(1):67~70
- 10 Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples[J]. Appl Environ Microbiol,1995, 61(8): 3069~3075
- 11 Ouwehand A C, Kurvinen T, Rissanen P. Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an in vivo study[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004,95(1):103~106
- 12 Haarman M, Knol J. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula[J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 71(5): 2318 ~ 2324
- 13 Lahtinen S J, Gueimonde M, Ouwehand A C, et al. Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product[J]. Food Microbiol,2006,23(6):571~577
- 14 Olsen K N, Brockmann E, Molin S J. Quantification of leuconostoc populations in mixed dairy starter cultures using fluorescence in situ hybridization[J]. Appl Microbiol,2007,103(4):855~863
- 15 Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food[J]. Journal of Microbiological Methods,2004, 56(3):297~314
- 16 Satokari R M, Vaughan E E, Akkermans ADL, et al. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Applied and Environmental Microbiology,2001, 67(2):504~513
- 17 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.
- 18 Meroth C B, Walter J, Hertel C, et al. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1):475~482
- 19 Camu N, Winter T D, Verbrugghe K, et al. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana[J]. Applied and Environmental Microbiology,2007,73(6):1809~1824
- 20 王晓宜,庄绪亮,齐鸿雁,等. PCR-DGGE 方法检测不同微生态制剂-益生菌样品中乳酸菌的群落组成[J]. 微生物学生态研究进展. 第五届微生物生态学术研讨会论文集. 62~66
- 21 Valasek M A, Repa J J. The power of real-time PCR [J]. Advan Physiol Edu,2005,29: 151~159
- 22 Grattepanche F, Lacroix C, Audet P, et al. Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris in milk fermented by a mixed culture[J]. Appl Microbiol Biotechnol. ,2005,66(4):414~421
- 23 Martin B, Jofre A, Garriga M, et al. Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology,2006,72(9): 6040~6048
- 24 Masco L, Vanhoutte T, Temmerman R, et al. Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and recA genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007,113(3): 351~357
- 25 董睿,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

(下转第 129 页)

- role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 32, 239~243
- 21 Lin Long, Du Guocheng, Chen Jian. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 8532~8536
- 22 温琦, 刘登如, 陈坚. 添加表面活性剂促进产透明质酸菌高产透明质酸[J]. *化工进展*, 2006, 25(9):1089~1094
- 23 田毅红, 蔡海波, 陆仕灿. 高分子量透明质酸的发酵研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2004, 35(5):269~271
- 24 汪江波, 薛海燕, 邹玉玲. 调控细胞通透性以提高透明质酸的产量和分子量[J]. *华西药学杂志*, 2006, 21(5):465~467
- 25 Ogradowski C S, Hokka C O, Santana M H A. Production of hyaluronic acid by streptococcus [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005:753~761

Progress on Optimization of Fermentation Conditions of Hyaluronic Acid

Liu Li¹, Wang Qiang¹, Chen Yonghao^{1,2}

1(Institute of Food Science & Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

2(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT This article reviews the recent progress of the mutagenesis on strains and fermentation conditions for producing hyaluronic acid, and discusses the effects of temperature, pH, agitation and time of fermentation conditions on hyaluronic acid yield and its molecular weight, and presents the prospects of its application as a guidance to the fermentation of hyaluronic acid.

Key words hyaluronic acid, yield, molecular weight, fermentation conditions

(上接第 124 页)

The Research Progress of Quantitative Analysis of Lactic Acid Bacteria

Zhao Wenjing, Liu Wenjun, Li Yan, Sun Zhihong, Zhang Heping

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering Ministry of Education, Dairy Processing Laboratory of National Dairy Production Technology and Research Center, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

ABSTRACT The traditional quantitative microbial detection method mainly used cell-culture technology in accordance with the morphological characteristics or the cell count instrument to quantify. In recent years, with the development of molecular biology and biotechnology, the molecular biology quantitative techniques which dependent on the specific sequence of nucleic acid, such as dot blotting and slot blotting, fluorescence in situ hybridization, PCR-DGGE and real-time quantitative PCR technology have been widely used. This paper reviewed some quantitative detection methods of lactic acid bacteria, in which the principle and characteristics of each method are summarized. Meanwhile, perspective and the application progress of LAB quantization were discussed.

Key words lactic acid bacteria, quantitation, study progress