

通用型酵母菌实时荧光 PCR 检测方法的建立

余以刚, 万松华, 胡双芳, 肖性龙, 吴晖

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 为建立一种快速检测鉴定食品中酵母污染菌实时荧光 PCR 法, 根据酵母基因序列设计出通用型探针和引物, 建立了运用实时荧光 PCR 法检测酵母的反应体系和反应条件, 进而对该方法进行特异性验证, 灵敏度分析及稳定性评价, 并应用于产品样本的检测。特异性试验表明, 酵母菌检测结果均为阳性, 而细菌、霉菌均为阴性, 荧光 PCR 检测结果的特异性为 100%。灵敏度试验表明, 酵母菌检出限在 760 cfu/mL。稳定性试验表明, 酵母菌组内实验 CV 在 0.62~0.81% 之间波动, 而组间实验在 0.43~0.77% 之间波动。通过样品增菌检测发现在培养 12 h 后能检出阳性。本研究所建立的实时荧光 PCR 法特异性好、灵敏度高、稳定性好, 具有快速、简便的特点, 为快速检测食品中酵母污染提供新的方法和途径, 具有很好的研究价值和应用前景。

关键词: 酵母菌; 荧光定量 PCR; 检测

文章编号: 1673-9078(2014)12-215-219

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.036

Establishing a Universal Fluorescence Real-time PCR Method for the Detection of Yeast in Food

YU Yi-gang, WAN Song-hua, HU Shuang-fang, XIAO Xing-long, WU Hui

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The aim of this study was to establish a rapid fluorescence real-time PCR method for the detection of contamination in yeast present in food products. For this purpose, a universal probe and primers based on the yeast genome sequence were designed. The reaction system and conditions for fluorescence real-time PCR detection of yeast were established. The method was tested for its specificity, sensitivity, and reproducibility, and was also applied to the examination of food samples. The fluorescence real-time PCR assay was shown to display 100% specificity, as positive results for the specificity test were obtained only in yeast and not in bacteria or mold. The limit of detection of sensitivity was determined to be 760 cfu/mL. The sample was also tested for reproducibility, and the coefficient of variation (CV) was observed to fluctuate in the range of 0.62%~0.81% within the yeast group, and 0.43%~0.77% between groups. Moreover, a yeast enrichment test was performed, which demonstrated that the positive samples could be detected even after 12 h. In summary, the fluorescence real-time PCR assay established in this study showed excellent specificity, high sensitivity, and good reproducibility, in addition to being rapid and easy to use. This method could be used in the rapid detection of yeast contamination in food, and therefore can be used in research and related applications.

Key words: yeast; quantitative fluorescence PCR; detection

大量酵母的存在可引起食品风味下降或变质, 因此由酵母引起的食品腐败越来越受到重视。酵母不仅在低湿度、低 pH 值或高盐高糖的食品基质中具有较强的适应能力, 同时对防腐剂、冷冻、电离辐射照射等防腐灭菌工艺具有比细菌更强的抵抗力, 随着食品防腐剂及电离辐射照射等相关技术在食品加工中的广

收稿日期: 2014-05-23

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (31101279); 国家自然科学基金面上资助项目 (31271867); 华南理工大学中央高校基本科研业务费重点项目 (2013ZZ0068); 广东省科技计划项目 (2012A080107006)

作者简介: 余以刚 (1968-), 男, 教授, 研究方向: 食品安全与检测

通讯作者: 肖性龙 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品安全与检测

泛应用, 普通致病性或腐败性细菌被有效杀灭, 酵母则成为引起食品变质的优势菌株^[1]。腌制肉制品因具有高盐浓度, 熏肉因含有亚硝酸钠、二氧化硫等, 都使得酵母则成为引起食品变质的优势菌株, 目前检测到使肉制品感官品质的改变酵母主要有汉逊德巴利酵母 (*Candida alimentaria*)、和清酒假丝酵母 (*Candida sake*)、罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) 等^[2]。高糖浓度食品如糖果、果脯类, 因其高渗透压比, 容易污染酵母, 酵母使糖类酒精发酵造成蛋白糖和奶油块糖破裂^[3-4]。奶制品中分离出了酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、隐球酵母属 (*Cryptococcus*)、毕赤酵母属 (*Pichia*) 等^[5-7], 其中酿酒酵母也是导致果汁腐败的最主要原因^[8]。酵母引

起的食物变质和腐败给食品工业造成巨大的安全风险,因此寻找一个快速简便、能同时检测多种食品种腐败性和致病性酵母的检测方法意义重大。

目前检测酵母菌的方法有传统的培养法、抗体抗原免疫法、聚合酶链式反应(PCR)技术等。传统的培养法方便、成本低,但所需时间至少需要5 d^[9],无法适应现代高通量快速检测的需求;抗体抗原免疫法具有较高的灵敏度和特异性,但存在成本较高、筛选抗体困难和不能同时检测多种抗原的能力,无法满足食品中多种食品中腐败性和致病性酵母同时检测的要求^[10]。传统PCR特异性强、灵敏度高、快速、简便,但有易受到污染,需要使用有毒试剂EB等缺点。实时荧光PCR是在定性PCR技术基础上发展起来的核酸定量技术,不但具备传统PCR的优点,而且克服了易受到污染,需要使用有毒试剂缺点,该检测方法具有快速、简便、直观、定量准确等优势,已被成功应用于临床疾病诊断、动物疾病检测、食品安全、科学研究等多种领域的研究检测^[11~12]。

本研究通过酵母菌属26S rRNA基因序列,设计出酵母通用型引物探针,选取若干酵母菌,建立实时荧光定量PCR方法,对其进行了特异性、敏感度、稳定性进行了检验,并进行了产品样本的初步检验,为检测食品中酵母污染提供新的方法和途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与样品

本文使用的菌株均为华南理工大学轻工与食品学院食品安全与检测中心实验室保藏菌种,待检测的保健品原料样本由无限极(中国)有限公司提供,菌种列表详见表1。选取15种常见的酵母污染菌,10种细菌,5种霉菌检测引物探针的特异性(表1),选取酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)用于引物探针的灵敏度、稳定性以及人工污染样品的研究。

1.1.2 主要试剂

真菌DNA提取试剂盒、细菌DNA提取试剂盒购于北京天恩泽基因科技有限公司, Premix Ex Taq(Probe qPCR)购于宝生物工程(大连)有限公司,引物、探针购于上海辉睿生物科技合成,PDA培养基、营养肉汤、YPD培养基购于广东环凯微生物科技有限公司,DEPC水。

1.1.3 主要仪器

ABI 7500 Real Time PCR System、Thermo 微量超速离心机、生化培养箱、Biophotometer 分光光度计

(Eppendorf)、Thermo 微量移液器。

表1 菌种列表

Table 1 Strains used in this study			
菌株	编号	荧光 PCR 结果	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CICC 1001	+	
<i>Pichia spartinae</i>	JCM 10741	+	
<i>Candida parasilosis</i>	CICC 1257	+	
<i>Saccharomyces uvarum</i>	CICC 1465	+	
<i>Rhodotorula rubra</i>	CICC 32621	+	
<i>Toruiopsis candida</i>	CICC 1234	+	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CICC 1467	+	
<i>Rhodotorula pallida</i>	CICC 1690	+	
<i>Candida utilis</i>	CICC 1268	+	
Yeast	CGMCC 2.0703	+	
	<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	CICC 1460	+
	<i>Pichia carsonii</i>	CGMCC 2.1908	+
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	CGMCC 2.1595	+
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CICC 1004	+	
<i>Pichia jadinii</i>	CICC 1271	+	
Bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC 26003	-
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CCTCC 94018	-
	<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	-
	<i>Escherichia Coli</i>	NCTC 12900	-
	<i>listeria monocytogenes</i>	CCTCC 97021	-
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CICC 6149	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	CICC 20533	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CICC 23706	-
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	CICC 6119	-
	<i>Rhizobium astragula</i>	CICC 20026	-
Mold	<i>Aspergillus oryzae</i>	HG AO1	-
	<i>Rhizopus chinensis Sato</i>	HG rc 2	-
	<i>Mucor circinelloides</i>	HG mc 2	-
	<i>Streptomyces carpaticus</i>	CICC 10648	-
	<i>Streptomyces virginiae</i>	CICC 11013	-

1.2 方法

1.2.1 引物探针设计、检测酵母方法的建立

引物探针设计: 经过 Blast 分析可知, 26S rRNA 基因具有酵母菌内保守性。本研究根据酵母菌属 26S rRNA 基因序列与其他菌种的差异, 运用 ABI 的 Primer Express 及 DNASTar 中的 PrimerSelect 软件, 设计出引物探针见表 2。同时按照 takara Premix Ex Taq 试剂盒说明书要求, 每 20 μL 的 PCR 反应体系包含 10 μL 2x Premix Ex Taq (Probe qPCR), 0.2 μL ROX Reference Dye II, 1 μL PCR 上游引物, 1 μL 下游引物, 0.5 μL 探针, 2 μL 模板, 用 DEPC 水补齐至 20 μL , 于 ABI 7500 Real Time PCR System 进行实时荧光 PCR 扩增。反应程序: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 扩增 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s (收集荧光), 每个循环收集一次荧光, 共 40 个循环, 荧光基团用 FAM 标记。

表 2 引物探针序列

Table 2 Primer and probe sequences

酵母	序列(5'-3')	长度	Tm/ $^{\circ}\text{C}$
上游引物	GAAGAGTCGAGTT	22	57.1
	GTTTGGGAA		
下游引物	TCCTTCCCTTTCA	23	58.2
	ACAATTTAC		
探针	FAM-TGTACTTGTT CGCTATCGGTCTC TCGCC-BHQ1	28	68.6

1.2.2 DNA 模板的提取

所有酵母菌、霉菌用液体 PDA 培养基 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 48 h, 测 OD 值, 估计其菌数约 3×10^8 cfu/mL, 细菌用营养肉汤 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 12 h 后, 测其 OD 值, 估计其菌数约 10^8 cfu/mL, 然后分别取 1 mL 菌液依照 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA, 提取后 DNA 作为反应模板贮存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.3 Real-time PCR 的特异性

分别根据步骤 1.2.2 提取的 DNA 模板和步骤 1.2.3 建立的反应条件与反应体系进行荧光 PCR 特异性实验。判断研究方法的特异性, 避免设计上出现假阳性与假阴性。

1.2.4 Real-time PCR 的灵敏度

取酿酒酵母标准菌株于 PDA 培养基 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 48 h, 然后按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 梯度稀释, 取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 涂板计数, 涂板的菌液量为 50 μL /平板。并将 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 五个梯度菌液 1 mL 用真菌提取试剂盒抽提基因组 DNA, 具体步骤参考该试剂盒说明书, 用优化后的反应条件与反应体系进行荧光 PCR 实验, 每个梯度重复 3 次。

1.2.5 Real-time PCR 的稳定性

取酿酒酵母标准菌株于 PDA 培养基 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 48 h, 然后按如下梯度稀释 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} , 取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 用真菌提取试剂盒抽提取 DNA。在 20 μL 荧光 PCR 反应体系中, 分别加入以上提取的各个梯度酵母基因组 DNA 2 μL , 分别进行组内和组间稳定性测试, 根据前述 PCR 反应条件进行荧光 PCR 检测。组内试验一次做 4 个重复, 同时上机, 计算 CT 值的标准差与 CV 值。组间试验不设重复, 在不同的时间内分别做 4 次, 计算 CT 值的标准差与 CV 值。

1.2.6 检测方法的初步应用

取钙片混合颗粒保健食品原料 20 份, 根据 GB 4789.2-2010 法测得其菌落总数和大肠菌群数如表 3 所示。吸取 100 μL 浓度为 100 cfu/mL 的菌悬液均匀混在 25 g 保健食品原料粉末中, 静置 10 min, 加入 225 mL YPD 培养基增菌液, 混合均匀后, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 分别在 8 h、10 h、12 h、14 h 各取 1 mL 增菌液, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 按真菌提取试剂盒要求抽提取 DNA。根据前述 PCR 反应条件进行荧光 PCR 检测, 并用 DEPC 水作为阴性对照, 同时用国标法 GB 4789.3-2010 进行检测比较。

表 3 钙片混合颗粒保健食品原料中菌落总数和大肠菌群数

Table 3 Total number of colonies and coliform groups in calcium-hybrid compounds used as raw material for health foods

检测项目	检测方法	检测结果
菌落总数	GB 4789.2-2010	<10 CFU/g
大肠菌群	GB 4789.3-2010	<0.3MPN/g

2 结果与讨论

2.1 PCR 的特异性

用荧光 PCR 检测收集到的酵母菌和其他代表性菌株, 特异性实验结果显示 (表 1), 选取的 15 种常见的酵母污染菌都有典型的“S”形扩增曲线, 检测结果均为阳性。选取的 10 种细菌, 5 种霉菌等非目标菌株无扩增信号, 检测结果均为阴性。在选定的菌株范围内, 荧光 PCR 检测结果的特异性为 100%。

2.2 PCR 的灵敏度

荧光 PCR 检测和平板计数结果见表 4。荧光 PCR 结果表明, 随着稀释梯度的不断增加, 即菌液中菌浓度的不断减少, 其 Ct 值对应的增大, 直至稀释梯度为 10^{-6} 时达到检出限, 其平均 Ct 值达到 33.53, 标准差

为 0.17。平板计数结果显示, 前四个稀释梯度 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} , 由于菌液浓度太高无法计数, 后三个稀释梯度 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 平板计数平均值分别为 309、38、5, 涂板的菌液量为 $50 \mu\text{L}$ /平板, 计算得到稀释梯

度为 10^{-6} 的菌浓度为 760 cfu/mL , 即荧光 PCR 检出限在 760 cfu/mL 。结果表明上述引物和探针具有良好的灵敏度。

表 4 灵敏度实验结果

稀释梯度	Ct 值			平均 Ct (S.D)	CV/%	平板计数平均值
	1	2	3			
10^{-1}	17.27	17.53	17.86	17.55(0.29)	1.65	TNTC
10^{-2}	20.61	20.35	20.98	20.65(0.32)	1.55	TNTC
10^{-3}	24.24	24.74	24.56	24.51(0.25)	1.02	TNTC
10^{-4}	27.53	27.23	27.86	27.54(0.31)	1.16	TNTC
10^{-5}	30.64	30.21	30.57	30.47(0.23)	0.75	309
10^{-6}	33.57	33.67	33.34	33.53(0.17)	0.51	38
10^{-7}	-	-	-	-	-	5

注: 变异系数 (%CV) = 标准差/平均CT值, “-”表示未能检出。

2.3 PCR 的稳定性

稳定性结果如表 5 所示, 组内实验每个稀释梯度的 4 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本上重合, 平均 Ct 值范围在 24.41~33.52 之间, CV 在 0.62~0.81%

之间波动。而组间实验每个稀释梯度的 4 个时间段扩增曲线在阈值线附近也基本上重合, 平均 Ct 值范围在 24.49~33.45 之间, 在 0.43~0.77% 之间波动。组内实验和组间实验对应的稀释梯度 Ct 值也基本重合, 综上可知本方法稳定性良好。

表 5 组内与组间实验 CV 值

浓度	Ct 值				平均 Ct (S.D)	CV/%
	1	2	3	4		
组内						
10^{-6}	33.23	33.57	33.42	33.86	33.52(0.27)	0.79
10^{-5}	30.18	30.32	30.55	29.97	30.26(0.24)	0.81
10^{-4}	27.18	27.23	27.54	27.43	27.35(0.17)	0.62
10^{-3}	24.32	24.65	24.43	24.24	24.41(0.18)	0.73
组间						
10^{-6}	33.54	33.26	33.75	33.25	33.45(0.24)	0.72
10^{-5}	30.53	30.21	30.02	30.23	30.25(0.21)	0.69
10^{-4}	27.25	27.11	26.97	27.06	27.10(0.12)	0.43
10^{-3}	24.65	24.25	24.43	24.63	24.49(0.19)	0.77

2.4 PCR 法对产品样本的检测结果

用荧光定量 PCR 检测人工染菌剂量 $10 \text{ CFU}/25 \text{ g}$ 匀浆的 20 份保健食品原料粉, 在增菌 12 h 后 20 份样品均能检测出阳性, 8 h 和 10 h 未能检出, 结果如图 1 所示。国标法对人工染菌剂量 $10 \text{ cfu}/25 \text{ g}$ 匀浆的 20 份保健食品原料粉末的检测, 在培养 12 h 以内均未能检出, 培养 14 h 后检测出阳性, 但 5 d 之后才能看到检出结果。通过结果比较, 荧光定量 PCR 大大减少了酵母检测所需的时间, 为酵母快速检测提供了新的技

术手段。

3 结论

3.1 实时荧光定量 PCR 方法常见的有染料法和探针法, 目前染料法检测酵母, 是根据酵母菌 26S rRNA 基因序列设计出引物^[13], 但染料法易受到非特异性扩增和引物二聚体的影响从而出现假阳性。基于探针法的实时荧光定量 PCR 相较于染料法可提高其灵敏度和特异性, 但目前探针法检测酵母大多是根据一种引物探针检测出相对应的一种酵母菌。陈世琼等^[1]针对

酿酒酵母、鲁氏接合酵母、斯巴达克毕赤酵母和布鲁塞尔德克酵母的基因保守序列, 分别设计了4种探针引物, 建立了针对这4种酵母的实时荧光PCR鉴定方法, 但该方法操作繁琐, 带来巨大工作量, 降低工作效率, 由于涉及酵母菌种类少, 对食品中存在的大量其他种属的有害酵母还会可能出现漏检, 产生食品安全危害, 无法适应现代食品快速检测的要求。

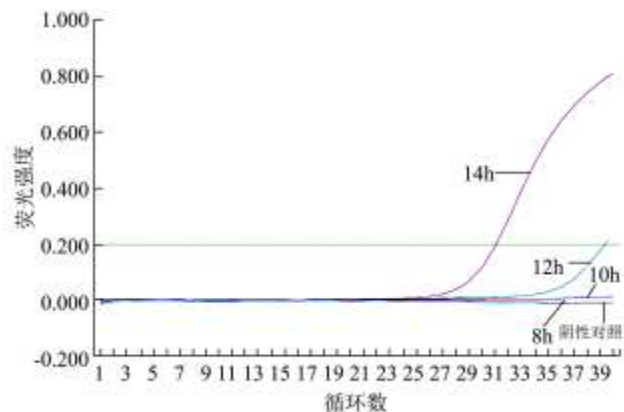


图1 酿酒酵母菌荧光PCR扩增结果

Fig.1 Results of fluorescence PCR for *Saccharomyces cerevisiae*

3.2 本研究建立的实时荧光PCR检测方法, 通过人工污染样品试验验证, 耗时为12h之内, 与全程至少需要5d的传统培养法相比, 大大缩短了酵母检测所需的时间^[1], 且具有操作简单快捷的优点, 为食品的大批量检测和快速通关等提供了便利。采用实时荧光PCR探针法, 可以提高检测特异性, 避免染料法易出现的假阳性的缺点。根据酵母菌26S rRNA基因序列设计出通用型引物探针, 克服了根据某一特定酵母设计引物探针法^[1]和抗体抗原免疫法^[10]不能同时检测多种酵母的缺点, 为高糖高盐食品、奶制品、软饮料等以酵母腐败为主的食品的检测提供了新的技术手段, 弥补了食品安全检测中的不足。

3.3 通过已知酵母对设计检测酵母的通用型引物探针的验证, 确定建立的real-time PCR探针法对酵母菌的检测有高度特异性, 在选定的菌株范围内, 荧光PCR检测结果的特异性为100%; 高灵敏度, 检出限在760cfu/mL; 稳定性好, 组内实验CV在0.62~0.81%之间波动, 而组间实验在0.43~0.77%之间波动。综上所述, 本研究所构建的real-time PCR探针法方法具有操作简单、快速、特异性强、灵敏度高、稳定性好等优点, 为酵母污染菌的检测提供了新的检测手段, 有望发展成为简易的常规快速检测酵母污染菌的有效手段。

参考文献

[1] 陈世琼, 逢波, 蔡雪凤, 等. 食品中腐败酵母的实时荧光PCR

鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(7): 185-187

CHEN Shi-qiong, PANG Bo, CAI Xue-feng, et al. Identification of spoilage yeasts isolated from food by real-time PCR [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(7): 185-187

[2] Nielsen D S, Jacobsen T, Jespersen L, et al. Occurrence and growth of yeasts in processed meat products-Implications for potential spoilage [J]. Meat Science, 2008, 80(3): 919-926

[3] 李树立, 刘国兴. 浅谈食品中酵母和霉菌的污染及其检验[J]. 河北经贸大学学报: 综合版, 2004, 4(2): 83-85

LI Shu-li, LIU Xing-guo. Introduction about yeast and mold in food contamination and its inspection [J]. Journal of Hebei University of Economy and Trade (Comprehensive Edition), 2004, 4(2): 83-85

[4] Hayes J C, Laffey J G, McNeil B, et al. Relationship between growth of food-spoilage yeast in high-sugar environments and sensitivity to high-intensity pulsed UV light irradiation [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47(9): 1925-1934

[5] Yalcin H T, Ucar F B. Isolation and characterization of cheese spoiler yeast isolated from Turkish white cheeses [J]. Annals of Microbiology, 2009, 59(3): 477-483

[6] Makino H, Fujimoto J, Watanabe K. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for detection and enumeration of yeasts of public health interest in dairy product [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 140(1): 76-83

[7] Irlinger F, Mounier J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(2): 142-148

[8] 胡斌, 钱和. 酿酒酵母菌含量对控制橙汁腐败的影响[J]. 食品工业科技, 2009(1): 186-188

HU Bin, QIAN He. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* population on controlling spoilage in orange juice [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009, 1: 186-188

[9] GB 4789.15-2010, 《食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数》[S]

GB 4789.15-2010, Food microbiological examination: enumeration of moulds and yeasts [S]

[10] 孙培龙, 徐巧林, 赵敏. 啤酒中污染菌检测与鉴定的研究进展[J]. 酿酒, 2006, 33(6): 65-69

SUN Pei-long, XU Qiao-lin, ZHAO Min. Advance in detection and identification of beer-spoilage bacterium [J]. Liquor Making, 2006, 33(6): 65-69

[11] Hsu M C, Chen K W, Lo H J, et al. Species identification of

- medically important fungi by use of real-time light cyclers PCR [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2003, 52(12): 1071-1076
- [12] Sutter D E, Worthy S A, Hensley D M, et al. Performance of five FDA-approved rapid antigen tests in the detection of 2009 H₁N₁ influenza A virus [J]. *Journal of Medical Virology*, 2012, 84(11): 1699-1702
- [13] Hierro N, Esteve-Zaroso B, González Á, et al. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(11): 7148-7155

现代食品科技