

果汁中微生物检测技术的研究进展

王梅*, 袁平, 任炼, 唐学林

(重庆市永川食品药品检验所, 重庆 402160)

摘要: 微生物是影响果汁质量安全的重要因素, 目前果汁微生物检测的方法主要是传统的培养基培养法, 且检测的微生物种类较少, 没有覆盖到影响果汁品质的多数微生物。随着果汁工业的迅速发展, 消费者对食品安全需求的提高, 急需寻求多种快速、简便方法相结合检测果汁中的微生物。本文介绍了当前微生物的检测方法, 包括形态学方法、生理生化试剂盒、免疫学技术、仪器分析技术和分子生物学技术等, 分析了各方法的优缺点和适用性, 为果汁中微生物的检测分析提供参考。

关键词: 果汁; 微生物; 质量安全; 检测方法

Research progress of microbial detection technology in fruit juice

WANG Mei*, YUAN Ping, REN Lian, TANG Xue-Lin

(Chongqing Yongchuan Institute for Food and Drug Control, Chongqing 402160, China)

ABSTRACT: Microorganism is an important factor to influence the quality and safety of fruit juice. The mainly microbial detection method of fruit juice is the traditional media culture method, but the microbial species which can be detected by this method are less, and it is no coverage the majority of microorganisms affecting the quality of fruit juice. With the rapid development of fruit juice industry, the demand of consumer about food safety is increasing, so it is urgent to seek a variety of fast, simple and convenient detection method to detect the microorganism in fruit juice. In this paper, the methods of microbial detection, morphological methods, physiological and biochemical reagents, immunological techniques, instrumental analysis and molecular biological techniques were introduced, the advantages and disadvantages of each method were analyzed to provide reference for the detection and analysis of microorganisms in fruit juice.

KEY WORDS: fruit juice; microorganism; quality safety; detection method

1 引言

果汁为含糖量较高的酸性饮料, 经过巴氏灭菌、浓缩和冷却后可以杀死大多数微生物。但极少数霉菌、酵母菌和耐酸性细菌可以在高渗透压、低 pH 和低温条件下产生芽孢或孢子。当条件适宜时又开始萌发和生长, 造成果汁的腐败变质, 影响果汁品质, 如果存在致病性微生物, 将极大地危害人体健康^[1]。

目前食品微生物的检测方法有普通培养法(简称国标方法)、酶联免疫法、傅立叶红外光谱检测、电子鼻技术、分子生物学等方法^[2], 本文综合分析了这些技术的最新进展, 拟为果汁中微生物的检测分析提供参考。

2 形态学方法

传统检测法需通过特异性的培养基对果汁中的微生物进行分离、纯化和富集培养, 利用微生物形态特征、血

*通讯作者: 王梅, 工程师, 主要研究方向为食品、化妆品检测。E-mail: ximeiga@163.com

*Corresponding author: WANG Mei, Engineer, Chongqing Yongchuan Institute for Food and Drug Control, Chongqing 402160, China. E-mail: ximeiga@163.com

清学反应、生理生化试验等特性, 最终确定菌株的种属, 并进一步分析果汁中该微生物的数量, 评估其对果汁品质安全的影响程度^[3-5]。该方法不仅繁琐、费时, 而且重现性差, 不适用于有限货架期食品中微生物的检测^[6,7]。此外, 人们难以配制一种接近果汁中微生物自然生境下生长的培养基, 难以获得纯培养物, 从而给人们客观认识果汁中微生物存在的状况造成障碍。果汁作为一种大众饮料, 其安全性一直关乎消费者的健康, 所以需要一种更加快速的检测方法对果汁中可能存在的致病菌及腐败性微生物进行监测评估, 及时地将检测结果反馈给生产厂家, 为其生产控制和清洁卫生监管提供足够的信息。

3 生化反应诊断试剂盒

目前已开发出多种用于快速鉴定微生物的生化试剂盒, 且具有快速、方便、可靠性高等特点。其中, 梅里埃生化鉴定试剂盒(analytic products INC, API)是全世界范围内公认的一套鉴定系统, 该系统由法国生物梅里埃公司生产, 基于微生物理化特性进行数值分类鉴定, 主要由 API 试剂条、检索工具和添加试剂等部分组成。目前数据库中已记录生理生化特征的微生物超过 600 种, 有 1000 种生化反应, 具有 15 个鉴定系列^[8]。Martiny 等^[9]发现, API 系统能鉴定 94.4% 的弯曲菌属(*Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni*), 但是仅能鉴定 52.3% 的 *Epsilobacteria coli*。苹果汁中的鉴定结果也显示 API 系统鉴定模式菌种的准确率高达 98.7%^[10]。但是, 对于没有在数据库里的微生物则无法进行鉴定, 需要借助其他手段进行鉴定^[7,11]。

4 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)是一种抗体与酶相互作用的免疫学检测技术。当已知抗体或抗原吸附在固相载体表面时, 加入酶标记的抗原或抗体进行抗原抗体反应形成酶-抗原-抗体复合物, 抗原抗体复合物通过洗涤的方法与其他物质分开, 加入酶反应的底物显色后, 根据底物的颜色深浅度进行定量或定性分析^[10]。

ELISA 由于具有灵敏度高、准确性高、快速和方便等特点, 已经被广泛运用于检测食品中的沙门氏菌、大肠杆菌等病原微生物^[13,14]。Wang 等^[15]开发出检测脂环酸芽孢杆菌的特异多克隆抗体, 通过优化一系列的实验参数, 建立起用 ELISA 检测苹果汁中酸土脂芽孢杆菌的方法, 6~7 h 即可出结果, 且检测下限达到 10^5 CFU/mL。与传统方法相比, 此方法更加准确、快速、高效和灵敏。ELISA 与免疫磁性分离(immunomagnetic separation, IMS)结合(IMS-ELISA)对苹果汁中的微生物进行检测后发现, 其能明显地鉴定果汁中的 20 种脂环酸芽孢杆菌和 18 种非脂环酸芽孢杆菌菌株, 检测下限为 10^3 CFU/mL, 最快能在 3 h

检测出疑似阳性样品。与常规的培养方法相比, IMS-ELISA 检测 102 种自然条件下被污染果汁的灵敏度、特异性和准确率分别为 91.3%、96.02% 和 95.09%^[7]。因此, IMS-ELISA 能显著地提高对脂环酸芽孢杆菌的检测。

ELISA 具有灵敏度高、结果可靠性高、选择性好等优点, 不需昂贵的精密仪器, 即使没有任何科学研究背景的人员都可以操作。但不易区分相似度较高的物质, 难以同时检测多种成分、酶制剂选择范围窄等问题有待解决。但与一些新兴技术结合能有效地改进 ELISA 的不足之处^[16,17]。

5 仪器分析技术

5.1 傅立叶红外光谱检测(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)

FT-IR 的光谱吸收范围($4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$)可以在物种水平上鉴定出微生物细胞。细菌的光谱特征反映细菌的细胞壁和细胞质所有生化构造, 包括了磷脂双方分子、蛋白质、多糖、核酸等。因此可以根据 FT-IR 的光谱特征为每种微生物建立一个特有的“指纹图谱”^[18]。

FT-IR 是一种快速、简便、准确的鉴定微生物的方法, 其准确率达 97.5%^[19], 检测结果与传统检测方法一致性较好, 样品前期准备简单、快速, 已被广泛的应用于微生物的研究。Chang 等^[20]运用 FT-IR, 成功区分出苹果汁中形态特征很相似的嗜热耐酸菌的不同菌株, 并根据该菌细胞膜组成的细微差别建立了 FT-IR 特征光谱图谱。同样, 根据核酸、蛋白质、磷脂质、肽聚糖等细胞成分和来源于细菌脂多糖的特征光谱, 可以将果汁中的脂环酸芽孢杆菌和大肠杆菌鉴定出来^[21]。最近有研究将 16S rDNA 测序技术与 FT-IR 光谱分析相结合, 可以更快、更准确地区分和鉴定细菌的种类^[23]。

尽管 FT-IR 是一种样品需要量少、快速和相对简单的检测技术, 但 FT-IR 光谱范围的重现性依赖于严格的样品制备方法, 需要进一步优化培养条件和光谱采集参数等条件, 从而保证光谱数据采集具有较高的重复性^[24]。除此之外有必要建立食品微生物的数据库。

5.2 电子鼻技术

电子鼻是模拟生物嗅觉器官来检测气味的一套系统, 主要由气敏传感器阵列、信号预处理和模式识别 3 部分组成。通过检测样品中的挥发性成分, 可以进行不同样品的比对分析, 同时也可以对未知样品进行定量和定性分析, 快速、方便和高度特异性是其主要特点。因此, 电子鼻系统已应用于香气分析、食品质量评价、品种分类和微生物检测等^[25-28]。Gobbi 等^[26]发现, 接种脂环酸芽孢杆菌的桃、橙子和苹果等果汁在 24 h 时, 可以用电子鼻检测得到, 细菌的浓度检测下限小于 10^2 CFU/mL, 并且可以将细菌污染物鉴定到属。在不同的温度和压力处理条件下, 电子鼻能

够检测橙汁和苹果汁中的微生物含量变化,与香气的变化有相关性^[29]。同时,与传统的和常用的分析技术相比,其不仅具有极高的可靠性,还可以对腐败微生物和食品质量控制进行早期监测,并作出快速响应^[30]。Wang等^[31]研究认为,在加入鲁氏酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)的果汁中,最快可以在12 h时检测出酵母菌,并将酵母菌区分开来。

目前,电子鼻虽然能够准确地鉴定出已知的少数菌种,但用于检测果汁中的微生物还处于试验阶段。鉴于此技术易受成分复杂的物质干扰,仍需继续改进传感器、减少干扰和抵消漂移因素等诸多技术难点才能最终使之服务于产业^[32]。此方法的另外一个劣势是仪器昂贵,且需要专业人员才能很好操作。

5.3 分子生物学技术

5.3.1 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测

(1)常规 PCR 检测

PCR是利用特异引物在体外对特定DNA序列进行快速扩增的检测技术。当知道待检果汁中的微生物的某一特定基因片段时,即可利用特异性的引物对样品中微量的目标DNA进行PCR扩增,增加靶DNA数量,使其达到足够的检测量,通过电泳检测扩增出的特定片段,即可确定感染的微生物。

目前DNA序列已被广泛运用于鉴定微生物,“DNA barcoding-like”是其中非常可靠的一种方法^[33]。由于16S rDNA是广泛地存在细菌中的一种“DNA barcoding-like”,且其不同物种间表现出丰富的多样性^[34],被作为一个鉴定微生物的通用标记基因。Gouws等^[35]对嗜酸耐热菌的16S rDNA进行PCR扩增发现,在柠檬汁的生产过程及其最终的果汁中均检测出嗜酸耐热菌的存在,由此证明低pH、巴氏杀菌及其无菌包装并不能有效地抑制嗜酸耐热菌的生长。Maldonado等^[36]通过橙汁中酵母菌的增菌培养,简便、快速地提取DNA并进行特异性PCR反应,使样品中酵母菌的最低检测量达到 10^3 CFU/mL。常玉华等^[37]通过优化PCR反应条件,成功地研制出快速检测嗜酸耐热菌的试剂盒,并对该试剂盒的可信度、重复性和有效期进行了评价,证明这种方法的实用性。

通过PCR技术分析微生物的种群特征,能够迅速、准确地进行环境样品中微生物的分类、鉴定和种群动态分析,但PCR检测技术需要在严格的实验条件下进行,环境引起的污染问题也会给研究造成一定的误判,如非特异性的扩增,造成假阳性问题抑制PCR反应^[38],无法区分活细胞和死细胞,PCR只能用于定性分析,而不能进行定量分析。

(2)实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术是在传统PCR的基础上引入荧光标记探针,

从根本上解决了PCR反应中非特异性扩增的难题^[39]。荧光信号的强弱同扩增产物的量成正比,从而准确定量^[38]。qRT-PCR可检出1个拷贝的目的基因,是目前较为灵敏的分子定量检测技术,对难培养的微生物或含量很低的微生物的检测具有很高的灵敏度和准确性。同时,RT-PCR与产物分析软件结合使用可以对亲缘关系很近的种类进行区分,然而培养法和电泳检测难于达到这种精度^[40]。

Casey等^[40]在对5.8S rDNA亚单位的溶解温度最高点分析的基础上,利用qRT-PCR方法区分常见的破坏性酵母菌,结果表明qRT-PCR方法可以对人为感染的苹果饮料进行快速的定性和定量检测。Connor等^[41]应用qRT-PCR方法能够快速和特异性地检测出脂环酸芽孢杆菌及其一些与它亲缘关系较近的嗜酸菌,并且可以检测出细胞数少于100个的脂环酸芽孢杆菌。

qRT-PCR是一种更灵敏、快速、准确的检测技术,但是依然无法区分死细胞与活细胞,而导致其计算结果偏高,但该问题可以在PCR反应前先对样品进行预浓缩以克服。

5.3.2 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)

RFLP是通过PCR选择性地扩增整个基因组DNA的内切酶酶切片段,在高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离后,表现出限制性片段长度的差异^[42]。RFLP检测的DNA片段分布于生物全基因组,可用于各种大小不同的基因组的指纹分析,为研究物种间的亲缘关系尤其是鉴定原核生物属间,甚至株系间提供了一个有效的手段。其具有一定的灵活性,可通过特异性PCR引物的设计和内切酶组合来优化RFLP图谱中限制性片段的适宜数目。

Las Heras-Vazquez等^[43]应用5.8S-ITS扩增片段的RFLP分析法对存在于橙汁和果汁中的微生物进行了检测。将自发发酵的橙汁和果汁中分离得到的100株酵母菌的单菌落,分别进行PCR反应,并将PCR产物进行酶切、电泳,根据酶切结果分类,得到9种酵母菌类型。根据形态学、生理学和生化特点对这些酵母菌进行鉴定核对,其结果均与RFLP具有很好的一致性。Chen等^[44]将PCR-RFLP分析鉴定与传统检测相结合,鉴定苹果汁生产过程中分离得到的45种嗜酸耐热的细菌,结果发现7个新种可能与苹果汁腐败变质有关。Annelies等^[45]通过末端限制性片段长度性分析(T-RFLP)和常规化学检测法的研究表明纯培养的嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)可以引起浓缩果汁的降解,使之品质下降,此外种属特异性的PCR可以检测出降解或未降解的浓缩果汁中的目标微生物,其灵敏度和准确度也大大优于常规的检测方法。

RFLP产生的带型较多,很难直接分析结果,还需依赖于先进的计算机程序才能完成。但由于其能快速、简便、高分辨率、可靠的鉴定大量菌株在种、属水平上遗传关系的优点,RFLP技术将会得到不断的发展和更广泛的应用^[46]。

5.3.3 随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)

RAPD 是用单一的一段随机核苷酸序列作引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 产物经过聚丙烯酰胺或琼脂糖电泳分离, 再经染色或放射性自显影来检测扩增产物 DNA 片段的多态性, DNA 片段的多态性反映出基因组相应区域的物种多样性。亲缘关系相近的物种其基因组 DNA 变异带型相似, 反之差异较大, 因此可以进行物种的种属分类、品系鉴定和个体差异的研究。还可以用多个随机引物对整个基因组 DNA 进行多态性检测、构建基因文库及基因图谱分析。

由于 RAPD 在每次反应中使用的引物长度一般是 10 个核苷酸的单一引物, 所需要的 DNA 提取物少, 可以在 10 h 内通过微生物独特的指纹图谱鉴定微生物, 将被检测的样品图谱与标准图谱进行对照就可得到鉴定结果。RAPD 的出现即以其简便、快速和多态性检出率高而引起了科学工作者的极大兴趣^[47]。

近年来, Pina 等^[48]用 RAPD 鉴定酵母菌时, 以 GeneBank 数据库中的标准酵母菌菌株为对照, 只用 1 对引物即可鉴定酵母菌。对 16 种 58 株来自含二氧化碳的橙汁中的酵母菌菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 分析其 DNA 指纹图谱, 并计算辛普森多样性指数(simpson's index of discrimination, SID)。结果表明, GeneBank 数据库中的标准菌株与酵母菌的平均 SID 为 83%, 而 16 种酵母菌的菌种间的平均 SID 为 69%, 因此可以用作酵母菌的鉴别。然而, 酵母菌属内不同种内及同种内不同菌株间的平均 SID 差异并不显著, 难以作为鉴定参考指标。但是通过比较 RAPD 图谱, 发现选择合适的引物扩增后, 各物种间的扩增图谱表现出一定的差异, 有其扩增的特殊谱带, 所以有可能作为区分不同种的指标。Yamazaki 等^[49]应用 RAPD 成功地筛选出 3 个足以区分酸土脂环酸芽孢杆菌和其他相关菌的引物, 其检测结果与常规检测法具有很好的一致性。

由于 RAPD 敏感性强, 在操作中必须准确配制反应体系和加样, 才能保证结果的可靠性。在实验中发现多种因素均可影响 RAPD 的扩增结果, 其中以 $MgCl_2$ 浓度和退火温度影响最大, $MgCl_2$ 浓度高则特异性扩增明显, 退火温度高则扩增条带少, 扩增效率降低^[50]。

6 结论与展望

在使用传统方法对果汁中的腐败性微生物进行鉴定时, 由于部分菌缺乏相应的生理生化试验对照模式, 而且许多菌经过 5 代以上转接后, 就可能与前几代的形态完全不同, 给鉴定工作带来困难。若单从形态学角度鉴定, 则需要事先对大量标准菌进行了解并一一比较对照, 不仅工作量大, 而且鉴定结果的可靠性难以保证。应用 FT-IR 检测和分子生物学方法鉴定未知菌则可克服上述缺点。在短时间内极大地提高了菌株鉴定的特异性、重复性和准确性。

特别是 PCR 及其相关技术的应用为研究果汁加工过程中的微生物种群结构提供了一种全新的思路, 给果汁中微生物的检测带来了极大的方便。此外, 电子鼻技术的出现, 使得实时监控果汁中微生物种群变化, 提早预警成为可能。随着科学技术的发展以及科研工作者的不懈努力, 这些问题都会得到解决。

参考文献

- [1] Tournas VH, Heeres J, Burgess L. Moulds and yeast in fruit salads and fruit juices [J]. Food Microbiol, 2006, 23(7): 684-688.
- [2] 梁华丽, 方毅. 简析食品微生物检测技术进展[J]. 食品工程, 2015, (1): 22-24.
Liang HL, Fang Y. Discussion on development of detection method for food microorganism [J]. Food Eng, 2015, (1): 22-24.
- [3] Simbahan J, Drijber R, Blum P. *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov. a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California, USA [J]. Int J Syst Evol Micr, 2004, 54(Pt 5): 1703-1707.
- [4] Steyn CE, Cameron M, Witthuhn RC. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment-A review [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 147(1): 1-11.
- [5] Henczka M, Djas M, Filipek K. Optimisation of a direct plating method for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores [J]. J Microbiol Methods, 2013, 92(1): 1-8.
- [6] Javier F, Heras-Vazquez L, Mingorance-Cazorla L, et al. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers [J]. FEMS Yeast Res, 2003, 3: 3-9
- [7] Wang Z, Yue T, Yuan Y, et al. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Alicyclobacillus*, spp. in apple juice [J]. Int J Food Microbiol, 2013, 166(1): 28-33.
- [8] 段永翔. API 鉴定系统及其在细菌学检验中的应用[J]. 现代预防医学, 2004, 31(5): 729-731.
Duan YX. Application of API system in bacteriological detection [J]. Mod Prev Med, 2004, 31(5):729-731.
- [9] Martiny D, Dediste A, Debruyne L, et al. Accuracy of the API Campy system, the Vitek2 Neisseria-Haemophilus card and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Campylobacter* and related organisms [J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(7): 1001-1006.
- [10] 王丽敏, 李军, 胡小松. 苹果原料中酵母菌的分离鉴定[J]. 中国农业大学学报, 2004, (4): 14-17.
Wang LM, Li J, Hu XS. Isolation and identification of yeasts from apple [J]. J China Agric Univ, 2004, (4): 14-17.
- [11] 杨燕兰, 梁嘉雯. 浅谈微生物实验室中细菌的鉴定方法建立及探索[J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7(9): 116-118.
Yang YL, Liang JW. Establishment and exploration of identification of bacteria in microbiology laboratories [J]. China Health Stand Manage, 2016, 7(9): 116-118.
- [12] Asensio L, González I, García T, et al. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Food Control, 2008, 19(1): 1-8.
- [13] Leon-Velarde CG, Zosherafatein L, Odumeru JA. Application of an

- automated immunomagnetic separation-enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* from poultry environmental swabs [J]. *J Microbiol Methods*, 2009, 79(1): 13-17.
- [14] 齐颖颖, 吴萌, 王怡雯, 等. 单增李斯特菌单克隆抗体的研制及特性分析[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(2): 151-155.
- Qi YY, Wu M, Wang YW, *et al.* Preparation and characterization of monoclonal antibodies against *Listeria monocytogenes* [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2016, 35(2): 151-155.
- [15] Wang Z, Yue T, Yuan Y, *et al.* Development of polyclonal antibody-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Alicyclobacillus* strains in apple juice [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(11): M643-M649.
- [16] Mansfield LP, Forsythe S. The detection of *Salmonella serovars* from animal feed and raw chicken using a combined immunomagnetic separation and ELISA method [J]. *Food Microbiol*, 2001, 18(4): 361-366.
- [17] Pappert G, Rieger M, Niessner R, *et al.* Immunomagnetic nanoparticle-based sandwich chemiluminescence-ELISA for the enrichment and quantification of *E. coli* [J]. *Microchim Acta*, 2010, 168(1-2): 1-8.
- [18] 王若男. 基于 FT-IR/NIR 技术的脂环酸芽孢杆菌分类鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- Wang RN. Classification and identification of *alicyclobacillus* by FT-IR/NIR spectroscopy [D]. Yangling: Northwest A& F University, 2015.
- [19] Naumann D, Helm D, Labischinski H, *et al.* Modern techniques for rapid microbiological analysis [M]. Wiley-VCH, New York, USA, 1991(1):75-76.
- [20] Chang SS, Cavinato AG, Lin M, *et al.* Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Int J Food Microbiol*, 2006, 105(3): 369-376.
- [21] Al-Qadiri HM, Mengshi L, Cavinato AG, *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice [J]. *Int J Food Microbiol*, 2006, 111(1): 73-80.
- [22] Wang J, Yue T, Yuan Y, *et al.* Discrimination of *Alicyclobacillus* strains using nitrocellulose membrane filter and attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy [J]. *J Food Sci*, 2011, 76: M137-M142.
- [23] Lin M, Al-Holy M, Al-Qadiri H, *et al.* Phylogenetic and spectroscopic analysis of *Alicyclobacillus* isolates by 16S rDNA sequencing and mid-infrared spectroscopy [J]. *Sens Instrum Food Qual Saf*, 2007, 1(1): 11-17.
- [24] Essendoubi M, Toubas DC, Leon A, *et al.* Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy [J]. *J Microbiol Method*, 2007, 71(3): 325-331.
- [25] Reinhard H, Sager F, Zoller O. Citrus juice classification by SPME-GC-MS and electronic nose measurements [J]. *Lebensm-Wiss Technol*, 2008, 41(10): 1906-1912.
- [26] Gobbi E, Falasconi M, Concina I, *et al.* Electronic nose and *Alicyclobacillus* spp. spoilage of fruit juices: An emerging diagnostic tool [J]. *Food Control*, 2010, 21(10): 1374-1382.
- [27] Escuder-Gilabert L, Peris M. Review: highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 665(1): 15-25.
- [28] Jo D, Kim GR, Yeo SH, *et al.* Analysis of aroma compounds of commercial cider vinegars with different acidities using SPME/GC-MS, electronic nose, and sensory evaluation [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2013, 22(6): 1559-1565.
- [29] Hartyáni P, Dalmadi I, Knorr D. Electronic nose investigation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculated apple and orange juice treated by high hydrostatic pressure [J]. *Food Control*, 2013, 32(1): 262-269.
- [30] Sberveglieri V, Carmona EN, Pulvirenti A. Detection of microorganism in water and different food matrix by electronic nose [M]. *Sensing Technology: Current Status and Future Trends III*. Springer International Publishing, 2015.
- [31] Wang HX, Hu AQ, Long FY, *et al.* Early detection of *Zygosaccharomyces rouxii*-spawned spoilage in apple juice by electronic nose combined with chemometrics [J]. *Int J Food Microbiol*, 2016, 217: 68-78.
- [32] Falasconi M, Comini E, Concina I, *et al.* Electronic Nose and Its Application to Microbiological Food Spoilage Screening [M]. *Sensing Technology: Current Status and Future Trends II*. Springer International Publishing, 2014.
- [33] Chakraborty C, Doss CGP, Patra BC, *et al.* DNA barcoding to map the microbial communities: current advances and future directions [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2014, 98(8): 3425-3436.
- [34] Muñoz-Quezada S, Chenoll E, Vieites JM, *et al.* Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants [J]. *Brit J Nutr*, 2013, 109 (S2): S51-62.
- [35] Gouws PA, Gie L, Pretorius A, *et al.* Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate [J]. *Int J Food Sci T*, 2005, 40(7): 789-792.
- [36] Maldonado MC, Belfiore C, Navarro AR. Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestris* viability in lemon juice concentrate [J]. *J Ind Microbiol Biot*, 2008, 35(2):141-144.
- [37] 常玉华. 苹果浓缩汁中耐热菌的 PCR 方法快速检测研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2003.
- Chang YH. Studies on rapid detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by PCR method in apple juice concentrate [D]. Xi'an: Shanxi Normal University, 2003.
- [38] Hanna SE, Connor CJ, Wang HH. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations [J]. *J Food Sci*, 2005, 70(3): R49-R53.
- [39] 胡斌, 莫国玉, 刘燕, 等. 荧光定量 PCR 技术检测 DNA 疫苗在生殖腺和血液中的残留[J]. *热带医学杂志*, 2006, (9): 991-993.
- Hu B, Mo GY, Liu Y, *et al.* Detection of Residual of DNA of the DNA vaccine in genital gland and blood using fluorescent quantitative polymerase chain reaction [J]. *J Trop Med*, 2006, (9): 991-993.
- [40] Casey GD, Dobson ADW. Potential of using real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice-a preliminary study [J]. *Int J Food Microbiol*, 2004, 91(3): 327-335.
- [41] Connor CJ, Hongliang L, Gardener MS, *et al.* Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products [J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 99(3): 229-235.
- [42] 陈世琼, 陈文峰, 胡小松, 等. 16S rDNA PCR-RFLP 法快速鉴定分离自

- 浓缩苹果汁生产线的脂环酸芽孢杆菌[J]. 中国食品学报, 2006, (02): 99-102.
- Chen SQ, Chen WF, Hu XS, *et al.* Rapid identification of *Alicyclogacillus* isolated from concentrated apple juice processing by 16S rDNA PCR-RFLP [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2006, (02): 99-102.
- [43] Las Heras-Vazquez FJ, Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jimenez JM, *et al.* Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers [J]. FEMS Yeast Res, 2003, 3: 3-9.
- [44] Chen S, Tang Q, Zhang X, *et al.* Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment [J]. Food Microbiol, 2006, 23(5): 439-445.
- [45] Justé A, Lievens B, Klingenberg M, *et al.* Predominance of *Tetragenococcus halophilus* as the cause of sugar thick juice degradation [J]. Food Microbiol, 2008, 25(2): 413-421.
- [46] 马妮妮, 魏冬霞, 林瑞庆, 等. AFLP 标记在微生物学上的应用[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(9): 1048-1051.
- Ma NN, Wei DX, Lin RQ, *et al.* Application of amplified fragment length polymorphism in microbiology [J]. J Trop Med, 2006, 6(9): 1048-1051.
- [47] 周宁, 张建新, 樊明涛, 等. 分子分型技术在乳酸菌鉴定及多态性研究中的应用[J]. 食品工业, 2012, (5): 69-73.
- Zhou N, Zhang JX, Fan MT, *et al.* Advances in molecular approaches and their applications in lactic acid bacteria [J]. J Food Ind, 2012, (5): 69-73.
- [48] Pina C, Teixeira P, Leite P, *et al.* PCR-fingerprinting and RAPD approaches for tracing the source of yeast contamination in a carbonated orange juice production chain [J]. J Appl Microbiol, 2005, 98(5): 1107-1114.
- [49] Yamazaki K, Teduka H, Shinano H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages [J]. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60(3): 543-545.
- [50] 张红卫, 许汴利, 苏云普, 等. RAPD-PCR 技术筛选间日疟原虫基因标记[J]. 中国预防医学杂志, 2006, (4): 251-253.
- Zhang HW, Xu BL, Su YP, *et al.* Screening genetic marker of *Plasmodium vivax* by random amplified polymorphic DNA-PCR [J]. Chin Prev Med, 2006, (4): 251-253.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介

王 梅, 工程师, 主要研究方向为食品、化妆品检测。
E-mail: ximeiga@163.com