

啤酒腐败菌耐乙酸乳杆菌种特异性检测体系的建立与应用

曹伟华^{1,2}, 罗娜³, 孙义玄^{1,2}, 涂京霞³, 刘静³, 王德良², 郝建秦², 栾春光^{2*}, 包怡红^{1*}

1(东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨, 150040) 2(中国食品发酵工业研究院有限公司, 北京, 100015)

3(广州南沙珠江啤酒有限公司, 广东 广州, 511462)

摘 要 以耐乙酸乳杆菌的 3 个特异性基因为靶标, 设计并优化了 3 对耐乙酸乳杆菌的特异性引物, 建立了基于 SYBR GREEN 实时荧光定量 PCR 的耐乙酸乳杆菌定性定量检测的标准检测 (standard operation procedure, SOP) 方法。利用耐乙酸乳杆菌 CN247 的基因组 DNA 作为标准品绘制了标准曲线, 实现了对耐乙酸乳杆菌的定量检测, 耐乙酸乳杆菌的最低检测限可达 100 CFU/mL, 精度可达 10 CFU/mL。大生产样品在培养基中富集培养 48 h 后即可满足检测的要求, 检出率为 100%, 整个检测时间控制在 3 d 以内, 满足了啤酒企业对出厂产品快速检测的质量控制要求。

关键词 耐乙酸乳杆菌; RT-qPCR; 特异性引物; 定性定量检测; 标准检测方法

啤酒是世界上最受欢迎的酒精饮料之一。尽管工业生产中对微生物污染高度重视, 但由于啤酒微生物的高度适应性, 微生物污染的情况仍时有发生, 这给啤酒生产企业带来了极大的困扰^[1]。

啤酒中的腐败菌种类较多, 以乳酸菌为主。近年, 啤酒中发现的 1 个新啤酒腐败菌种——耐乙酸乳杆菌 (*Lactobacillus acetotolerans*), 因其特殊的生理特性引起了人们的关注^[2]。啤酒中的耐乙酸乳杆菌保持了乳杆菌的菌种特性, 以乳酸、醋酸和双乙酰为糖酵解终产物, 大量的双乙酰使啤酒产生了令消费者不愉快的黄油味和油腻的口感, 严重影响了啤酒的品质; 同时, 该菌具有在一般营养条件下不易培养的生理特性, 国标等常规方法难以检测到此菌, 出现假阴性结果^[3]。这使得啤酒在贮存或销售环节易出现质量问题, 严重影响产品形象和企业声誉。

基于微生物检测技术的快速发展, 除常规的检测方法外, 蛋白质和核酸等分子检测手段也得到广泛应用。其中聚合酶链式反应 (polmerase chain reaction, PCR) 技术以其较高的灵敏性和准确性在啤酒腐败菌检测中得到普遍认可^[4]。PCR 检测多以啤酒腐败菌某些特定的靶标进行检测, 包括 16SrDNA 通用引物

和四联球菌特异性引物等^[5-7]; 或利用某些特殊抗性基因, 如酒花抗性基因 *horA*^[8]、*horB*^[9] 或 *horC*^[10-11] 进行跨种属检测, 以实现啤酒腐败菌的快速检测。但对于新出现的啤酒污染菌仍然需要建立对应的检测方法, 以实现对其进行有效的监控^[12]。因此本研究以建立啤酒中耐乙酸乳杆菌种特异性检测体系为切入点, 建立特异性的检测体系, 以实现啤酒生产过程质量检测和对出厂啤酒提供必要的技术保障。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

2-16N 高速微量离心机, 湖南恒诺仪器设备有限公司; NanoDrop One, 赛默飞世尔仪器有限公司; ABI7500 real time PCR system, 美国 ABI 公司; Multi-skan FC 酶标仪, 赛默飞世尔仪器有限公司; SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; BX51 显微镜, 奥林巴斯 (中国) 有限公司; LRH-250 培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; BC-C57PCR 仪, 北京天林恒泰科技有限公司; BG-sub MIDI 多用途水平电泳仪、Tanon 1600 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司。

NBB-P 培养基, 德乐公司; KK4601 KAPA SYBR FAST 试剂盒, KAPA BIOSYSTEMS; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司。

1.2 本研究中使用的菌株

本研究中使用的菌株均分离自出现混浊、异味或产生沉淀的啤酒样品, 共分离鉴定了 12 株啤酒腐败菌, 菌株信息见表 1。所有菌株均采用平板分离后再

第一作者: 曹伟华硕士研究生和罗娜硕士研究生为共同第一作者 (栾春光高级工程师和包怡红教授为共同通讯作者, E-mail: chunguanglun@163.com; baoyihong@163.com)。

基金项目: 广州市科技计划项目珠江科技新星专项 (201610010183); 北京市科技新星计划 (Z181100006218004)

收稿日期: 2019-09-06, 改回日期: 2019-09-23

进行厌氧培养^[13-14]。

表 1 本研究中分离和使用的啤酒腐败菌菌株

Table 1 Beer spoilage strains isolated and used in the study

序号	菌株编号	鉴定结果
1	L2	<i>Lactobacillus lindneri</i>
2	L150	<i>Lactobacillus brevis</i>
3	L238	<i>Lactobacillus casei</i>
4	L758	<i>Lactobacillus plantarum</i>
5	L1104	<i>Lactobacillus backii</i>
6	CN004	<i>Lactobacillus paracasei</i>
7	CN009	<i>Lactobacillus harbinensis</i>
8	CN124	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
9	CN134	<i>Lactobacillus brevis</i>
10	CN247	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>
11	SaT	<i>Pediococcus damnosus</i>
12	250	<i>Lactobacillus hilgardii</i>

1.3 引物设计与验证

1.3.1 耐乙酸乳杆菌特异性基因的筛选与引物设计

目前开放的 GenBank 数据库中仅有一株较为完整的耐乙酸乳杆菌的基因组数据,其余均为基因组草图^[15-16]。研究中根据以上数据和预测的蛋白质信息,利用 Mauve 软件比对 GenBank 中 23 株耐乙酸乳杆菌基因组,从中筛选出 10 个耐乙酸乳杆菌较为特异的基因编码区片段,然后将基因编码序列与数据库中的微生物序列进行 BLAST 比对,在比对结果中排除具有较多相似菌株且相似度较高的基因序列,保留比对结果中只有耐乙酸乳杆菌的特异性基因序列,以此筛选出耐乙酸乳杆菌特有的基因作为检测的备选基因用于后续研究。

1.3.2 引物设计

下载筛选到的目的基因序列,使用 Primer premier 5 软件进行引物设计。引物长度 18~24 bp,GC 含量 40%~60%,目标产物在 130 bp~300 bp,Tm 值在 55~60℃,设计完成后登录在线引物设计工具^[17-18],在模板输入框中分别输入引物上下游序列,在线检测合成产物。

1.4 扩增体系与反应条件

将设计好的引物送上海生工生物有限公司合成。扩增反应总体体系为 20 μL,包括上下游引物各 0.4 μL (200 nmol/L),基因组 DNA 为 1.0 μL (1 ng/μL),2×mix10 μL,50×ROX 0.4 μL,无菌水定容到 20 μL;反应条件见表 2。

1.5 耐乙酸乳杆菌定性检测

1.5.1 引物特异性验证

表 2 耐乙酸乳杆菌种特异性 PCR 反应条件

Table 2 Speceis-specific PCR reaction conditions

反应阶段	反应温度与时间设置				
恒温阶段	step1 95℃	10 min			
循环阶段	step1 95℃	15s	step2 60℃	60s	30cycle
	step1 95℃	15s	step2 60℃	15s	
熔解曲线阶段	step3 95℃	30s	step4 60℃	5s	
	step3 95℃	30s	step4 60℃	5s	
冷却阶段	step1 60℃	7min			

以提取的啤酒腐败菌耐乙酸乳杆菌基因组 DNA 为模板,使用设计的 10 对耐乙酸乳杆菌引物分别对每种菌的基因组进行扩增,筛选特异性最佳的耐乙酸乳杆菌引物用于后续混合菌中耐乙酸乳杆菌的定性

1.5.2 混合菌中耐乙酸乳杆菌的定性检测

以本研究中使用的 12 株啤酒腐败菌的基因组 DNA 混合物作为模板,检测筛选的特异性引物在混合菌中耐乙酸乳杆菌的检出情况^[21]。

1.5.3 同种属耐乙酸乳杆菌的检测

以同种属的耐乙酸乳杆菌 2011-3 (2011 年 3 月在 8°纯生啤酒中回收样品中检出)与 2011-8 (2011 年 8 月在 10°纯生微检留样中检出)的 DNA 为模板,检测引物特异性。

1.6 耐乙酸乳杆菌特异性探针的定量检测

使用细菌基因组提取试剂盒,提取耐乙酸乳杆菌的菌悬液(1.0×10⁸ CFU/mL)基因组。经 10 倍系列梯度稀释,得到耐乙酸乳杆菌不同 DNA 浓度的标准品。再以该标准品为模板,使用筛选到的特异性耐乙酸乳杆菌引物进行 RT-qPCR 扩增,建立耐乙酸乳杆菌的标准曲线,得到标准曲线的相关性方程,用于后续的实际样品检测^[22]。

1.7 耐乙酸乳杆菌特异性探针的最低检出限

将培养好的耐乙酸乳杆菌按照 10 倍系列梯度稀释后,分别接种到 NBB-B 液体培养基中,26℃厌氧培养 2 d,提取基因组。利用优化的种特异性引物对目标菌上机检测,比对确认样品中耐乙酸乳杆菌的菌量与实际值之间的差异,完成样品中耐乙酸乳杆菌的种特异性定性和定量检测。

1.8 耐乙酸乳杆菌特异性引物检测实际样品

跟踪生产上的 20 批样品,利用膜过滤(0.45 μm)富集啤酒样品中的微生物。然后,将抽滤膜置于 NBB-B 培养基中,26℃厌氧培养 2 d,取 10 mL 菌液提取基因组 DNA,然后使用本研究方法进行检测。同时,对阳性样品进行菌株分离,然后送往华大基因

公司进行测序,对比本研究建立的方法与实际样品的一致性。

2 结果与分析

2.1 特异性引物筛选和定性检测

2.1.1 耐乙酸特异性引物的筛选

表 3 本研究筛选的啤酒腐败菌耐乙酸乳杆菌的特异性引物序列

Table 3 Specific primer sequence for *Lactobacillus acetotolerans*

引物名称	引物序列 5'—3'	对应耐乙酸乳杆菌基因	片段大小/bp
YW5	F:TAAAAGAAGTAACGCAAACCACG	AP014808.1:603921-604277 硫代还原酶	163
	R:ACGGATACAAACGCTGCTCAAC		
YW6	F:CGGAAATGTATTAGACGGTGT	AP014808.1:1509468-1510004 保守预测蛋白	150
	R:ATGATGAAGCGTAAGAAGGATG		
YW7	F:TCTTATTGCTTCTGGTTTGG	AP014808.1:529550-529885 保守预测蛋白	143
	R:ACACGATGCGACTGATTTTA		

2.1.2 耐乙酸乳杆菌特异性引物定性检测单一 DNA 模板的结果

以本研究中 12 株菌的基因组为模板,分别用 YW5、YW6 和 YW7 三对耐乙酸乳杆菌特异性引物进

按照 1.3 的方法,初步筛选 10 个基因作为备选靶标用于啤酒中耐乙酸乳杆菌的种特异性检测。以啤酒腐败菌耐乙酸乳杆菌 CN247 基因组 DNA 为模板,经 RT-qPCR 扩增后,剔除产生非特异性片段的引物,最终确定了 3 对特异性强的引物,引物序列如表 3 所示。

行 RT-qPCR 扩增,以确认 3 对引物对耐乙酸乳杆菌检测的特异性。YW5、YW6 和 YW7 特异性引物的 RT-qPCR 扩增曲线和熔解曲线如图 1 所示。

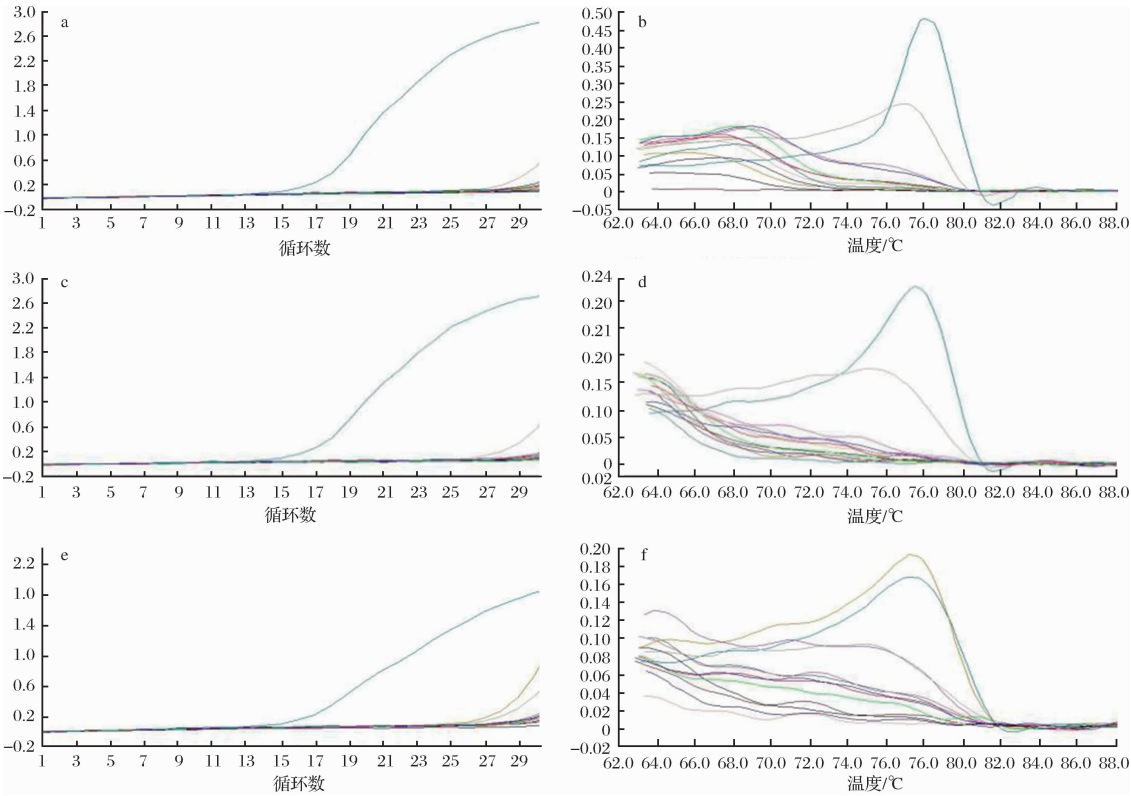


图 1 YW5、YW6 和 YW7 引物在 RT-qPCR 上检测单一 DNA 的扩增曲线和熔解曲线

Fig.1 Amplification curve and melting curve of detection of single DNA by YW5,YW6 and YW7 primers on RT-qPCR

如图 1 所示,使用 1.4 的反应体系和反应条件, YW5、YW6 和 YW7 三对引物只有在扩增耐乙酸乳杆菌 CN247 时分别出现了对应的扩增曲线,其余菌株

均无扩增曲线;同时,对应的熔解曲线出现单一尖锐的峰,没有杂峰,说明在本研究的反应体系和反应条件下,3 对引物对于耐乙酸乳杆菌菌种 CN247 检测具

有特异性,参照 Ct 值和熔解曲线可将 CN247 与其他 11 株腐败菌区分开来,因此这 3 对引物可以作为 CN247 的特异性引物用于 12 种啤酒腐败菌中耐乙酸乳杆菌菌种的定性检测。

2.1.3 耐乙酸乳杆菌特异性引物定性检测混合

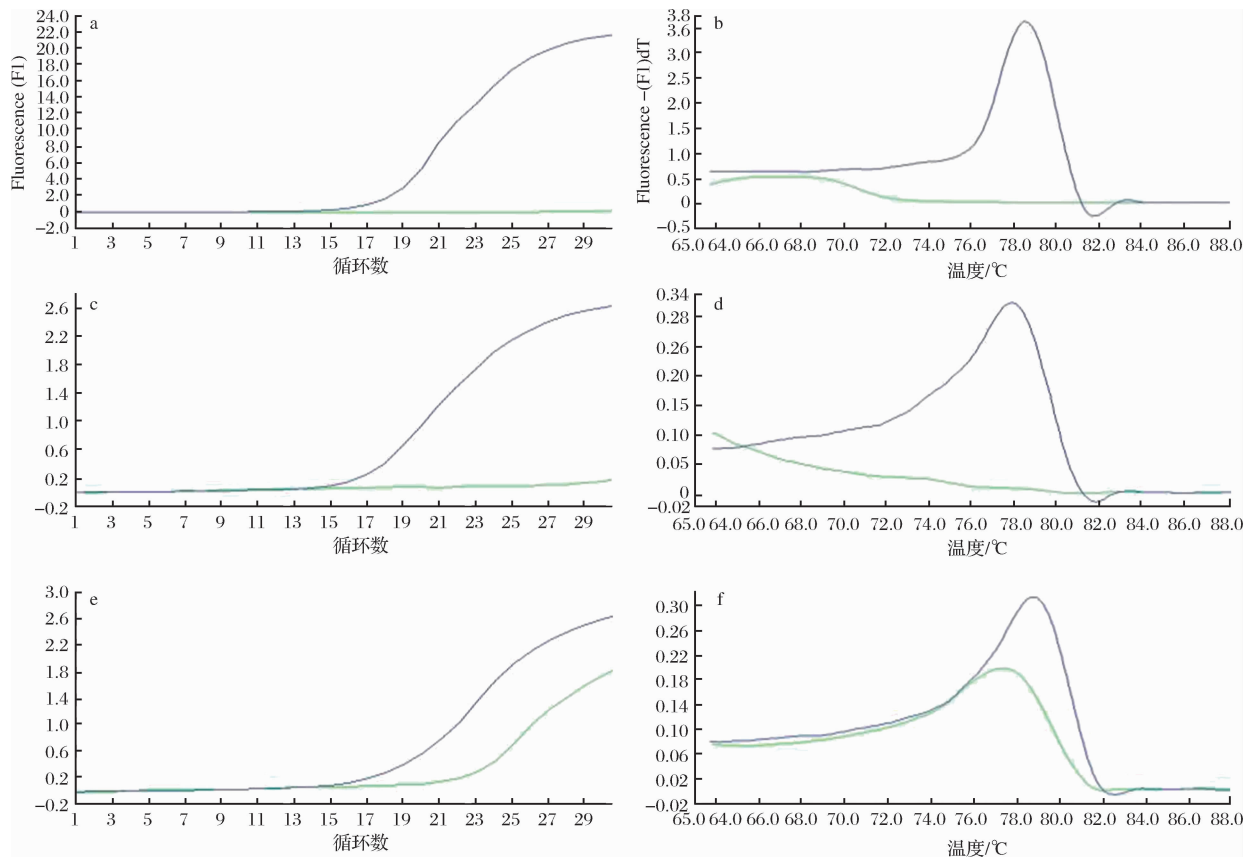


图2 YW5、YW6 和 YW7 引物在 RT-qPCR 上检测混合 DNA 的扩增曲线和熔解曲线
Fig.2 Amplification curve and melting curve of detection of mixed DNA by YW5、YW6 and YW7 primers on RT-qPCR

如图 2 所示,在分别使用 3 对特异性引物对混合 DNA 样品进行扩增时,在多个复杂模板及近缘乳酸菌菌种存在的情况下,检测体系只对耐乙酸乳杆菌的检测具有种特异性,说明引物特异性良好。

2.1.4 耐乙酸乳杆菌特异性引物定性检测同种属其他耐乙酸乳杆菌

为了进一步验证设计的特异性引物对另外 2 株鉴定的耐乙酸乳杆菌 2011-3 和 2011-8 检测的有效性,使用其中 1 对引物 YW5 对测试菌株 DNA 进行 PCR 扩增,结果如图 3 所示。

RT-qPCR 测试结果表明,检测的 2 株菌 2011-3 与 2011-8 为耐乙酸乳杆菌,与分子鉴定的结果相同。说明设计的引物对耐乙酸乳杆菌菌种具有种特异性。

DNA 模板

为了进一步验证所筛选引物的特异性,研究中将 12 个菌种的基因组混合后作为模板,利用筛选的 3 对引物对目标产物进行扩增,扩增结果如图 2 所示。

因此,以分离到的 12 株啤酒污染菌基因组为模板,无论是单一菌 DNA 还是混合菌的 DNA,通过 YW5、YW6 和 YW7 三对引物在 RT-qPCR 上扩增后,均能对样品中的耐乙酸乳杆菌检测出唯一的扩增曲线和熔解曲线,同时也能对耐乙酸乳杆菌的菌种进行种特异性有效检出,表明了 3 对引物的特异性符合检测耐乙酸乳杆菌的检测要求。

2.2 定量检测结果

2.2.1 耐乙酸乳杆菌 DNA 标准曲线的建立

以 10^8 CFU/mL 耐乙酸乳杆菌提取的基因组为基础,通过 10 倍梯度稀释的 DNA 为模板,以特异性引物 YW5 对不同梯度的耐乙酸乳杆菌基因组 DNA 扩增,建立耐乙酸乳杆菌标准曲线,如图 4 所示。

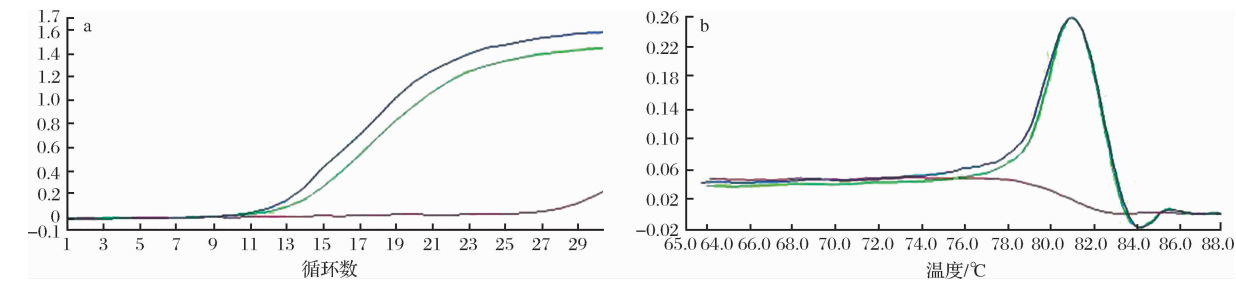


图3 YW5引物在RT-qPCR上检测耐乙酸乳杆菌2011-3和2011-8的扩增曲线和熔解曲线

Fig 3 Amplification curve and melting cuve of detection of strain 2011-3 and 2011-8 by YW5 primer on RT-qPCR

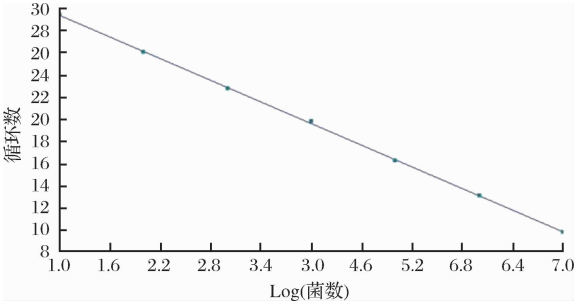


图4 耐乙酸乳杆菌DNA的标准曲线

Fig. 4 Standard curve of *Lactobacillus acetotolerans* DNA

如图4所示,7个浓度梯度的耐乙酸乳杆菌DNA样品扩增的标准曲线满足误差范围,其对应的回归方程 $y = -3.344X + 33.56$, $R^2 > 0.99$,线性关系良好,满足后续对标的需要。

2.2.2 标曲的重复性和再现性验证

选取3人分别使用新开发的耐乙酸乳杆菌特异性探针YW5,验证定量标曲(从DNA稀释至上机为一次操作)的重复性和再现性,每人做6次标曲,实验结果如表4所示。

如表4所示,每个人测试6次标曲斜率的重复性RSD均在5%以内,3人测试标曲的再现性RSD为3.94%,在5%的合格范围内,说明标曲的重复性和再现性良好,可以用于实际的检测。

2.2.3 耐乙酸乳杆菌的最低检出限

为了进一步确定耐乙酸乳杆菌特异性引物的最低检出限,将浓度 1×10^8 CFU/mL的耐乙酸乳杆菌CN247的原始菌液10倍梯度稀释,并以最后3个梯度分别进行平板计数,26℃厌氧培养2 d。再对各梯度的菌液平板计数,确定样品培养前后的菌体浓度。培养后的菌液分别取10 mL菌液提取DNA后在RT-qPCR进行检测,结果如表5所示。

不同梯度接种的样品经预培养2 d后,取10 mL

表4 标曲的重复性和再现性结果
Table 4 Repeatability and reproducibility results offstand curve

序号	标曲	相关性 (R^2)	斜率重复性的 RSD	操作者
1	$Y = -2.966X + 30.92$	0.86	3.19%	操作者 1
2	$Y = -2.984X + 30.23$	1.00		
3	$Y = -2.985X + 30.84$	1.00		
4	$Y = -3.088X + 31.02$	1.00		
5	$Y = -3.153X + 31.53$	0.98		
6	$Y = -3.204X + 31.99$	1.00		
7	$Y = -3.303X + 32.46$	1.00	1.77%	操作者 2
8	$Y = -3.309X + 32.57$	1.00		
9	$Y = -3.235X + 32.47$	1.00		
10	$Y = -3.225X + 31.84$	1.00		
11	$Y = -3.395X + 32.89$	1.00		
12	$Y = -3.258X + 32.00$	1.00		
13	$Y = -3.231X + 32.10$	1.00	1.76%	操作者 3
14	$Y = -3.205X + 31.72$	1.00		
15	$Y = -3.259X + 31.89$	1.00		
16	$Y = -3.174X + 31.83$	1.00		
17	$Y = -3.259X + 31.11$	1.00		
18	$Y = -3.340X + 32.81$	1.00		
标曲斜率再现性 RSD			3.94%	

表5 不同梯度CN247培养2 d后的菌液使用特异性探针RT-qPCR测试结果

Table 5 The results of RT-qPCR using the special probe to detecting the suspension of CN247 after cultivation

编号	培养前平	培养后平	特异性探针 RT-qPCR			检出率
	板计数结果	板计数结果	检测结果			
	(CFU · mL ⁻¹)	(CFU · mL ⁻¹)	扩增曲线	熔解曲线	判定	
1	不可计数	7.1 × 10 ³	+	+(78 ℃)	+	100.0%
2	115	5.4 × 10 ²	+	+(78 ℃)	+	100.0%
3	14	97	+	+(78 ℃)	+	100.0%
4	1	11	+	+(78 ℃)	+	100.0%

注:“+”表示结果正常,判定为阳性。

预培养液提取的基因组DNA中均可以检测到目标菌。其中,经预培养的最低稀释度的4号样品平板检

测结果为 11 CFU/mL。因在提取 DNA 做 RT-qPCR 时使用的是 10 mL 菌液,故上机检测出来 4 号样品对应的菌数为 10² CFU/mL。因此,新开发的特异性探针对于耐乙酸乳杆菌的最低检出限为 10² CFU,检测精度为 10¹ CFU/mL。

表 6 样品分离鉴定后的测序结果与新开发探针方法检测结果

Table 6 Sequencing results of isolated and identified sample and test results of newly developed method

编号	NBB-B	测序结果	耐乙酸乳杆菌实时荧光定量	一致性判定
			RT-qPCR 快速检测方法	
1	-	<i>L. actotolerance</i>	<i>L. acetotolerans</i>	100%
2	+	<i>L. plantarum/ paraplantarum</i>	-	
3	+	<i>L. brevis</i>	-	
4	-	<i>Pediococcus</i> 与 <i>L. acetotolerans</i>	<i>L. acetotolerans</i>	
5	-	<i>Pediococcus</i> 与 <i>L. acetotolerans</i>	<i>L. acetotolerans</i>	
6	-	<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. acetotolerans</i>	
7	+	<i>L. casei</i>	-	
8	+	<i>L. brevis</i> + <i>L. casei</i>	-	
9	+	<i>Pediococcus</i>	-	
10	+	<i>L. acetotolerans</i> + <i>L. brevis</i>	<i>L. acetotolerans</i>	
11	-	<i>Pediococcus</i>	-	
12	-	<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. acetotolerans</i>	
13	+	<i>L. plantarum/ paraplantarum</i>	-	
14	-	<i>L. acetotolerans</i> + <i>L. brevis</i>	<i>L. acetotolerans</i>	
15	+	<i>L. plantarum/ paraplantarum</i>	-	
16	-	<i>L. collinoides/ paracollinoides</i> 与 <i>L. acetotolerans</i>	<i>L. acetotolerans</i>	
17	+	<i>L. lindneri</i>	-	
18	-	<i>L. backii</i>	-	
19	+	<i>L. acetotolerans</i> + <i>L. brevis</i>	<i>L. acetotolerans</i>	
20	+	<i>L. lindneri</i>	-	

注：“+”表示 NBB-B 液体培养基变色,判定为阳性;“-”表示不变色或未检测到,判定为阴性。

实验结果表明,检测的 20 批生产样品经预培养 2 d 后,只要样品中含有耐乙酸乳杆菌且达到检出限的样品,均可以使用本研究开发的方法进行有效检测。结果表明,本研究开发的耐乙酸乳杆菌特异性探针对于实际样品中的耐乙酸乳杆菌检测具有特异性及准确性,检出效率为 100%。

3 结论

本研究以耐乙酸乳杆菌 3 个种特异性基因为靶目标,成功设计并优化了 3 对种特异性引物用于啤酒腐败菌耐乙酸乳杆菌的检测。建立了基于 SYBR GREEN 实时荧光定量种特异性 PCR 方法及耐乙酸乳杆菌定量检测的标准曲线,实现了对耐乙酸乳杆菌的定性与定量检测。定量检测的最低检测限为 10² CFU/mL,精度为 10 CFU/mL。实际样品经富集培养 2 d 后,可以满足 PCR 检测需求,整个检测时间可控制 3 d 以内,特异性探针对生产上含有耐乙酸乳杆菌样品的检出率为 100%。本研究开发的方法满足了

2.3 实际样品的检测

应用本研究开发的耐乙酸乳杆菌特异性引物检测生产上预培养 2 d 的 20 批样品,并同时进行菌株分析后的样品测序对比结果如表 6 所示。

啤酒生产企业对出厂产品进行质量控制的要求,为啤酒或其他食品中新发现的污染微生物检测提供了借鉴。

参 考 文 献

[1] 王伟,刘雅文,谷凤霞,等. 啤酒腐败微生物与啤酒微生物稳定性研究进展[J]. 微生物学杂志, 2016, 36 (1):80-88.

[2] 方贵权,李惠萍,涂京霞,等. 中国啤酒易感微生物的研究[J]. 啤酒科技, 2011(2):25-28.

[3] DENG Y, LIU J, LI L, et al. Reduction and restoration of culturability of beer-stressed and low-temperature-stressed *Lactobacillus acetotolerans* strain 2011-8. [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 206:96-101.

[4] 张全斌,李艳琴. 啤酒腐败菌分子检测技术的研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9(6):55-57.

[5] COLLINS M D, RODRIGUES U, ASH C, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase se-

- quencing of 16S rRNA [J]. Fems Microbiology Letters, 2010, 77(1):5-12.
- [6] GANGER M T, DIETZ G D, EWING S J. A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments[J]. BMC Bioinformatics, 2017, 18(1):534.
- [7] 陈利娜. PCR 技术用于啤酒中有害乳酸菌的检测和鉴定的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2008.
- [8] SAKAMOTO K, MARGOLLES A, VAN VEEN H W, et al. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(18):5 371-5 375.
- [9] SAMI M, YAMASHITA H, HIRONO T, et al. Hop-resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 84(1):1-6.
- [10] IJIMA K, SUZUKI K, YAMASHITA H. horC confers beer-spoilage ability on hop-sensitive *Lactobacillus brevis* ABBC45cc[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(6):1 282-1 288.
- [11] DENG Y, LIU J, LI H, et al. An improved plate culture procedure for the rapid detection of beer-spoilage lactic acid bacteria[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2014, 120(2):127-132.
- [12] 任河山, 王雪涵, 姚金城, 等. 啤酒有害菌的 PCR 检测和 SYBR Green 实时 PCR 定量[J]. 啤酒科技, 2010(3):11-16.
- [13] 栾春光, 罗娜, 郝建秦, 等. 啤酒腐败菌的分离鉴定和耐乙酸乳杆菌定量检测方法建立[J]. 中外酒业, 2018(23):14-18.
- [14] 李风云. NBB 培养基在啤酒工厂中的应用[J]. 啤酒科技, 2003(12):20-25.
- [15] HIDEHIRO T, HIDETOSHI M, HIROYUKI TSUJI, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus acetotolerans* RIB 9124 (NBRC 13120) isolated from putrefied (hiochi) Japanese sake[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 214:214-215.
- [16] DELCHER A L, BRATKE K A, POWERS E C, et al. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer[J]. Bioinformatics, 2007, 23(6):673-679.
- [17] 姚纲, 陈永红, 胡红焱, 等. 棒状乳杆菌 4 个管家基因 PCR 引物的设计与验证[J]. 中国医学工程, 2015(8):86-87.
- [18] 刘静. 实时荧光 PCR 方法快速检测鉴定啤酒有害菌的研究[J]. 啤酒科技, 2014(2):8-10.
- [19] 杨怡姝, 孙晓娜, 王小利, 等. 实时荧光定量 PCR 技术的操作实践[J]. 实验室研究与探索, 2011(7):28-32.
- [20] 谢鑫, 梁云, 郭立芸. 荧光定量 PCR 检测啤酒酿造过程中的戊糖片球菌[J]. 啤酒科技, 2016(4):19-24.
- [21] 石晓路. 沙门氏菌荧光 PCR 快速检测方法的建立与应用[D]. 武汉:华中农业大学, 2003.
- [22] 王燕梅, 符晓梅, 乔昕, 等. SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测食品中转基因成分方法的灵敏度和特异性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012(1):69-71.

Establishment and application of a species-specific detection system for beer spoilage bacteria-*Lactobacillus acetotolerans*

CAO Weihua^{1,2}, LUO Na³, SUN Yixuan^{1,2}, TU Jingxia³, LIU Jing³,
WANG Deliang², HAO Jianqin², LUAN Chunguang^{2*}, BAO Yihong^{1*}

1 (School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

2 (China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015, China)

3 (Guangzhou Nansha Zhujiang Brewery Co. Ltd, Guangzhou 511462, China)

ABSTRACT A species-specific PCR detection system was established for beer spoilage bacteria *Lactobacillus acetotolerans* CN247. Three sets of species-specific primers were designed and optimized in SYBR GREEN real-time PCR detection system. A standard operating procedure (SOP) for qualitative and quantitative detection of *Lactobacillus acetotolerans* in beer samples was obtained. The results showed that the detection limit for *Lactobacillus acetotolerans* reached 10^2 CFU/mL and the detection accuracy reached 10^1 CFU/mL by using the detection system developed here. The results could be obtained within 48 h after pre-enrichment treatment by using NBB media. This research developed a *Lactobacillus acetotolerans* species-specific detection system which could meet the quality control requirements of the manufacturer in beer industry.

Key words *Lactobacillus acetotolerans*; RT-qPCR; specific primers; qualitative and quantitative detection; standard operating procedure(SOP)