

EMA-PCR法快速检测啤酒中腐败短乳杆菌

马艳琳^{1,2}, 徐振波³, 刘君彦³, 汪东风^{1,*}, 邓 阳^{1,2,*}

(1.中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 2.啤酒生物发酵工程国家重点实验室, 山东 青岛 266100;
3.华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510641)

摘 要: 将叠氮溴乙锭 (ethidium bromide monoazide, EMA) 与聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术相结合, 以酒花耐受基因 *horC* 为靶基因, 用啤酒腐败短乳杆菌基因组DNA作为模板进行扩增。结果发现, 在前处理过程中加入EMA, 当终质量浓度小于20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对活的短乳杆菌中靶基因的扩增没有明显抑制作用; 而当EMA终质量浓度为1.0 $\mu\text{g/mL}$ 时可有效抑制 10^5 CFU/mL短乳杆菌死细胞的扩增。本实验建立的EMA-PCR检测方法的灵敏度为 10^4 活细胞/mL酒液样品。验证实验结果表明, 在13株乳酸菌中, 建立的*horC* 特异性EMA-PCR能有效检测到其中的全部5株啤酒污染菌, 同时可区分这5株菌的活/死细胞混合体系, 降低检测过程中的假阳性。

关键词: 叠氮溴乙锭; 聚合酶链式反应; 啤酒腐败菌; 短乳杆菌; 酒花耐受基因

Development of an Ethidium Bromide Monoazide-Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Detection of the Beer Spoilage Bacterium *Lactobacillus brevis*

MA Yanlin^{1,2}, XU Zhenbo³, LIU Junyan³, WANG Dongfeng^{1,*}, DENG Yang^{1,2,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. State Key Laboratory of Biological Fermentation Engineering of Beer, Qingdao 266100, China;
3. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: In this paper, a rapid method using conventional PCR after ethidium bromide monoazide (EMA) pretreatment is described for the detection of *Lactobacillus brevis* as a beer spoilage bacterium. The PCR amplification was carried out using the hop resistance gene *horC* as target gene and the genomic DNA from *L. brevis* as template. The results suggested that addition of EMA to a final concentration lower than 20 $\mu\text{g/mL}$ for pretreatment did not strongly inhibit the PCR amplification of DNA derived from viable *L. brevis* cells, but it, when added to a final concentration of 1.0 $\mu\text{g/mL}$, completely inhibited the PCR amplification of DNA derived from 10^5 CFU/mL dead *L. brevis* cells. The detection limit (LOD) of EMA-PCR assay was found to be 10^4 CFU/mL beer sample for the *horC* gene. Moreover, the *horC*-specific EMA-PCR assay was applied to detect 13 strains of lactic acid bacteria, representing 100% specificity with no false positive amplification observed for five beer spoilage lactic acid bacteria and enabling discrimination between the live and dead cells. Overall, the use of *horC*-specific EMA-PCR allows for a substantial reduction in the rate of false-positive results for potential beer spoilage *L. brevis*.

Key words: ethidium bromide monoazide (EBM); polymerase chain reaction (PCR); beer spoilage bacteria; *Lactobacillus brevis*; *horC*

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708042

中图分类号: TS261.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 08-0271-06

引文格式:

马艳琳, 徐振波, 刘君彦, 等. EMA-PCR法快速检测啤酒中腐败短乳杆菌[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 271-276.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708042. <http://www.spkx.net.cn>

MA Yanlin, XU Zhenbo, LIU Junyan, et al. Development of an ethidium bromide monoazide-polymerase chain reaction assay for rapid detection of the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis*[J]. Food Science, 2017, 38(8): 271-276. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708042. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-06-23

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (2015M582063; 2014T70810);

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室开放基金资助项目 (SKLF-KF-201415)

作者简介: 马艳琳 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品化学与生物技术. E-mail: mylouc@163.com

*通信作者: 汪东风 (1956—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品化学与营养. E-mail: wangdf@ouc.edu.cn

邓阳 (1986—), 男, 高级工程师, 博士, 研究方向为啤酒酿造与质量控制. E-mail: dengyang719@hotmail.com

由于啤酒中含有乙醇（体积分数0.5%~10%）、高含量CO₂（约0.5%）、相对低的pH值（3.8~4.7），特别是较低质量浓度氧气（小于0.1 mg/L）以及含有具抗菌作用的啤酒花，因此只有少量微生物具有污染啤酒的能力。其中，对啤酒破坏性最强的是一些如乳酸杆菌和片球菌的革兰氏阳性菌^[1-2]。从变质啤酒中分离得到的最常见的污染菌是短乳杆菌（*Lactobacillus brevis*），有大约一半以上的啤酒变质问题都是由短乳杆菌引起的^[1]，该菌也是目前研究较为深入的啤酒腐败菌之一。

目前，大多数啤酒腐败菌检测方法的最主要问题是费时。因此，啤酒制造商在啤酒投放到市场前，急需一种快速且准确的评判方法。为了缩短检测时间，国内外啤酒科技工作者开发出包括聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）在内的多种啤酒腐败菌检测技术。针对如短乳杆菌等的检测，常用的分子检测技术为PCR技术^[3-4]。但常规的PCR技术由于无法区分样品中的死菌与活菌，往往会导致检测结果出现较高的假阳性。前人研究^[5-7]发现，在样品PCR扩增前加入叠氮溴乙锭（ethidium bromide monoazide, EMA）处理，可区分活细胞和死细胞，从而更好地解决这个问题。EMA可作为嵌入染料透过热致死细胞的细胞膜，在曝光条件下共价结合于DNA上。在这种情况下，共价结合染料的DNA不能发生PCR扩增，使得死细胞不能被检测到^[7]。尽管EMA-PCR法在其他领域已经得到广泛的使用，但是其在啤酒腐败菌检测方面的应用还非常少。

一般情况下，作为主要啤酒腐败菌的短乳杆菌能够耐受啤酒中的酒花化合物，从而容易引起啤酒的腐败^[1-2]。通常认为，啤酒腐败短乳杆菌耐受酒花的机制为多因素调控过程，涉及了细胞代谢和形态变化，同时还涉及多药转运机制和酒花外排机制^[2]。目前已被研究的酒花耐受基因为*hitA*^[8]、*hcrA*^[9]和*hcrC*^[10]。其中，在啤酒腐败短乳杆菌中分布最广泛的耐酒花基因为*hcrC*^[4,11]。另外一个被发现的酒花耐受基因是*bsrA*，该基因最近被发现于可污染啤酒的有害片球菌中^[12]。本研究以*hcrC*为靶基因进行EMA-PCR扩增，研究该方法区分啤酒腐败短乳杆菌活和热致死细胞的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

本研究所使用到的菌株包括13株短乳杆菌和5株非短乳杆菌^[13]。其中，乳酸菌是接种于MRS培养基（英国Oxoid公司）在厌氧条件下26℃培养5 d，而非乳酸菌则接种于LB培养基（英国Oxoid公司）中37℃培养24 h。

1.1.2 试剂

EMA Invitrogen中国公司；PCR用*Taq*DNA聚合酶及反应Mix试剂盒 日本宝生物公司；其余化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器与设备

Centrifuge 5840R高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司；Cyte8H流式细胞仪 美国Guava生物技术公司；PTC-100TM PCR仪 美国MJ Research公司；JS-380C全自动数码凝胶成像系统 上海培清科技有限公司；*BacLight*细菌活性试剂盒 美国Molecular Probes公司；细菌基因组DNA试剂盒 天根生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌活细胞和死细胞菌悬液的制备

从MRS或LB平板上挑取细菌单菌落，接种于20 mL相应的MRS或LB液体培养基中，培养至OD_{600 nm}约为0.3后，10 000×g离心5 min收集菌体沉淀，加入无菌生理盐水重悬沉淀制成活细胞菌悬液（细胞密度约为1×10⁵ CFU/mL）。再将需要热致死的细菌培养物置于65℃水浴中加热30 min，随后冷却至室温，即得。活细胞和死细胞定性和定量检测用*BacLight*细菌活性试剂盒完成^[14]。其中，用于判断细胞膜完整性的两种染料SYTO9和PI则根据试剂盒说明书来配制。细胞样品经由0.5 mol/L磷酸钠缓冲液（pH 7.0）配制而成的SYTO9（终浓度为5 μmol/L）和PI（终浓度为30 μmol/L）染液染色，并在黑暗的室温条件下保持20 min。染色后的细菌细胞在波长488 nm处通过Cyte8H流式细胞仪进行分析。

评价啤酒腐败菌污染啤酒能力的方法参考文献[14]。在室温条件下，将各菌株培养物（约10⁵ CFU/mL）接种于瓶装啤酒中（4.5%酒精度（体积分数）、pH 4.8、苦味值9 BU）。瓶内顶空用流速为120 mL/min的CO₂冲洗约3 min，以达到除去O₂的目的。瓶装酒重新压盖，于26℃条件培养30 d，期间定期检查瓶内的菌株生长情况。记录以上18株实验菌株在啤酒上的生长能力，并比较*hcrC*基因的存在与否。

1.2.2 DNA提取以及PCR反应

按照说明书利用细菌基因组DNA试剂盒提取各菌株的基因组DNA。根据Haakensen等^[4]的报道设计相应的引物扩增*hcrC*基因的保守区片段（94 bp），正、反向引物分别为5'-CTTGTTGGAGCAATTATTGG-3'和5'-CGTTGACAAGTGCTACAGG-3'，引物由天根生物技术公司合成。

PCR反应体系：2×*Taq*Mix 7.5 μL，引物各1 μL（终浓度1 μmol/L），DNA模板1 μL，最后加无菌ddH₂O补足至15 μL。PCR反应条件：95℃预变性2 min，94℃

解链50 s, 72 °C延伸50 s, 53 °C退火50 s, 35个循环, 72 °C延伸10 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物(94 bp), 使用纯化试剂盒纯化PCR产物, 用灭菌双蒸水洗脱产物。2%的琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下检测, 并使用美国Spectronics公司的EA-1000系统获得数字图像, 运用NIH图像1.61软件定量DNA条带。

1.2.3 EMA-PCR样品的前处理

用无水乙醇配制100 mg/L的EMA母液, -20 °C避光保存。在样品中各加入所需质量浓度的EMA, 室温避光处理10 min, 然后将样品置于冰上, 用500 W的卤素灯在20 cm的距离处照射10 min使得EMA光解。EMA光解之后, 于10 000×g离心5 min后收集沉淀, 随后进行DNA提取, 并作为模板进行PCR扩增(PCR引物及条件见1.2.2节)。

1.2.4 不抑制短乳杆菌PCR扩增的最大EMA质量浓度的确定

在含有0.5 mL的(10^5 CFU/mL)短乳杆菌菌悬液的离心管中加入一定量的EMA母液(100 mg/L), 使其终质量浓度分别为1、5、10、20、30、50、75 μ g/mL和100 μ g/mL, 再按照1.2.3节的方法进行样品处理和PCR产物检测。

1.2.5 抑制死菌PCR反应的最低EMA质量浓度的确定

在含有0.5 mL的热致死短乳杆菌菌悬液(10^5 CFU/mL)的离心管中分别加入质量浓度为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0 μ g/mL和3.0 μ g/mL的EMA染料, 搅拌并且黑暗室温条件下保存10 min, 确保EMA能够完全穿透热致死细胞的细胞膜。最后, 按照1.2.3节方法将其在卤素灯下光照及后续处理。

1.2.6 EMA的光照时间优化

按照上述方法, 往 10^5 CFU/mL短乳杆菌菌悬液中加入质量浓度为3.0 μ g/mL的EMA进行前处理, 并置于微量离心管中黑暗条件下10 000×g离心10 min。随后将其置于冰上快速冷却, 在卤素灯(20 cm)下分别光照1、5、15 min和20 min。

1.2.7 EMA-PCR检测的灵敏度

为了进一步确定EMA-PCR扩增反应检出的最小活菌数, 首先将短乳杆菌活细胞菌悬液用无菌生理盐水连续稀释10倍, 所得菌液的浓度范围从 $10^4 \sim 10^8$ CFU/mL(PCR扩增反应中取1 μ L菌液), 使用无菌水代替细菌培养物作为阴性对照。将样品分别用质量浓度为3.0 μ g/mL的EMA在黑暗中处理10 min, 然后在卤素灯20 cm的距离处光照10 min。最后将所得细菌细胞进行DNA提取和EMA-PCR扩增分析。

1.2.8 EMA-PCR对活菌/死菌混合物的检测

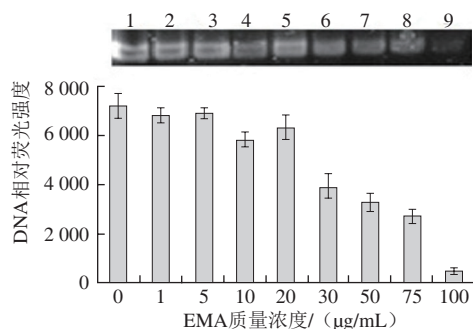
取短乳杆菌的活菌和热致死菌分别按照1:1、1:99、1:999和0:1的配比进行梯度稀释, 对应的热致死细胞比率分别为50%、99%、99.9%和100%, 但各实验组1 mL的菌液中活细胞和死细胞的总数保持在 10^5 个。将以上

活和死菌的混合物分别用质量浓度为3.0 μ g/mL的EMA在黑暗中处理10 min, 然后在卤素灯20 cm的距离处光照10 min。最后将所得细菌细胞进行DNA提取和EMA-PCR扩增分析。

2 结果与分析

2.1 不抑制活细胞DNA扩增的最大EMA质量浓度的确定

当用20 μ g/mL或更低质量浓度的EMA处理短乳杆菌菌悬液时, EMA-PCR反应对目标DNA的扩增无显著抑制(图1)。而当EMA质量浓度高于20 μ g/mL($P < 0.01$)时, 活细胞DNA扩增开始减少。自20 μ g/mL质量浓度开始继续增加EMA的质量浓度时, 活细胞DNA的扩增效果逐渐降低。当EMA质量浓度为100 μ g/mL(图1), DNA的扩增完全受到抑制。

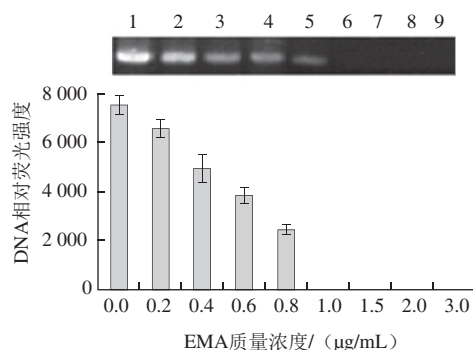


EMA-PCR扩增的凝胶电泳图, 泳道1~9代表EMA质量浓度为0、1、5、10、20、30、50、75 μ g/mL和100 μ g/mL。

图1 不抑制活细胞DNA扩增的最大EMA质量浓度的确定

Fig. 1 Determination of the maximum concentration of EMA for not inhibiting PCR amplification of DNA from viable *L. brevis*

2.2 抑制热致死细胞DNA扩增的EMA最小质量浓度的确定



EMA-PCR扩增的凝胶电泳图, 泳道1~9代表EMA质量浓度为0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0 μ g/mL和3.0 μ g/mL。

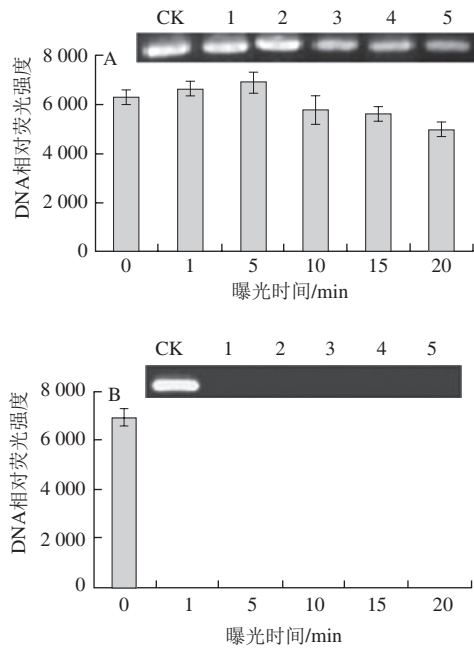
图2 抑制热致死细胞DNA扩增的EMA的最小质量浓度的确定

Fig. 2 Determination of the minimum concentration of EMA for inhibiting PCR amplification of DNA from heat-killed cells of *L. brevis*

当用1.0 μg/mL或更高质量浓度EMA处理热致死短乳杆菌细胞时，DNA的扩增完全受到抑制（图2）。相反地，当EMA质量浓度为0.2~0.8 μg/mL时，热致死细胞的靶向DNA可被扩增。由此可知，抑制热致死细胞DNA扩增的EMA最低质量浓度为1.0 μg/mL，远低于抑制活细胞的DNA扩增质量浓度（大于20 μg/mL）。为了保证抑制效果，在后续实验中选取3.0 μg/mL作为EMA的使用质量浓度。

2.3 活菌和热致死菌的EMA最适光照时间的确定

在1×10⁵ CFU/mL的短乳杆菌菌悬液（活细胞）中加入质量浓度3.0 μg/mL的EMA进行处理，分别在卤素灯下照射1、5、10、15 min和20 min。结果发现，细胞DNA的PCR扩增并未受到影响（图3A）（*P*>0.10）。而热致死细胞在EMA处理1 min甚至更长时间后DNA的扩增完全受到抑制（图3B）。因此，对于活细胞DNA的选择性扩增的光照时间应当选择1 min或者更长时间。后续实验选择10 min作为光照时间，以确保EMA能够结合于DNA进而引起细胞裂解，并完全抑制热致死细胞中DNA的扩增。



A.活细胞的PCR扩增结果；B.死细胞的PCR扩增结果。EMA-PCR扩增的凝胶电泳图，泳道CK是对照（无EMA处理），泳道1~5分别为1、5、10、15 min和20 min的光照时间条件下PCR扩增电泳图。

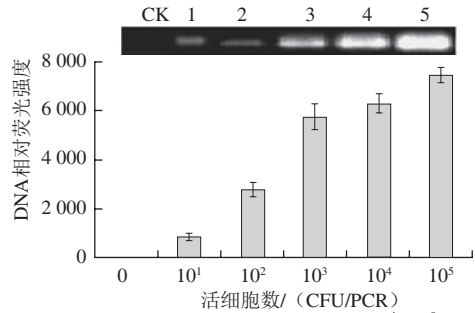
图3 活细胞和热致死细胞EMA光解最佳时间的确定

Fig. 3 Determination of optimal light exposure time for complete photolysis of EMA in suspensions of live and heat-killed *L. brevis* CTT

2.4 EMA-PCR扩增灵敏度的测定结果

针对*horC*基因的EMA-PCR扩增的灵敏度是通过测定所需最小短乳杆菌活菌数来确定的。从图4可知，建立的EMA-PCR方法对短乳杆菌的检测限为10 CFU/PCR

体系，即10⁴ CFU/mL样品，因为每个PCR反应中只需要1 μL样品）。



EMA-PCR扩增的凝胶电泳图，泳道1~5分别代表10¹~10⁵ CFU/mL的菌悬液。泳道CK是作为对照组的无菌水。

图4 短乳杆菌的*horC*基因EMA-PCR扩增灵敏度的确定

Fig. 4 Sensitivity of EMA-PCR assay targeting *horC* for detection of *L. brevis*

2.5 不同比例活和死细胞混合样品的EMA-PCR扩增差异

表1 本研究使用的菌株及其*horC*基因检测结果

Table 1 Results of detection of *horC* in the bacterial strains used and their ability to grow in beer

菌株	来源	不同活菌和热致死菌配比下 <i>horC</i> 基因的检出情况				在啤酒中的引起啤酒 生长 浑浊的 情况 时间/d	
		1:1	1:99	1:999	0:1	情况	时间/d
乳酸菌	<i>L. brevis</i> CTT	啤酒厂	+	+	+	+	3
	<i>L. brevis</i> DY	啤酒厂	+	+	+	+	4
	<i>L. brevis</i> WCK	啤酒厂	+	+	+	+	2
	<i>L. brevis</i> CN086	啤酒厂	+	+	+	+	2
	<i>L. brevis</i> 2013-17	啤酒厂	+	+	+	+	3
	<i>L. brevis</i> 86719	啤酒厂	+	+	+	+	2
	<i>L. brevis</i> CN3	啤酒厂	+	+	+	+	4
	<i>L. brevis</i> C598	啤酒厂	+	+	+	+	2
	<i>L. brevis</i> C663	腌酸菜	-	-	-	-	N
	<i>L. brevis</i> CGMCC 1.2028	腊肉	-	-	-	-	N
非乳酸菌	<i>L. brevis</i> CGMCC 1.3847	牛奶	-	-	-	-	N
	<i>L. brevis</i> CGMCC 1.1945	红酒	-	-	-	-	N
	<i>L. brevis</i> CGMCC 1.2561	红酒	-	-	-	-	N
	<i>Bacillus subtilis</i> CGMCC 1.3376	土壤	-	-	-	-	N
	<i>Staphylococcus aureus</i> CGMCC 1.1809	挤奶机	-	-	-	-	N
	<i>Enterococcus gallinarum</i> CGMCC 1.9125	未知	-	-	-	-	N
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 CGMCC 1.2386	人类粪便	-	-	-	-	N
	<i>Salmonella enterica</i> CGMCC 1.10603	鸡	-	-	-	-	N

注：+，可检出或者可在啤酒中生长；-，不可检出或者不可在啤酒中生长；N，不引起啤酒浑浊。

表1中列出了啤酒腐败菌短乳杆菌和非腐败菌的活细胞和热致死细胞混合样品的*horC*特异性PCR扩增的差异。不同比例热致死细胞和活性细胞混合物中总细胞均控制在1×10⁵个/mL，如预期所示，死细胞中靶向DNA扩增抑制有效的EMA质量浓度为3.0 μg/mL。如表1所示，共有8个菌株的*horC*基因检测结果为阳性。即使在热致

死细胞占总细胞数的99.9%时, DNA扩增条带的荧光也未受显著影响(此时相对荧光强度约为3 900, 而死细胞比率为50%时相对荧光强度为5 500)。这一现象与啤酒生长实验结果相一致。在检测这8株啤酒腐败短乳杆菌*horC*基因时, EMA-PCR显示出很高的特异性(表1)。

3 讨论与结论

*horC*基因可以和三磷酸腺苷结合, 转运导出细胞中的反式异萜草酮, 防止其在细胞内空间的积累, 从而使细菌细胞可耐受啤酒花^[12,15-16]。根据前人的研究^[12,17-18]结果表明, 通过PCR扩增*horC*基因的保守序列用于啤酒中腐败乳酸菌的快速检测, 其结果与常规平板培养法相比符合率可达到近90%。另外, 所有对啤酒有害的乳酸菌几乎无一例外地都可通过基因的水平转移而获得*horC*和(或)*horA*基因, 使啤酒花抗性基因具有跨种属的特性, 所以可以用*horC*基因引物对大多数啤酒腐败乳酸菌进行PCR检测^[19-21]。本研究发现, 使用到的全部啤酒腐败乳酸菌菌株的*horC*基因PCR扩增反应均为阳性, 由此可以更加确定*horC*基因具有定性啤酒腐败乳酸菌的作用。因此, 可以把*horC*作为预测目标啤酒腐败能力的有效靶基因^[2,17], 有必要进一步的研究*horC*特异性EMA-PCR扩增方法对其他啤酒腐败菌适用性, 使其更好地应用于检测啤酒腐败微生物。

传统的PCR扩增不能区分DNA是来自活细胞还是死细胞, 这个缺点容易导致PCR扩增结果的假阳性, 进而高估了样品中的可污染菌数, 导致检测结果不准确。EMA染料能够透过致死细胞的细胞壁进入细胞, 并且与死细胞的DNA相结合, 在光照条件下形成DNA-EMA共价复合物, 从而死菌DNA无法被PCR扩增^[7,22-24]。虽然有研究表明, EMA能穿透部分活的食源性致病菌细胞膜, 如大肠杆菌O157、金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌等, 抑制了活菌的DNA扩增, 容易造成检测误差, 而另一种核酸染料叠氮溴丙啶(propidium monoazide, PMA)则无法穿透所有活菌细胞膜, 似乎更适合充当前处理染料^[25-29]。但也有文献指出, 对于相同浓度的菌悬液, 相比于EMA, PMA无法保证与热致死菌DNA分子的有效交联, 对于死菌扩增的抑制效果不理想^[30]。

总之, 在对啤酒样品进行PCR扩增检测前, 应用EMA进行前处理可有效减少死细胞的假阳性, 该方法在工厂实际应用上具有很大的潜力。应用基于*horC*基因的PCR特异性扩增方法可有效检测具有污染啤酒能力的乳酸菌, 为啤酒厂在产品质量控制方面做出快速和准确的判断提供依据。

参考文献:

- [1] SAKAMOTO K, KONINGS W N. Beer spoilage bacteria and hop resistance[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 89(2/3): 105-124. DOI:10.1016/S0168-1605(03)00153-3.
- [2] SUZUKI K, IJIMA K, SAKAMOTO K, et al. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2006, 112(2): 173-191. DOI:10.1002/j.2050-0416.2006.tb00247.x.
- [3] FUJI T, NAKASHIMA K, HAYASHI N. Random amplified polymorphic DNA-PCR based cloning of markers to identify the beer-spoilage strains of *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus collinodii* and *Lactobacillus coryniformis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98(5): 1209-1220. DOI:10.1111/j.13652672.2005.02558.x.
- [4] HAAKENSEN M, SCHUBERT A, ZIOLA B. Multiplex PCR for putative *Lactobacillus* and *Pediococcus* beer spoilage genes and ability of gene presence to predict growth in beer[J]. Journal of the American Society Brewing Chemists, 2008, 66: 63-70.
- [5] NOCKER A, SOSSA K E, CAMPER A K. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(2): 252-260. DOI:10.1016/j.mimet.2007.04.014.
- [6] RUDI K, MOEN B, DRØMTORP S M, et al. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 1018-1024. DOI:10.1128/AEM.71.2.1018-1024.2005.
- [7] SEINIGE D, KRISCHEK C, KLEIN G, et al. Comparative analysis and limitations of ethidium monoazide and propidium monoazide treatments for the differentiation of viable and nonviable *Campylobacter* cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(7): 2186-2192. DOI:10.1128/AEM.03962-13.
- [8] HAYASHI N, ITO M, HORIIKE S, et al. Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus brevis* strains capable of growing in beer[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(5): 596-603. DOI:10.1007/s002530100600.
- [9] SAMI M, YAMASHITA H, KADOKURA H, et al. A new and rapid method for determination of beer-spoilage ability of lactobacilli[J]. Journal of the American Society Brewing Chemists, 1997, 55: 137-140.
- [10] SUZUKI K, OZAKI K, YAMASHITA H. Comparative analysis of conserved genetic markers and adjacent DNA regions identified in beer-spoilage lactic acid bacteria[J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 39(3): 240-245. DOI:10.1111/j.1472-765X.2004.01572.x.
- [11] IJIMA K, SUZUKI K, ASANO S, et al. Isolation and identification of potential beer spoilage *Pediococcus inopinatus* and beer spoilage *Lactobacillus backi* strains carrying the *horA* and *horC* gene clusters[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2007, 113(1): 96-101. DOI:10.1002/j.2050-0416.2007.tb00262.x.
- [12] HAAKENSEN M, SCHUBERT A, ZIOLA B. Broth and agar hop-gradient plates used to evaluate the beer-spoilage potential of *Lactobacillus* and *Pediococcus* isolates[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 130(1): 56-60. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.001.
- [13] 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. DOI:10.1002/jib.121.

- [14] DENG Y, LIU J, LI L, et al. Reduction and restoration of culturability of beer-stressed and low-temperature-stressed *Lactobacillus acetotolerans* strains 2011-8[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 206: 96-101. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.046.
- [15] 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): 5371-5375. DOI:10.1128/JB.183.18.5371-5375.2001.
- [16] BEHR J, VOGEL R F. Mechanisms of hop inhibition include the transmembrane redox reaction[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(1): 142-149. DOI:10.1128/AEM.01693-09.
- [17] MENZ G, ANDRIGHETTO C, LOMBARDI A, et al. Isolation, identification, and characterization of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2010, 116(1): 14-22.
- [18] SUZUKI K, IJIMA K, OZAKI K, et al. Isolation of a hop-sensitive variant of *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic markers for beer spoilage ability of lactic acid bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5089-5097. DOI:10.1128/AEM.71.9.5089-5097.2005.
- [19] SUZUKI K. 125th anniversary review: microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(2): 131-155.
- [20] BAMFORTH C W. 125th anniversary review: the non-biological instability of beer[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(4): 488-497.
- [21] SUZUKI K, ASANO S, IJIMA K, et al. Sake and beer spoilage lactic acid bacteria: a review[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2008, 114(3): 209-223.
- [22] SUZUKI K, SAMI M, IJIMA K, et al. Characterization of *horA* and its flanking regions of *Pediococcus damnosus* ABBC478 and development of more specific and sensitive *horA* PCR method[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 42(4): 392-399. DOI:10.1111/j.1472-765X.2006.01860.x.
- [23] 颜成英, 汤晓艳, 王敏, 等. 肠炎沙门氏菌EMA-PCR检测方法的建立[J]. 食品科学, 2014, 35(6): 90-93. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201406018.
- [24] LEE J L, LEVIN R E. Use of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67: 456-462. DOI:10.1016/j.mimet.2006.04.019.
- [25] NOCKER A, CHEUNG C, 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.
- [26] NOCKER A, CAMPER A K. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by used of ethidium monoazide[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1997-2004.
- [27] PAN Y, BREIDT F J R. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(24): 8028-8031.
- [28] JOSEFSEN M H, LÖFSTRÖM C, HANSEN T B, et al. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(15): 5097-5104.
- [29] CAWTHORN D M, WITTHUHN R C. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(4): 1178-1185.
- [30] 庞贝妮, 顾文佳, 徐琼, 等. EMA/PMA-PCR技术检测活肠炎沙门氏菌方法的对比研究[J]. 食品科技, 2014, 39(6): 298-302. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2014.06.064.