

# PMA-qPCR 技术在发酵食品活菌计数中的应用

陈卓君<sup>1</sup>, 魏铭<sup>2</sup>, 林果<sup>1</sup>, 陈昱锜<sup>1</sup>, 梁杉<sup>3</sup>, 张柏林<sup>1</sup>, 朱保庆<sup>1\*</sup>

1(林业食品加工与安全北京市重点实验室(北京林业大学), 北京, 100083)

2(中粮营养健康研究院, 北京, 102209)

3(北京工商大学, 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 北京, 100048)

**摘要** 发酵食品具有丰富的口感和较高的营养价值, 深受广大消费者喜爱。准确计数发酵食品生产加工与贮藏过程中的活菌, 是对产品进行质量控制、评价以及工艺改进的基础。叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)是一种具有高亲和力的光敏性 DNA 结合染料, 用于处理样品后偶联使用实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR, qPCR)计数可极大缩短检测时长且灵敏度高、特异性强。该文综述 PMA-qPCR 技术的原理、影响因素及其在红酒、啤酒、酸奶等发酵食品活菌计数中的应用现状。将目标微生物及 PMA 处理条件列为该技术影响因素, 以此为基础总结各类发酵食品中可检测微生物及检测线性范围及检测限, 为扩大此方法使用范围, 获取发酵食品中更为丰富和精准的活菌检测结果提供参考。

**关键词** 发酵食品; 活菌计数; 叠氮溴化丙锭; 实时荧光定量 PCR

发酵食品是以农产品、林产品和畜产品等为为原料, 利用微生物(不包含食品中直接加入的有益微生物)发酵而成的一类特殊食品。发酵食品最初是以延长食品保质期、拓展食品在不同季节的可食性为目的; 因其具有独特的风味和丰富的营养价值, 近年来越来越受到消费者的欢迎<sup>[1]</sup>。微生物作为发酵食品的“灵魂”, 与发酵食品的品质直接相关, 在提高产品贮藏期、富集功能因子和保障安全等方面都发挥着不可替代的作用<sup>[2]</sup>。因此, 准确计数发酵食品中的不同微生物, 是研究发酵食品品质形成机理以及工艺改进和产品质量控制的基础。

传统的微生物计数方法为菌落计数法, 该方法易受主观影响, 繁琐复杂, 耗时耗力, 存在较大误差, 既无法区分“可生存但不可培养”(viable but non-culturable, VBNC)状态下细胞也无法对复杂菌系中的单一菌种进行有效定量。随着现代分子生物学技术的发展, 高灵敏度和特异性的实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)也被开发用于发酵食品的微生物计数<sup>[3]</sup>, 该方法的主要缺陷在于难以区分死菌和活菌, 使得死菌中存留的大量 DNA 也可被扩增, 导致计数结果出现偏差<sup>[4]</sup>。近年来出现的叠氮溴化丙锭

(propidium monoazide, PMA)偶联 qPCR 技术, 可以有效避免常规 qPCR 的缺陷, 也可检测 VBNC 状态的微生物。目前, 该技术在发酵食品中已被用于多种发酵常见微生物的计数。本文系统地综述了 PMA-qPCR 技术的原理、影响因素及在常见发酵食品中应用现状, 同时提出了该技术进一步发展和拓展应用的展望。

## 1 PMA-qPCR 方法介绍

### 1.1 实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)原理及特点

qPCR 是在标准 PCR 技术基础上, 使用荧光报告基团(包括双链 DNA 结合染料或在扩增过程中掺入 PCR 产物的、与 PCR 引物或探针结合的染料分子)进行 DNA 扩增, 利用具有热循环功能及荧光染料筛查能力的仪器, 每次循环结束后通过荧光染料检测 DNA 含量, 荧光染料产生的荧光信号与生成的 PCR 产物分子(扩增片段)数成正比。利用反应指数期采集的数据, 生成有关扩增靶点起始量的精度极高的定量信息。与传统 PCR 相比, 荧光定量 PCR 具有特异性更强、灵敏度更高、检测周期更短、自动化程度高等特点。近年来, 随着分子生物学技术的不断发展, 实时荧光定量 PCR 技术在微生物计数方面得到了广泛的应用<sup>[5]</sup>。然而微生物在自然环境中以多种生理状态存在: 可培养的活菌, 活的非可培养状态, 具有完整结构但无生物活性的死菌以及膜损伤死菌。qPCR 技术虽能克服传统计数方法无法检测 VBNC 状态下

第一作者: 硕士研究生(朱保庆副教授为通讯作者, E-mail: zhu-baoqing@bjfu.edu.cn)。

基金项目: 农业部葡萄酒加工重点实验室开放课题(KLVE201701)

收稿日期: 2019-02-15, 改回日期: 2019-03-08

细胞的缺陷,但无法区分死活菌 DNA,这对活菌计数带来巨大的挑战<sup>[6]</sup>。

1.2 PMA-qPCR 检测活菌的机理

膜损伤细胞没有代谢活性,适宜条件下培养难以恢复生长,因此将膜完整性作为评判活菌标准已被多数学者接受<sup>[7]</sup>。基于活菌定量条件,叠氮溴化丙锭(propidiummonoazide,PMA)常被用于 qPCR 的前处理步骤<sup>[8]</sup>,待测菌与适宜浓度 PMA 避光条件下孵育一定时间,经光钝化后即可提取活菌 DNA。

PMA 是一种具有高亲和力的光敏性 DNA 结合染料,如图 1 所示,该染料自身荧光弱,与核酸结合后荧光信号大大增强。在 DNA 提取之前将 PMA 与待测样品混合,PMA 会选择性的进入膜损伤细胞并嵌入双链 DNA 结构中,每分子染料可与 4~5 个核苷酸相结合。在可见光(最大吸收峰为 464 nm)作用下,PMA 分子中叠氮基团分解产生高活性的氮烯类化合物,与 DNA 分子发生共价交联反应生成沉淀,进而抑制膜损伤细胞 qPCR 过程中 DNA 的扩增。溶液中残留的过量染料与水分子经光照反应生成羟胺化合物,进而失去交联活性,不会影响后续活细胞 DNA 扩增<sup>[8]</sup>。利用 PMA 选择渗透性和 qPCR 特异性,能够显著提高检测速度和灵敏度。

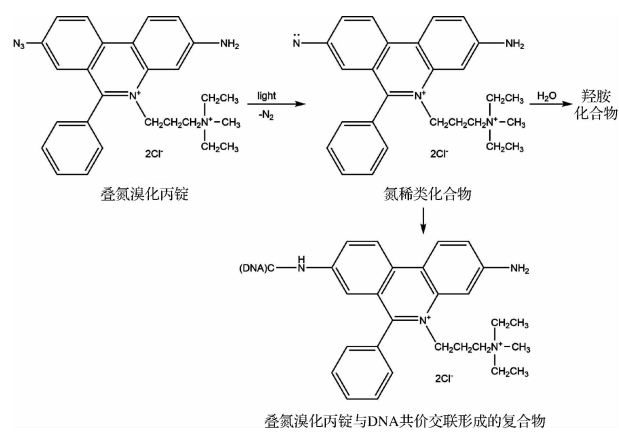


图 1 PMA 与 DNA 反应原理示意图<sup>[9]</sup>  
Fig.1 Schematic diagram for the reaction between PMA and DNA

2 影响 PMA-qPCR 检测效率的因素

2.1 目标微生物

表 1 汇总了利用 qPCR 对常见发酵微生物计数的目的基因、引物序列等信息,诸多学者针对实验菌株会选择不同目的基因,细菌通常采用 16S rDNA 编码基因,而 26S rDNA 及 ITS 编码基因常用于酵母的靶点设计。

表 1 不同微生物 qPCR 检测目的基因的选取及引物列表

Table 1 Selected genes and related primers used in qPCR for different microorganisms

微生物	引物	目的基因	扩增长度/bp	引物序列(5'-3')	参考文献
总细菌	BAC - F	16S rDNA	194	CCTACGGGAGGCAGCAG	[26]
	BAC - R			ATTACCGGGCTGCTGG	[26]
总乳酸菌	WLAB1	16S rDNA	408	TCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGA	[14]
	WLAB2			TCGAATTAAACCACATGCTCCA	[14]
植物乳杆菌	Lp - F	16S rDNA	81	TGATCCTGGCTCAGGACGAA	[26]
	Lp - R			TGCAAGCACCAATCAATACCA	[26]
醋酸菌	AQ1F	16S rDNA	55	TCAAGTCCTCATGGCCCTT	[15]
	AQ2R			TACACACGTGCTACAATGG	[15]
乳酸乳球菌	F	16S rDNA	133	GAGGCAGCACTAGGGAATCTTC	[32]
	R			CTTGATGAGCTTTCCACTCTCA	[32]
瑞士乳杆菌	F	tuf	158	TTACAAGGCGACAAGGAAGC	[32]
	R			CGACCTGAAGCAACAGTACC	[32]
鼠李糖乳杆菌	F	tuf	70	CATGGCCCAATGCCACAA	[32]
	R			CAACGATGTATTCAACCAACTT	[32]
双歧杆菌	F	tal	116	GCGCTGGGCTGCTCTGGAAGC	[32]
	R			TGGCGAGCTCATCGACATACT	[32]
加氏乳杆菌	LaITS - 1F	23S rDNA ITS	329	AAGGGCGCACGCTGAATGCCT	[13]
	LGA - 1R			TGCTATCGCTTCAAGTGCTT	[13]
唾液乳杆菌	LaITS - 1F	23S rDNA ITS	396	AAGGGCGCACGCTGAATGCCT	[13]
	LSA - 1R			GAAC TGAGGAAACGAAGTTTCGCTT	[13]
嗜盐性蛋白酶产生菌	Vir_F1029	aprX	131	GGATCGGCGCTAGAAAAACA	[38]
	Vir_R1140			GCTGAGGATTGCCTCAAGC	[38]
嗜盐四生球菌	Tet_F20	ITS	110	GGTCAAGGGTTTCTCGAAGGT	[38]

续表 1

微生物	引物	目的基因	扩增长度/bp	引物序列(5'-3')	参考文献
真菌	Tet_R107			AATCAACACCAACCGAGAATCC	[38]
	ITS1	ITS1 - 5.8S	290	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[16]
	qITS2	rDNA - ITS2		TTYGCTGYGTTCTTCATCG	[17]
酵母	YEAST - F	26S rDNA	124	GACTCGAGTTGTTTGGGAATGC	[18]
	YEAST - R			TCTCTTTCCAAAGTCTCTTTCATCTTT	[18]
酿酒酵母	CESP - F	ITS2 和	175	ATCGAATTTTGAACGCACATTG	[18]
	SCER - R	5.8S rDNA		CGCAGAGAAAACCTCTCTTTGGA	[18]
布鲁氏酒香酵母	DekITS	ITS	308	GACACGTGGAATAAGCAAGG	[24]
	BruxITR			ATTATCCCCTCACTCCCCTC	[24]
葡萄有孢汉生酵母	CESP - F	ITS2 和	121	ATCGAATTTTGAACGCACATTG	[24]
	HUV - R	5.8S rDNA		AACCCTGAGTATCGCCCACA	[24]
酿酒酵母	SC1d	RAPD bands	301	ACATATGAAGTATGTTTCTATATAACGGTG	[18]
	SC1r			TGGTGCTGCTGCGGATCTA	[18]

研究表明<sup>[10]</sup>,对不同微生物进行 PMA 处理时应进行优化时,目标菌种不同(特别是革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的细胞膜结构差异)可能对 DNA 活性染料效果有很大影响。革兰氏阴性菌细胞壁含有外膜,而革兰氏阳性菌主要为肽聚糖层<sup>[4]</sup>,这种差异使 PMA 可以更快渗透入膜损伤的革兰氏阴性菌,如果两种细菌存在于同一环境样本中,最终可能产生群落定量偏差<sup>[11]</sup>。值得指出的是,现阶段研究多针对于细菌,对真菌和病毒的描述较少。同时为了正确地描述食品生态系统中的微生物种群,需要考虑的重要因素之一是待扩区域的选择。目标基因必须有 2 个基本特征:(1)存在于待检测的微生物组的所有成员中;(2)具有可设计通用引物的保守区域和可分化的可变区域<sup>[12]</sup>。针对目的基因进行正确的引物设计也至关重要,LAI 等<sup>[13]</sup>基于内转录间隔基因和 23S rDNA 基因,设计了格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasser*i)和唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)特异性引物,从而可以有效计数益生菌产品中两种乳酸菌活细胞值。

2.2 PMA 处理条件

除待测菌自身差异外,PMA 处理条件也是影响扩增效果的重要因素,关键点包括:PMA 浓度、暗反应时间、光反应时间<sup>[14-19]</sup>,三者需要针对反应体系进行平衡优化(表 2)。

PMA 浓度应以能够最大程度抑制死菌,同时不影响活菌的后续定量为先决条件。TANTIKACHORNKI-AT 等<sup>[20]</sup>在研究中推测 PMA 的最佳浓度可能与细胞密度有关:细胞密度越高,则需要更高的 PMA 浓度才能有效抑制死菌 DNA 的扩增。有研究表明密度处于 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> CFU/mL 的酵母和密度近似 10<sup>8</sup> CFU/mL 的细菌得到准确定量结果的条件均为 6 μmol/L PMA。

表 2 针对不同微生物 PMA 处理条件优化

Table 2 The optimal conditions of the PMA treatments for different microorganisms

目标微生物	PMA 浓度/ (μmol · L <sup>-1</sup> )	暗反应 时间/min	光钝化时间/ min	参考 文献
加氏乳杆菌、唾液乳杆菌	100	5	5	[13]
酵母、细菌	6	10	8	[20]
保加利亚乳杆菌	20	0.25	20	[22]
酵母	6	10	两次相隔 1 min 的 30s 曝光	[21]
酵母、乳酸菌、醋酸菌	100	5	10	[25]
酵母、乳酸菌、丝状真菌	25	20	10	[26]
嗜热链球菌 STY-31、保加利亚 乳杆菌 LBV-27、嗜酸乳杆菌 LA-5、干酪乳杆菌干酪亚种 LC- 01、双歧杆菌 BB-12	50	5	15	[30]
乳球菌、肠系膜明串珠菌	50	5	5	[34]
嗜盐性蛋白酶产生菌、嗜盐四 联球菌	100	20	5	[38]

暗反应时间的长短决定了 PMA 嵌入 DNA 的充分程度,嵌入 DNA 的 PMA 在强光照射下与 DNA 共价交联,未反应 PMA 则被钝化,光反应时间决定后续活菌 DNA 扩增效率。ANDORRÀ 等<sup>[21]</sup>测定酿酒酵母时发现使用 6 μmol/L PMA 处理样品,进行 10 min 暗反应后采用两次相隔 1 min 的 30 秒曝光方法定量结果更为准确。SHAO 等<sup>[22]</sup>使用了 20 μmol/L PMA 进行 20 min 光钝化,可有效检测德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii* ssp.)是否进入 VBNC 状态,这与 NOCKER 等<sup>[8]</sup>针对纯净环境培养细菌优化后的处理条件有所不同。

3 PMA-qPCR 计数在发酵食品中的应用

3.1 酒

酿酒是一种复杂的生物化学反应过程,受到多种

微生物和环境因素的影响,如何对酒样中微生物定性定量,对工艺控制及成品酒贮存至关重要。现阶段以此方法进行酒类研究较少,主要集中于葡萄酒。酿造中,随着主要发酵产物乙醇浓度的增加,酒样中细胞的膜流动性受到影响,对膜蛋白产生毒性,从而抑制细胞生长甚至导致死亡<sup>[23]</sup>。ANDORRÀ<sup>[21]</sup>推测,发酵过程中高浓度酒精导致死菌大规模的出现,可能会对活菌定量产生影响;在实验中添加 $10^6$ 个/mL膜损伤菌进行检测后发现,过量死亡细胞的存在并未干扰到菌群密度为 $10^3 \sim 10^7$  CFU/mL酵母菌的计数结果。将优化后的PMA处理条件用于发酵酒及陈酿酒中总酵母、酿酒酵母、非酿酒酵母和腐败酵母的检测,结果发现不同生理状态下酵母均可被快速定量。同时在不同葡萄酒酒样中利用Ct值和标准曲线对微生物进行计数时,应考虑基质的影响。RIZZOTTI等<sup>[24]</sup>在检测10种葡萄酒中酵母、乳酸菌及醋酸菌密度时,针对不同基质制作了相应标准曲线,大幅降低环境因素对结果的影响。

PMA-qPCR技术在其他酒类中也有应用,VEN-DRAME等<sup>[25]</sup>以布鲁氏酒香酵母(*Brettanomyces bruxellensis*)为目标菌株,建立起了一套能够在9 h快速检测酒样中是否存在腐败酵母的方法,检测限在红酒、白酒、啤酒中分别为0.83、0.63、0.23 lg CFU/mL。中国传统真菌发酵米酒中,LV<sup>[26]</sup>优化了对于酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、植物乳杆菌(*L. plantarum*)和紫红曲霉(*M. purpureus*)的PMA处理条件,同时对qPCR、PMA-qPCR、RT-qPCR处理结果进行了对比,发现PMA-qPCR与传统计数方法最为拟合,同时检测限较低,据此建立了监控米酒发酵过程中整体菌群动态变化的高效途径。

### 3.2 发酵乳

发酵乳是乳和乳制品在发酵菌的作用下发酵而成的酸性凝乳状制品,主要包括酸奶、奶酪及开菲尔等。发酵乳常被用于引入除发酵剂外益生菌的载体,益生菌是一种通过改善肠道微生物平衡从而对宿主施加有益影响的微生物添加物,乳杆菌和双歧杆菌是发酵乳生产中常使用的两种益生菌,用于改进发酵乳的口感、质地等感官特性,增强发酵乳的健康性能<sup>[27]</sup>。国际食品法典标准发酵乳卷<sup>[28]</sup>(CODEX STAN 243—2003)中规定在最低保质期内发酵乳中发酵微生物应是大量存活的,在除了用于发酵的特定发酵剂之外,发酵乳中微生物的计数至少要有 $10^6$  CFU/g。所以在发酵乳的生产和保存中微生物的存活率有直接影响。

#### 3.2.1 酸奶

酸奶主要是以新鲜牛乳为原料,经乳酸菌发酵形成的风味独特、营养丰富的功能性乳制品。酸奶是益生菌最常见且经济的载体,在传统发酵剂基础上,发展益生菌酸奶可有效解决耐药菌株问题,同时满足人民对健康食品的不断需求<sup>[29]</sup>。以混合菌株作为发酵剂是增强酸奶益生性的较优方法,GARCÍA-CAYUELA等<sup>[30]</sup>利用PMA-qPCR检测了货架期内(28 d)及超出货架期30和60 d的酸奶样品中种水平上嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) STY-31、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) LBY-27、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) LA-5、干酪乳杆菌干酪亚种(*Lactobacillus casei* subsp. *casei*) LC-01和双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*) BB-12的动态变化;结果发现,PMA-qPCR可以在设计了种间特异性引物的基础上,在复杂微生物环境条件中做到 $10^5$  CFU/mL菌浓度检测范围内的简单快速计数,实验中不会出现交叉污染现象,菌株的生存能力在货架期后才会减弱。目的基因的选择与特异性引物的设计在定量微生物方法中的重要性也被SCARIOT等<sup>[31]</sup>进一步证实,利用PMA-qPCR检测副干酪乳杆菌(*L. paracasei*) ATCC 10746的*tuf*基因,观察其在纯净环境和酸奶发酵过程中的生存状况,得到不同基质中标准曲线平均效率为94%和96% ( $R^2 > 0.98$ ),两个样本的检测限(LOD)均为 $10^4$  CFU/mL。将发酵1和30 d的酸奶进行对比,发现目标菌株仍保持在 $10^8$  CFU/mL,qPCR方法得到的计数值高于PMA-qPCR。这些研究证明PMA-qPCR技术可用于在复杂酸奶发酵环境中快速定量益生菌,帮助生产者选取生存能力更强的优势菌株。

#### 3.2.2 奶酪

奶酪同样是一种以混合发酵剂发酵的食品,作为益生菌的优良载体,具有独特的风味和质地。PMA-qPCR技术已被用于监控切打干酪(cheddar cheese)发酵过程中益生菌生长情况,ÉMILIE<sup>[32]</sup>探究了添加3种益生菌对车打干酪发酵及成熟期的影响,样品以乳酸乳球菌为发酵剂,分别添加双歧杆菌(*B. animalis* subsp. *lactis*) BB-12、鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) RO011、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*) RO052和3种益生菌混合物,结果表明,益生菌添加会影响发酵菌株的生长,混合菌株之间虽存在抑制作用,但在成熟期奶酪中仍能保持较高活性(lg 9 CFU/g)。除此之外,也有学者使用PMA-qPCR技术与体外模拟实验相结合

从而得出比培养依赖型定量更为高效的方法。VIL-LARREAL 等<sup>[33]</sup>使用 qPCR、PMA-qPCR 结合平板计数法评价了嗜酸乳杆菌 La-5、双歧杆菌 BB-12 和清酒乳杆菌 (*L. sakei* subsp. *sakei*) 2a 在小瑞士奶酪货架期间的存活率,发现 3 种方法在测定初期没有较大差异,然而随着体外诱导试验的变化,不同方法之间差异增大,电泳结果显示 qPCR 计数了大量膜损伤细胞而 PMA-qPCR 克服了这个问题。在检测中显示 BB-12 菌株有较好的生存能力,能够维持在 6 lgCFU/g 及以上。基于这些研究,ERKUS 等<sup>[34]</sup>发掘了 PMA-qPCR 更大的应用潜力,以 8 种混合菌株为发酵剂的 GUODA 干酪在成熟过程中会出现大量膜不完整细胞,这给宏基因组带来了巨大挑战,用 PMA 处理发酵期和成熟期样品后选择性剔除了膜损伤细胞,从而可以对奶酪微生物群落中活细胞进行更高效的宏基因组鉴别分析。

3.2.3 开菲尔

开菲尔 (Kefir) 是一种利用开菲尔粒 (Kefir grain), 对牛奶、羊奶等发酵,得到的含醇、酸及少量 CO<sub>2</sub> 的发酵乳。开菲尔粒是一种天然存在的混菌发酵体系,内含多种微生物,分析其菌相组成是探讨发酵过程、代谢机制及确保发酵乳安全性的前提<sup>[35]</sup>。PORCELLATO 等<sup>[36]</sup>将 PMA-qPCR 技术与变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 及自动核糖体间隔基因分析 (automated Ribosomal intergenic spacer analysis, ARISA) 联用,探究了 3 个生产批次的开菲尔产品在货架期及超过货架期两周内的菌群动态变化。结果表明在储存过程中,PMA 处理后的 Kefir 样品与原始样品中菌群存在显著差异,作为发酵剂的主要构成菌株链球菌属 (*Streptococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*) 和乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 浓度明显下降,DGGE 及 ARISA 检测不同批次样品中均出现了污染微生物。这种直接从食品中提取 DNA 进行分析的方法为开菲尔类发酵产品的研究提供了新的思路。

3.3 鱼露

鱼露因富含谷氨酸而被作为食品中天然的增鲜剂。它以低值鱼虾或水产品加工下脚料为原料,利用环境、鱼自身的酶系及耐盐酵母菌、乳酸菌、醋酸菌等微生物在一定条件下发酵而成<sup>[37]</sup>。因其自然发酵周期较长 (12 ~ 18 个月),生产中通常采用添加发酵剂的形式加速发酵和提高产品品质,所以监测添加菌种的生长变化对于发酵过程的质控是必要的。为了快

速检测出富含 28 株原生菌株的复杂初始发酵环境中添加发酵剂的生长情况,UDOMSIL 等<sup>[38]</sup>使用基于目标菌株碱性丝氨酸蛋白酶 X 基因 (*aprX*) 及内转录间隔区 (ITS) 设计的特异性引物进行精确定量,在优化后的 PMA 处理条件下,对嗜盐性蛋白酶产生菌 (*Virgibacillus* sp.) SK37 和嗜盐四生球菌 (*Tetragenococcus halophilus*) MS33 的最低限可达到 10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup> CFU/mL。实验结果证实 PMA-qPCR 检测的稳定性未受到复杂基质的影响,所以可被用于监测发酵剂发酵过程的实用工具 (表 3)。

表 3 不同发酵食品活菌检测线性范围及最低检测限

Table 3 The detection limits of PMA-qPCR technique for enumeration of living microbes in different fermentation foods				
发酵食品	目标微生物	线性范围/ (CFU · mL <sup>-1</sup> )	最低检测限/ (CFU · mL <sup>-1</sup> )	参考 文献
红葡萄酒	布鲁士酒香酵母	10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>9</sup>	6.8 × 10 <sup>0</sup>	[25]
	酵母	10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	1.8 × 10 <sup>1</sup>	[24]
	乳酸菌	10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	1.0 × 10 <sup>1</sup>	[24]
	醋酸菌	10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	2.9 × 10 <sup>2</sup>	[24]
啤酒	布鲁士酒香酵母	10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>9</sup>	1.7 × 10 <sup>0</sup>	[25]
白葡萄酒	布鲁士酒香酵母	10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>9</sup>	4.3 × 10 <sup>0</sup>	[25]
	酵母	10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	4.1 × 10 <sup>2</sup>	[24]
	乳酸菌	10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	2.3 × 10 <sup>1</sup>	[24]
	醋酸菌	10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	6.1 × 10 <sup>1</sup>	[24]
红曲米酒	细菌	10 <sup>0</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	7.0 × 10 <sup>0</sup>	[26]
	乳酸菌	10 <sup>0</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	8.0 × 10 <sup>0</sup>	[26]
	真菌	10 <sup>0</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	3.5 × 10 <sup>1</sup>	[26]
	酵母	10 <sup>0</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	5.7 × 10 <sup>1</sup>	[26]
	植物乳杆菌	10 <sup>0</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	4.0 × 10 <sup>0</sup>	[26]
	酿酒酵母	10 <sup>0</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	2.6 × 10 <sup>1</sup>	[26]
	紫红曲霉	10 <sup>0</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	8.8 × 10 <sup>1</sup>	[26]
	嗜热链球菌 STY-31	10 <sup>6</sup> ~ 10 <sup>9</sup>	1.0 × 10 <sup>3</sup>	[30]
酸奶	德氏乳杆菌保加利亚亚种 LBY-27	10 <sup>5</sup> ~ 10 <sup>8</sup>	1.0 × 10 <sup>4</sup>	[30]
	嗜酸乳杆菌 LA-5	10 <sup>5</sup> ~ 10 <sup>8</sup>	1.0 × 10 <sup>4</sup>	[30]
	干酪乳杆菌干酪亚种 LC-01	10 <sup>6</sup> ~ 10 <sup>9</sup>	1.0 × 10 <sup>3</sup>	[30]
	双歧杆菌 BB-12	10 <sup>5</sup> ~ 10 <sup>8</sup>	1.0 × 10 <sup>4</sup>	[30]
	副干酪乳杆菌	10 <sup>0</sup> ~ 10 <sup>7</sup>	1.0 × 10 <sup>4</sup>	[31]
	乳酸乳球菌	10 <sup>4</sup> ~ 10 <sup>11</sup>	1.0 × 10 <sup>5</sup>	[32]
奶酪	瑞士乳杆菌 R0052	10 <sup>3</sup> ~ 10 <sup>8</sup>	1.0 × 10 <sup>5</sup>	[32]
	鼠李糖乳杆菌 R0011	10 <sup>3</sup> ~ 10 <sup>8</sup>	7.9 × 10 <sup>5</sup>	[32]
	双歧杆菌 BB-12	10 <sup>4</sup> ~ 10 <sup>9</sup>	1.0 × 10 <sup>5</sup>	[32]
鱼露	嗜盐性蛋白酶产生菌	10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	1.0 × 10 <sup>3</sup>	[38]
	嗜盐四生球菌	10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>6</sup>	1.0 × 10 <sup>2</sup>	[38]

4 展望

PMA-qPCR 技术是近年来较为新型的微生物计数技术,以其较高的工作效率和准确的定量结果受到很多学者的青睐。本文综述了近年来 PMA-qPCR 技

术在发酵食品科研领域的应用情况;值得注意的是,由于特定发酵食品内环境的复杂性和特异性,在实际应用中需针对相应的食品基质进行 PMA 反应条件优化。

## 参 考 文 献

- [1] 成黎. 传统发酵食品营养保健功能与质量安全评价[J]. 食品科学, 2012, 33(1):280-284.
- [2] 姚粟, 于学健, 白飞荣, 等. 中国传统发酵食品用微生物菌种名单的研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(9):242-262.
- [3] FONSECA S, CACHALDORA A, GÓMEZ M, et al. Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage[J]. Food Microbiology, 2013, 33(1):77-84.
- [4] NOGVA H K, DRØMTORP S M, NISSEN H, et al. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR[J]. Biotechniques, 2003, 34(4):804-813.
- [5] 赵晓祥, 庞晓倩, 庄惠生. 荧光定量 PCR 技术在环境监测中的应用研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(12):125-128.
- [6] REYNEKE B, NDLOVU T, KHAN S, et al. Comparison of EMA-, PMA-and DNase qPCR for the determination of microbial cell viability[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(19):7371-7383.
- [7] NEBE-VON-CARON G, STEPHENS P J, HEWITT C J, et al. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 42(1):97-114.
- [8] NOCKER A, CHEUNG C Y, CAMPER A K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(2):310-320.
- [9] 肖莉莉, 张昭寰, 娄阳, 等. 叠氮溴化丙锭(PMA)在食源性致病菌检测中的应用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(6):187-194.
- [10] ELIZAQUÍVEL P, AZNAR R, SÁNCHEZ G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 116(1):1-13.
- [11] LØVDAL T, HOVDA M B, BJØRKBLOM B, et al. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 85(2):164-169.
- [12] COCOLIN L, ALESSANDRIA V, DOLCI P, et al. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 167(1):29-43.
- [13] LAI C H, WU S R, PANG J C, et al. Designing primers and evaluation of the efficiency of propidium monoazide-quantitative polymerase chain reaction for counting the viable cells of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus salivarius*. [J]. Journal of Food & Drug Analysis, 2017, 25(3):533-542.
- [14] LOPEZ I, RUIZ-LARREA F, COCOLIN L, et al. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(11):6801-6807.
- [15] GONZÁLEZ Á, HIERRO N, POBLET M, et al. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 254(1):123-128.
- [16] BALDRIAN P, VĚTROVSKÝ T, CAJTHAML T, et al. Estimation of fungal biomass in forest litter and soil [J]. Fungal Ecology, 2013, 6(1):1-11.
- [17] HIERRO N, ESTEVE-ZARZOSO B, MAS A, et al. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR [J]. FEMS Yeast Research, 2010, 7(8):1340-1349.
- [18] MARTORELL P, QUEROL A, FERNÁNDEZ-ESPINAR M T. Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by Real-Time PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11):6823-6830.
- [19] VAN FRANKENHUYZEN J K, TREVORS J T, LEE H, et al. Molecular pathogen detection in biosolids with a focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration [J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 87(3):263-272.
- [20] TANTIKACHORNKIAT M, SAKAKIBARA S, NEUNER M, et al. The use of propidium monoazide in conjunction with qPCR and Illumina sequencing to identify and quantify live yeasts and bacteria. [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 234:53-59.
- [21] ANDORRÀ I, ESTEVE-ZARZOSO B, GUILLAMÓN J M, et al. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(2):257-262.
- [22] SHAO Y, WANG Z, BAO Q, et al. Application of propidium monoazide quantitative real-time PCR to quantify the viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(12):9570-9580.
- [23] DING J, HUANG X, ZHANG L, et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2009, 85(2):253-263.
- [24] RIZZOTTI L, LEVAV N, FRACCHETTI F, et al. Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods [J]. Food Control, 2015, 47:407-

- 412.
- [25] VENDRAME M, MANZANO M, COMI G, et al. Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Brettanomyces bruxellensis* in wine and beer by quantitative PCR. [J]. Food Microbiology, 2014, 42:196–204.
- [26] LV X C, LI Y, QIU W W, et al. Development of propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR (PMA-qPCR) assays to quantify viable dominant microorganisms responsible for the traditional brewing of Hong Qu glutinous rice wine [J]. Food Control, 2016, 66:69–78.
- [27] 杜鹏, 霍贵成. 国内外益生菌制品发展现状[J]. 食品科学, 2004, 25(5):194–198.
- [28] Codex Alimentarius Commission. Codex standard 243-2003, Codex standard for fermented milks[S]. Alimentarius Commission, 2003.
- [29] 田其英. 酸奶的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(1):91–94.
- [30] GARCÍA-CAYUELA T, TABASCO R, PELÁEZ C, et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR[J]. International Dairy Journal, 2009, 19(6–7):405–409.
- [31] SCARIOT M C, VENTURELLI G L, PRUDÊNCIO E S, 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.
- [32] DESFOSSÉS-FOUCAULT É, DUSSAULT-LEPAGE V, LE BOUCHER C, et al. Assessment of probiotic viability during cheddar cheese manufacture and ripening using propidium monoazide-PCR quantification[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3:350.
- [33] VILLARREAL M L M, PADILHA M, VIEIRA A D S, et al. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in *petit-suisse* cheeses under *in vitro* gastrointestinal conditions by propidium monoazide-qPCR [J]. Plos One, 2013, 79(4):1 414–1 417
- [34] ERKUS O, DE JAGER V C L, GEENE R T C M, et al. Use of propidium monoazide for selective profiling of viable microbial cells during Gouda cheese ripening[J]. International journal of food microbiology, 2016, 228:1–9.
- [35] 高洁, 俞丹, 陈頔, 等. 传统发酵乳开菲尔的研究进展[J]. 中国食品学报, 2016, 16(4):204–211.
- [36] PORCELLATO D, MAGRI M, NARVHUS J. Viable cells differentiation improves microbial dynamics study of fermented milks[J]. International Dairy Journal, 2015, 47(9):136-142.
- [37] 赵华杰, 何妍, 杨荣华, 等. 鱼露风味的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(7):123–128.
- [38] UDOMSIL N, CHEN S, RODTONG S, et al. Quantification of viable bacterial starter cultures of *Virgibacillus* sp. and *Tetragenococcus halophilus* in fish sauce fermentation by real-time quantitative PCR [J]. Food Microbiology, 2016, 57(8):54–62.

## Application of PMA-qPCR in enumerating living microbes in fermented foods

CHEN Zhuojun<sup>1</sup>, WEI Ming<sup>2</sup>, LIN Guo<sup>1</sup>, CHEN Yuqi<sup>1</sup>,  
LIANG Shan<sup>3</sup>, ZHANG Bolin<sup>1</sup>, ZHU Baoqing<sup>1\*</sup>

1(Beijing Key Laboratory of Forestry Food Processing and safety, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

2(COFCO Nutrition & Health Research Institute, Beijing 102209, China)3(Beijing Advanced Innovation Center for

Food Nutrition and Human Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

**ABSTRACT** Fermented foods are favored by consumers because of their high nutritional values and tastes. Monitoring living microorganisms during processing and storage of fermented foods is important for quality control, production evaluation and process modification. Propidium monoazide (PMA) is a highly photosensitive DNA-binding dye that can be used with quantitative fluorescence real-time PCR (qPCR) for quick, accurate, and specific detection. The mechanisms and influencing factors of PMA-qPCR, as well as its applications in enumerating living microbes in wines, beers, and yoghurts were reviewed. It was found that the types of target microorganisms and PMA treatment conditions were the most important influencing factors. The linear ranges and detection limits of detectable microbes in various fermented foods were summarized. This review aimed to provide a reference for multi-faceted applications of PMA-qPCR.

**Key words** fermented foods; enumeration of microorganisms; propidium monoazide (PMA); quantitative fluorescence real-time PCR