

实时荧光定量 PCR 技术在乳品微生物学中的应用研究进展

朱军伟, 杭锋, 王钦博, 宋馨, 侯建平 (光明乳业股份有限公司, 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436)

摘要 越来越多的基因组测序给特异性引物和探针的设计带来了极大的支持。最近有研究表明, 基于定量聚合酶链式反应 (qPCR) 方法的技术成功应用于发酵过程中的微生物计数以及乳制品中益生菌数量的计算。基于 qPCR 方法的技术进步包括实时荧光定量 PCR 技术, 不仅可以计数活菌数量, 还可以在单一反应体系中检测多个微生物菌群数量, 且能构建高通量 PCR 流程。实时荧光定量 PCR 技术在食品工业中的应用已证明其可靠性, 尽管如此, 该技术在乳品工业中的广泛使用还需要更多的技术支持和标准化方法。综述了实时荧光定量 PCR 技术及其在乳品微生物学中的最新研究与应用进展。

关键词 实时荧光定量; PCR; 益生菌; 干酪

中图分类号 S879.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)15-04764-03

Recent Advances of Real-time Quantitative PCR in Dairy Microbiology

ZHU Jun-wei et al (Bright Dairy Co. Ltd, State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai 200436)

Abstract Recent studies show that quantitative PCR (qPCR)-based methods are applied with success in enumerating fermenting microbes and health promoting bacteria in dairy products. The increasing number of sequenced genomes is now a crucial support to designing specific primers and probes. Technological advances in qPCR-based methods including viable quantitative PCR are also highlighted and could be promising strategies for quantifying merely viable cells, detecting multiple microorganisms in a single reaction and constructing high throughput PCR workflows. Application of real-time quantitative PCR in the food industry has proven its reliability nevertheless its widespread use in the dairy industry will need technical recommendations and standardization methods. In this paper, we proposed to synthesized major outputs from recent studies using PCR to display how this can offer new analytical solutions to dairy microbiology.

Key words Real-time Quantitative; PCR; Probiotic; Cheese

传统的定量检测方法依靠特定的微生物培养基对食品中活菌进行分离和计数, 测试过程需进行培养基准备、平板培养、菌落计数、生化鉴定等步骤, 所以整个检测显得复杂、费时^[1-2]。当前食品中病原菌的分子生物学检测方法已极大缩短了获得检测结果的时间, 这既能保证食品工业的产能提速, 同时又能保持其所有食品安全要求。如今, 基于聚合酶链反应方法检测食源性微生物病原菌已经获得了国际标准化组织 (ISO) 认可^[3-5]。

传统的微生物方法无法检测一些有活性但很难培养的微生物, 而分子生物学方法却能够实现。此外, 最新的分子生物学方法利用荧光染料特异性掺入 DNA 双链, 可以准确地计算活性微生物菌群的数量。

在乳品工业中, 微生物技术常被应用于食源性病原菌的检测和有益微生物如发酵微生物、益生菌的定量。由于益生菌和乳酸菌在乳制品中同时存在, 如何准确地计数每种益生菌和乳酸菌的数量给乳品工业带来了一个巨大挑战。乳品微生物学需要具有高鉴别能力的方法, 进而量化诸如乳制品和粪便等复杂系统中的益生菌数量, 并追踪其在食物链中存活能力的相关信息。因此, 国内外研究人员正在研究基于 PCR 的分子学方法以期能准确定量活菌数量, 还可以在单一反应体系中检测多个微生物数量, 且能构建高通量 PCR 流程^[6-8]。目前, 该方法已经取得了一些进展, 笔者就实时荧光定量 PCR 技术在乳品微生物学中的最新研究进行了综述, 并对其作用机理进行阐述, 期望能给实时荧光定量 PCR 技术在乳品工业中的推广使用提供一定的理论支持。

1 实时荧光定量 PCR 概述

1.1 实时荧光定量 PCR 的基本原理 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR) 是在 PCR 定性技术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基团 (染料或探针), 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[8-10]。

荧光染料能特异性掺入 DNA 双链, 发出荧光信号, 从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物增加完全同步。荧光探针是在探针的 5' 端标记一个荧光报告基团 (R), 3' 端标记一个淬灭基团 (Q), 两者可构成能量传递结构, 即 5' 端荧光报告基团所发出的荧光可被 3' 端淬灭基团吸收或抑制, 当两者距离较远时, 抑制作用消失, 报告基团荧光信号增强, 荧光监测系统可收到荧光信号。

定量的原理: 靶基因初始拷贝数越多, 所产生的循环阈值 (cycle threshold, CT) 越小。这里有 2 个问题需要明确: ① 荧光阈值的设定。在定量 PCR 中, 需要经过数个循环后荧光信号才能够被检测到, 一般以前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号。② CT 值为 PCR 过程中扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的循环次数。根据荧光产生的原理, 可将实时荧光定量 PCR 分为不同类型^[9-10] (表 1)。

1.2 实时荧光定量 PCR 的特点 实时荧光定量 PCR 技术与传统定量 PCR 技术相比, 具有以下优点^[11]: ① 实时定量 PCR 不需要 PCR 后处理, 所以可避免 PCR 的实验室污染, 大大减少因交叉污染引起的假阳性错误。② 可用 β -actin 基因序列对样本的扩增效率进行标化。在产物积聚的对数期进行实时分析, 允许对多种不同的基因进行同时分析, 而不必考虑“平台效应”对试验结果的影响。③ 节省了 PCR 后处理的时间, 样本通量大大提高。④ 实时定量 PCR 无需内标, 具

基金项目 “十二五”国家科技支撑计划 (2012BAD12B08)。

作者简介 朱军伟 (1988-), 男, 江苏泰兴人, 助理工程师, 硕士, 从事乳制品研究。

收稿日期 2014-04-28

有高度重复性,可对每个样本进行重复扩增以减少潜在错误。⑤实时定量 PCR 有很大的动力学范围(接近 1×10^6),用标准曲线对靶序列进行检测时,可对任何未知样本进行定量,循环阈值(threshold cycle, Ct)和相关的 DNA 模板拷贝数

呈线性相关。

另外,实时定量 PCR 技术有效地解决了传统定量 PCR 只能终点检测的局限,实现了每一轮循环均检测一次荧光信号的强度,并记录在计算机软件之中,通过对每个样品循环

表 1 实时荧光定量 PCR 技术分类

技术	供应商	荧光信号	多重 PCR	溶解曲线
SYBR Green I	多个	DNA 内部插入	不可	必需
Taqman	Applied Biosystems	水解探针	可	不需
Light cycle	Roche	双杂交探针	可	不需
分子信标	Sigma-Aldrich, IDT	发卡样杂交探针	可	必需
LUX	Invitrogen	荧光引物	可	必需

阈值的计算,根据标准曲线获得定量结果^[12-16]。

2 实时荧光定量 PCR 在乳品微生物学中的应用研究进展

2.1 实时荧光定量 PCR 在益生菌检测中的应用

根据世界卫生组织(WHO)对益生菌的定义^[17],它是指一类活的微生物,当摄入一定数量时,对宿主的健康有益。益生菌对宿主健康的积极作用还和其应用剂量紧密相关。宿主体内益生菌数量极其重要,那么要保证其剂量,就需要保证产品货架期内益生菌的存活数量及其在宿主肠道内的存活量;与此同时,益生菌也可在宿主回肠末端或大肠中自行繁殖到足够剂量,从而发挥益生作用。

几项研究结果表明,使用一些发酵微生物作为发酵乳中的益生菌在预防和治疗某些疾病方面呈现出显著有益的临床效应。Heyman 等研究表明,益生菌对于预防和治疗腹泻效果明显^[18]。Mustapha 等研究表明,益生菌的存在可以改善乳糖不耐症患者对于乳糖的消化^[19]。益生菌在预防和治理过敏性、炎症性肠病中能发挥积极作用^[20-21]。

益生菌鉴定和计数的传统方法是通过生化、形态学及选择性培养等方法进而区分不同益生菌的表型特征^[22]。

随着双歧杆菌在益生菌产品中的广泛使用,建立一种快速的定性且定量检测市售产品中双歧杆菌的方法显得极其重要。最新的一些研究成果表明,实时荧光定量 PCR 技术为乳品中发酵微生物和益生菌的定量检测提供了全新的方法,从而减少检测时间与劳力消耗^[23]。

王立平等建立了发酵乳制品中双歧杆菌种类和数量快速测定方法^[24]。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;采用实时荧光定量 PCR 手段测定双歧杆菌数量。研究结果表明,PCR-DGGE 能准确、快速鉴别双歧杆菌种类,检出限为 10^5 CFU/g;实时荧光定量 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。

Masco 等以 16s rDNA 或 *recA* 为目标基因分别设计引物,再进行实时荧光定量 PCR 分析,对 29 种益生菌产品中的双歧杆菌进行了定量检测^[25]。2 种实时定量 PCR 方法都很快,且定量结果都很相近,只有在检测含益生菌较少的产品时,以 16s rDNA 为目标基因的定量更为灵敏。

Sheu 等以 *tuf* 为目标基因设计引物进行实时 PCR 反应,能有效地检测到益生菌产品中的双歧杆菌;此外,还能检测

到存活的双歧杆菌数量以及原有双歧杆菌总数量,与平板计数法所得数目基本一致^[26]。此研究为检查益生菌产品的质量提供了一种行之有效的方法。

Herbel 等以 *hsp60* 为目标基因设计引物建立实时荧光定量 PCR 流程以检测酸奶中 5 种重要的益生乳杆菌属^[27]。通过此法的最低检测限为 10^5 CFU/ml,这对于市售酸奶制品来说已经是相当高效。因此,通过合理设计引物建立实时荧光定量 PCR 可以更准确、快速和灵敏地检测和定量市售产品中益生菌含量。

García 等建立了一种核酸染料 propidium monoazide (PMA) 与定量 PCR 技术联合选择性检测发酵乳制品中活性乳酸菌和双歧杆菌的技术(PMA-qPCR)^[28]。结果表明,PMA-qPCR 技术既能够有效区分活性菌与非活性菌,又能区别活性乳酸菌和活性双歧杆菌,同时还能快速有效地计数 2 种活性菌的数量。与平板计数法相比,检测时间由 72 h 缩短至 3 h 左右。

Desfossés 等首度通过 PMA-qPCR 技术监测切达干酪制作以及成熟过程中益生菌菌群(主要分析植物乳杆菌和双歧杆菌)的存活性能^[29]。结果表明,与传统分子技术相比,PMA-qPCR 技术更具特异性和准确性。

因此,PMA-qPCR 技术在发酵乳制品或者干酪中益生菌的鉴定和定量中具有广阔的应用前景。

2.2 实时荧光定量 PCR 在发酵乳制品乳酸菌检测中的应用

Sheu 等通过 *tuf* 基因设计引物开发了多重非定量 PCR 技术,可以用于同时检测市售乳制品中嗜乳酸杆菌、干酪乳杆菌群、德氏乳杆菌以及长双歧杆菌^[30]。然而,很少有研究报道如何既能检测乳制品中乳酸菌又能对其进行定量。

Furet 等开发并评估了一种实时荧光定量 PCR 技术应用于特异性检测和定量市售发酵乳制品中乳酸菌菌群(嗜热链球菌、德氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌、约氏乳酸杆菌、副干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌)的数量,并与传统平板计数法进行比较^[31]。结果表明,实时荧光定量 PCR 不仅可以鉴定发酵乳制品原有的乳酸菌菌群种类,还可以准确地定量各不同菌群的菌体数量。

吴荣荣等采用实时荧光定量 PCR 分析了酸乳中的德氏乳杆菌 I2 和嗜热链球菌 S1 的数量^[32],德氏乳杆菌 I2 的活菌数与细胞循环数的相互关系曲线为 $Y = -2.936 \log X +$

34.72 ($R^2 = 0.998$), 采用平板计数法获得的样品中 L2 浓度为 8.82×10^8 ml, 荧光定量的结果是 8.78×10^8 ml; 嗜热链球菌 S1 活菌数与细胞循环数的相互关系曲线为 $Y = -3.039 \log X + 35.45$ ($R^2 = 0.995$), 采用平板计数法, 获得的样品中嗜热链球菌 S1 浓度为 1.08×10^8 ml, 荧光定量的结果是 1.06×10^8 ml。实时荧光定量的方法适合于酸乳中乳酸菌的快速计数。

2.3 实时荧光定量 PCR 在干酪制品微生物检测中的应用 在干酪的成熟过程中, 参与发酵过程的有益微生物对于最终成品干酪的风味品质尤为重要。由于缺少可供选择的媒介, 量化干酪表面的细菌非常困难, 因此干酪表面的微生物菌群生态系统还得不到广泛研究。

Monnet 等开发了 SYBR Green I 实时荧光 PCR 方法用来定量市售涂抹型干酪上的干酪棒状杆菌^[33]。此方法有助于研究涂抹型干酪的生态系统以及干酪棒状杆菌的功能特性。

卡门培尔青霉和娄地青霉在霉菌表面成熟干酪和蓝纹干酪的成熟过程中起到了至关重要的作用。G. Le Dréan 等开发了 qRT-PCR 技术, 为干酪生产厂家提供了一种简便且灵敏的检测方法, 即通过卡门培尔青霉和娄地青霉的成长动力学, 进而很好地理解微生物变化与生物化学变化两者之间的关系^[34]。

Ladero 等利用高效液相色谱法 (HPLC) 和实时荧光定量 PCR 技术对不同市售干酪中组胺及组胺产生的细菌含量分别进行了分析测定^[35]。即使在干酪的生产过程中, 利用实时荧光定量 PCR 技术可以在组胺水平积累到不可接受程度之前检测到组胺产生菌株的含量, 这就能有效解决高效液相色谱法只能检测干酪中组胺含量而不能检测产生组胺的细菌数量的问题。

Achilleos 等以 *tuf* 为目标基因开发了 2 种实时荧光定量 PCR 方法来定量研究干酪样品中乳酸乳球菌和副干酪乳杆菌 2 种菌群的数量^[36]。结果表明, 此方法能极为有效地定量干酪中乳酸乳球菌菌群的数量, 而对于副干酪乳杆菌菌群的计数却无法达到理想效果。

Zago 等以 *pheS* 为目标基因开发了一种实时荧光定量 PCR 方法来特异性检测定量干酪中的一类有益微生物——灰黄色肠球菌 (*Enterococcus gilvus*), 其检测限可达到 10^4 CFU/g^[37]。此方法有助于检测和定量干酪中的灰黄色肠球菌, 进而更好地理解其在干酪以及其他发酵食品中所起到的技术作用和安全性作用。

Martin 等以 *lacZ* 为目标基因设计引物, 基于 SYBR Green I 建立实时荧光定量 PCR 流程来定量检测干酪中的所有大肠菌群, 且整个流程仅需花费 10 ~ 12 h^[38]。

3 小结与展望

该研究中所提到的大多数研究案例以及最新的研究进展说明实时荧光定量 PCR 技术在乳品微生物学中的应用才刚刚起步, 许多国内外学者正致力于其广泛应用。未来在这一领域的发展是希望通过此技术能够给乳品工业化过程中微生物风险评估提供有利的信息。当然, 实时荧光定量 PCR

技术的发展, 不能与其他传统和分子学方法相脱离, 而应该与他们结合起来以实现优势互补。

参考文献

- [1] VALASEK M A, REPA J J. The power of real-time PCR[J]. *Advances in Physiology Education*, 2005, 29(3): 151-159.
- [2] MACKAY I M. Real-time PCR in the microbiology laboratory[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, 10(3): 190-212.
- [3] ISO22174:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens: General requirements and definitions[S]. 2005.
- [4] ISO20837:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens: Requirements for sample preparation for qualitative detection[S]. 2006.
- [5] ISO22119:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens: General requirements and definitions[S]. 2010.
- [6] 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.
- [7] NOCKER A, SOSSA-FERNADEZ P, BURR M D, et al. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5111-5117.
- [8] 赵文静, 徐浩, 包秋华, 等. 实时荧光定量 PCR 中内参基因的选择[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(12): 1825-1829.
- [9] 纪冬, 辛绍杰. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(4): 598-600.
- [10] AHMAD A I, GHASEMI J B. New FRET primers for quantitative real-time PCR[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387(8): 2737-2743.
- [11] 裴晓燕, 刘秀梅. 食源性致病菌定量检测方法研究进展[J]. *国外医学: 卫生学分册*, 2004, 31(5): 257-264.
- [12] HEID C A, STEVENS J, LIVAK K J, et al. Real time quantitative PCR[J]. *Genome Research*, 1996, 6(10): 986-994.
- [13] BATT C A. Molecular diagnostics for dairy-borne pathogens[J]. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80(1): 220-229.
- [14] GIBSON U, HEID C A, WILLIAMS P M. A novel method for real time quantitative RT-PCR[J]. *Genome Research*, 1996, 6(10): 995-1001.
- [15] LI W, DRAKE M A. Development of a quantitative competitive PCR assay for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 Cells[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3291-3294.
- [16] NOGVA H K, RUDI K, NATERSTAD K, et al. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4266-4271.
- [17] Joint FAO/WHO Working Group. Guidelines for the evaluation of probiotics in food[R]. 2002.
- [18] HEYMAN M, MÉNARD S. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002, 59(7): 1151-1165.
- [19] MUSTAPHA A, JIANG T, SAVAIANO D A. Improvement of Lactose Digestion by Humans Following Ingestion of Unfermented Acidophilus Milk: Influence of Bile Sensitivity, Lactose Transport, and Acid Tolerance of *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80(8): 1537-1545.
- [20] KALLIOMÄKI M, SALMINEN S, ARVILOMMI H, et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial[J]. *The Lancet*, 2001, 357(9262): 1076-1079.
- [21] GIONCHETTI P, RIZZELLO F, VENTURI A, et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(2): 305-309.
- [22] CHARTERIS W P, KELLY P M, MORELLI L, et al. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, 35(1): 1-27.
- [23] FALENTIN H, POSTOLLEC F, PARAYRE S, et al. Specific metabolic activity of ripening bacteria quantified by real-time reverse transcription PCR throughout Emmental cheese manufacture[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 144(1): 10-19.

耗和汁液流失率均低于未处理冷冻牡蛎。

模糊数学感官评价结果表明,4 个因素对模糊评价总分的影响从大到小的顺序为食盐和茉莉花茶复配物浓度 > 三

聚磷酸钠浓度 > 壳聚糖浓度 > 臭氧水浓度;冷冻牡蛎的最优加工工艺条件为食盐和茉莉花茶复配物浓度 3.0%、三聚磷酸钠浓度 3.0 g/kg、壳聚糖浓度 3.0%、臭氧水浓度 2.0 mg/L。

表 4 正交试验结果

试验号	因素				模糊评价 总分 y
	三聚磷酸钠浓度(A)	食盐和茉莉花茶复配物浓度(B)	臭氧水浓度(C)	壳聚糖浓度(D)	
1	1	1	1	1	6.045
2	1	2	2	2	6.601
3	1	3	3	3	7.544
4	2	1	2	3	7.127
5	2	2	3	1	7.273
6	2	3	1	2	8.069
7	3	1	3	2	7.503
8	3	2	1	3	7.659
9	3	3	2	1	8.360
T_1	20.190	20.675	21.773	21.678	$T = 66.181$
T_2	22.469	21.533	22.088	22.173	$\sum y^2 = 490.671$
T_3	23.522	23.973	22.320	22.330	
S	1.934	1.952	0.050	0.077	ST = 4.013
较优水平	A ₃	B ₃	C ₃	D ₃	
因素主次	食盐和茉莉花茶复配物浓度 > 三聚磷酸钠浓度 > 壳聚糖浓度 > 臭氧水浓度				

参考文献

- [1] 叶盛权,郑贤德,皇甫. 牡蛎冷冻加工工艺[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2003,9(3):12-13.
- [2] 陈慧斌,王梅英,王则金,等. 牡蛎冻藏期间脂肪氧化影响因素研究[J]. 西南大学学报:自然科学版,2008,30(2):96-101.
- [3] 陶晶,杨瑞金,张文斌,等. 即食牡蛎软罐头的研制[J]. 食品研究与开发,2008,29(4):94-98.
- [4] 杨贤庆,陈胜军,李来好,等. 高水分半干牡蛎生产工艺技术研究[J]. 食品科学,2006,27(11):343-346.
- [5] 邱春江,胡明霞. 复合抗冻保鲜剂在文蛤冻藏过程中的应用[J]. 食品研究与开发,2009,30(9):162-165.
- [6] 曹荣,薛长湖,薛勇. 臭氧水对牡蛎细菌菌相及货架期的影响[J]. 食品工业科技,2006,27(5):63-65.
- [7] 费星,秦小明,林华娟,等. 臭氧净化对近江牡蛎的存活率和主要营养成分的影响[J]. 食品工业科技,2009,30(7):91-93.
- [8] 潘志民,邹文中,邹艾一,等. 模糊数学感官评价法优化培根加工工艺[J]. 食品与机械,2014,31(2):123-126.
- [9] 刘勤华,周光宏,孟美晨,等. 利用模糊数学感官评价法研究猪肉丸加工工艺[J]. 食品与机械,2011,27(6):249-253.
- [10] 王立平,刘晓莉,蔡雪凤,等. 发酵乳活性双歧杆菌种类快速识别及定量研究[J]. 现代食品科技,2013,29(4):858-862.
- [11] 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.
- [12] SHEU S J, HWANG W Z, CHIANG Y C, et al. Use of *Tuf* Gene-Based Primers for the PCR Detection of Probiotic Bifidobacterium Species and Enumeration of Bifidobacteria in Fermented Milk by Cultural and Quantitative Real-Time PCR Methods [J]. Journal of Food Science, 2010,75(8):521-527.
- [13] HERBEL S R, LAUZAT B, NICKISCH-ROSENECK M, et al. Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yoghurt by quantitative real-time PCR [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013,115(6):1402-1410.
- [14] 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):405-409.
- [15] 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.
- [16] SHEU S J, HWANG W Z, CHEN H C, et al. Development and use of *tuf* gene-based primers for the multiplex PCR detection of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* group, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Bifidobacterium longum* in commercial dairy products [J]. Journal of Food Protection, 2009,72(1):93-100.
- [17] FURET J P, QUÉNÉE P, TAILLIEZ P. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004,97(2):197-207.
- [18] 吴荣荣,刘海鹏,王敏,等. 酸乳中乳杆菌和链球菌的实时荧光定量分析[J]. 中国乳品工业,2010(8):38-40.
- [19] MONNET C, CORREIA K, SARTHOU A S, et al. Quantitative detection of *Corynebacterium casei* in cheese by real-time PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006,72(11):6972-6979.
- [20] LE DRÉAN G, MOUNIER J, VASSEUR V, et al. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti mycelium* by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010,138(1):100-107.
- [21] LADERO V, LINARES D M, FERNÁNDEZ M, et al. Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content [J]. Food Research International, 2008,41(10):1015-1019.
- [22] ACHILLEOS C, BERTHIER F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples [J]. Food Microbiology, 2013,36(2):286-295.
- [23] ZAGO M, BONVINI B, CARMINATI D, et al. Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2009,32(7):514-521.
- [24] MARTÍN M C, MARTÍNEZ N, DEL RIO B, et al. A novel real-time polymerase chain reaction-based method for the detection and quantification of lactose-fermenting *Enterobacteriaceae* in the dairy and other food industries [J]. Journal of Dairy Science, 2010,93(3):860-867.

(上接第 4766 页)