

Rep-PCR 应用于快速鉴定啤酒污染菌的研究

Study on Application of rep-PCR Fingerprint in Rapid Identification of Beer-spoilager

朱林江¹, 郑飞云^{1*}, 赵亚洲², 邢香楠², 李 崎¹, 顾国贤¹

ZHU Lin-Jiang¹, ZHENG Fei-Yun^{1*}, ZHAO Ya-Zhou², XING Xiang-Nan², LI Qi¹ and GU Guo-Xian¹

1 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036

2 重庆啤酒集团常州天目湖啤酒有限公司, 溧阳 213311

1 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214036, China

2 Chongqing Beer Group Changzhou Tianmuhu Beer Brewery, Liyang 213311, China

摘 要 为评价 rep-PCR 在快速鉴定啤酒污染菌中的应用, 首先比较了 DNA 提取方法, 确定 CTAB 法作为制备 rep-PCR 的 DNA 模板的方法。并通过 PCR 产物直接测序的方法, 从分离菌中鉴定得到 11 种常见的啤酒污染菌。用 BOXA1R 和 (GTG)₃ 引物扩增分离菌, 采用 GelCompar II 软件处理电泳图, 构建污染菌的标准指纹图库。经过聚类分析表明, BOXA1R 和 (GTG)₃ 对 *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. casei/paracasei*, *L. plantarum* 和 *L. fermentum* 的聚类效果具有互补性, 并首次提出指纹比对快速鉴定的相似系数阈值的概念。对来自三个不同来源的 9 株乳酸菌的快速鉴定结果表明, rep-PCR 鉴定技术简单、快速、可靠, 在快速鉴定方面将具有重要的应用价值。

关键词 rep-PCR, BOXA1R, (GTG)₃, 相似系数阈值, 啤酒腐败菌

中图分类号 Q819 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)06-1013-08

Abstract The application potential of rep-PCR in typing beer-spoilage isolates was studied. The effects of different factors, including DNA templates and primers, on the quality and reproducibility of fingerprints were investigated. The CTAB protocol was shown to be the feasible method for DNA extraction. Primers BOXA1R and (GTG)₃ were used in rep-PCR, and the PCR products were sequenced to identify strains isolated from two breweries. Rep-PCR fingerprint profiles were obtained by using GelCompar II software. Cluster analysis showed that the isolates belonging to *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. casei/paracasei*, *L. plantarum* are divided into 2 or 3 subgroups. In addition, the two rep-PCR fingerprint profiles complemented with each other in typing these isolates. Combining the similarity coefficient cut-off (SCC) of species, 9 unknown isolates were identified rapidly by using both fingerprint databases. The results indicate that rep-PCR is a simple, reliable and promising method for rapid identification of beer-spoilager.

Key words rep-PCR, BOXA1R, (GTG)₃, similarity coefficient cut-off, beer-spoilager

目前啤酒厂检测污染菌还是采用传统的培养基 检测方法, 如 MRS 培养基或 M-NBB 培养基等, 其缺

Received: July 5, 2006; Accepted: August 17, 2006.

This work was supported by the grant from the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT0532).

* Corresponding author. Tel: 86-510-85805219; Fax: 86-510-85805219; E-mail: feiyunzh@sytu.edu.cn

长江学者和创新团队发展计划资助项目 (No. IRT0532).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

点是难以预测污染菌可能造成的威胁。不同的啤酒污染菌对啤酒酿造的危害是不同的,如 *Lactobacillus brevis* 能发酵糊精和淀粉,加速发酵液的稀化;*L. lindneri* 具有较强的抗酒花能力和耐热能力,且所有菌株都具有腐败啤酒的能力等等。所以对分离的菌株进行快速鉴定,才能更好地指导啤酒的生产,保证啤酒风味的稳定。

D. Michael Olive 对多种基于基因型的快速鉴定技术进行比较,表明 rep-PCR 鉴定能力高于 RAPD-PCR,仅次于 PFGE;而且其鉴定程序简单,指纹重复性好,适用于指纹数据库的构建^[1]。近年来对 rep-PCR 的研究不断增加,如作为研究 Romanian 乳制品发酵过程的不同指纹的优势菌群变化趋势从而筛选出有价值的菌株的一个有利工具^[2];采用 BOXA1R-rep-PCR 对 451 株 *Streptomyces* spp. 标准菌的进行了系统的分类和鉴定^[3]。(GTG)₃-PCR 指纹被证明可以应用于快速鉴定 *Enterococcus* spp.^[4] 和 *Lactobacillus* spp.^[5]。但在啤酒污染菌的鉴定方面研究较少。本次研究主要是评价 rep-PCR 指纹对分离的啤酒污染菌的分类效果,并初步验证其鉴定效果。根据聚类分析,首次提出不同菌种指纹鉴定的相似系数阈值这个新概念。

1 材料和方法

1.1 分离污染菌及菌种培养条件

从两个不同的啤酒厂分别分离得到 38 株和 21 株啤酒污染菌,从实验室的不同品种麦芽的表面分离得到 12 株菌,实验室保藏的啤酒污染菌有两株标准菌(*L. casei* subsp. *casei* JCM1134 和 *L. buchneri* JCM1115)和 12 株分离菌。分离培养基:采用添加有酒花、放线菌酮的麦汁培养基和 MRS 培养基。富集培养基:用添加 30% 啤酒的 M-MRS 培养基。培养方法如下:将装有培养皿的厌氧罐用 N₂ 排气 5min 后放入含有 1g 没食子酸的试管,在试管中加入 10mL 的 2.5mol/L 的 NaOH,放入厌氧指示剂后排气 1min,并盖上盖子,30℃ 培养。

1.2 DNA 提取

本次比较两种常用的 DNA 提取方法,上海生物工程技术有限公司的 UNIQ-10 细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 CTAB 法。后者的提取步骤如下:将经过 2~4d 厌氧培养的 100~300mg 的细胞用于 DNA 提取;加入 0.45mL 的 DNA 提取缓冲液(CTAB)(100mmol/L Tris-HCl(pH8.0),100mmol/L EDTA(pH8.0),1.5mol/L NaCl,1% 的 CTAB)(若有

沉淀则需要 37℃ 预热),加入 50μL 的 25mg/mL 的 lysozyme 37℃ 水浴 30min;加入 25μL 10% 的 SDS 混匀,加入 4μL 的 20mg/mL 的蛋白酶 K(PK) 55℃ 水浴 2h,每隔 20min 上下颠倒混匀;离心,取上清,经过等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提和氯仿/异戊醇(24:1)抽提后;用 0.6 倍体积的异丙醇沉淀 DNA,再用 70% 的乙醇洗涤 2 次。空气中干燥后,将沉淀溶于 50μL 的 1×TE buffer。纯化的 DNA 溶液用 GeneQuant 公司的微型核酸蛋白分析仪 80-2114-98 上分析浓度和纯度,只取 $A_{260}/A_{280} = 1.6 \sim 1.9$ 的 DNA 样品用于 rep-PCR。

1.3 乳酸菌专一性引物的扩增

采用自行设计的乳酸菌专一性引物 BP1 和 BP3 用于鉴定分离菌株^[6],反应体系如下:Mg²⁺ 浓度为 2.5mmol/L, Taq DNA 聚合酶(上海申能博彩生物科技有限公司) 2.5u,引物 BP₁ 和 BP₃ 均为 0.4μmol/L, DNA 模板 50~100ng(1~2μL 纯化的 DNA), 200 μmol/L 的 dNTP,加 5μL 10×PCR buffer 后用双蒸水补足 50μL。扩增程序为:94℃-3min;30 个循环:94℃-45s, 55℃-50s, 72℃-1min;72℃-10min;4℃ 保温。PCR 在 MJ Research INC 的 PTC-100™ 上进行。取 2μL PCR 产物用于 1% 的琼脂糖凝胶电泳,用 GoldView DNA 染料(上海赛百盛基因技术有限公司)染色,目的片段大小为 740bp。

1.4 DNA 测序鉴定

BP₁ 和 BP₃ 的 PCR 产物直接用于测序,RCP 产物纯化步骤和测序反应按照厂家提供的流程(美国应用生物系统中国公司),测序反应产物在 Genetic Analyzer3130 上电泳测序。

1.5 rep-PCR 扩增及指纹图谱处理

本次研究选用三个比较常用的 rep-PCR 引物:(GTG)₃:5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3';ERIC1R(5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCAC-3')和 ERIC2:5'-AAG TAA GTGA CTG GCG TGA GCG-3';BOXA1R 5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GACG-3'。每一种的最佳扩增程序和扩增体系如文献 7 报道。

取 15μL 的 PCR 产物用于 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳(15cm × 15cm),在 6.5V/cm(六一仪器厂的 DYY-8C 电泳仪)稳压条件下电泳 4h,用上海申能博彩生物科技有限公司的 3S 250bp DNA ladder 作为标准 DNA 分子量,用 GoldView DNA 染料染色,在紫外光下成像。指纹图谱采用 Applied Maths 公司的 GelCompar II 软件处理,选用 Pearson 系数计算指纹的

相似性 ,并用 UPGMA(Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic averages)方法构建距离树。

2 结果和讨论

2.1 评价 DNA 提取方法和指纹的重复性

CTAB 法提取的 DNA 纯度较好 , A_{260}/A_{280} 的值一般在 1.6 ~ 1.9 之间 ;而浓度一般在 50 μ g/mL 以上 ;提取得到的 DNA 经过电泳鉴定其大片段在 20 kb 以上。而试剂盒 UNIQ-10(Kit)提取的 DNA 片段较大 ,一般在 50kb 以上 ,不过其浓度较低 ,经过紫外吸光度检测 ,其纯度不如 CTAB 法提取的 DNA 模板。所以 CTAB 法提取的 DNA 的浓度和纯度均较好 ,只是其片段相对较小。

将 5 株已知菌和 3 株未知菌的菌悬液经两种方

法提取 DNA 后用引物 BOXA1R(如图 1)和(GTG)₃ 扩增。其中 BOXA1R 扩增指纹最大差异是 FB5 的指纹 ,其相似性系数为 92.1%。而(GTG)₃ 的指纹最大差异也是 FB5 ,其相似性系数为 93.2%(数据未显示)。另外 ,多次提取的 *L. brevis* F1 和 *L. buchneri* JCM1115 的 DNA 模板用于扩增 ,其指纹的最小相似性系数分别是 94.6% 和 96.5%。由于不同菌种的指纹相似性系数一般在 80% 以下 ,所以两种方法提取的 DNA 和不同批次提取的 DNA 对指纹的重复性影响较小 ,即可以忽略 CTAB 法产生的小片段 DNA 片段的影响。所以 CTAB 法提取的 DNA 纯度好 ,浓度高 ,用于 rep-PCR 扩增得到的指纹条带清晰 ,指纹重复性好 ,提取成本较低 ,所以适用于构建 rep-PCR 指纹数据库。

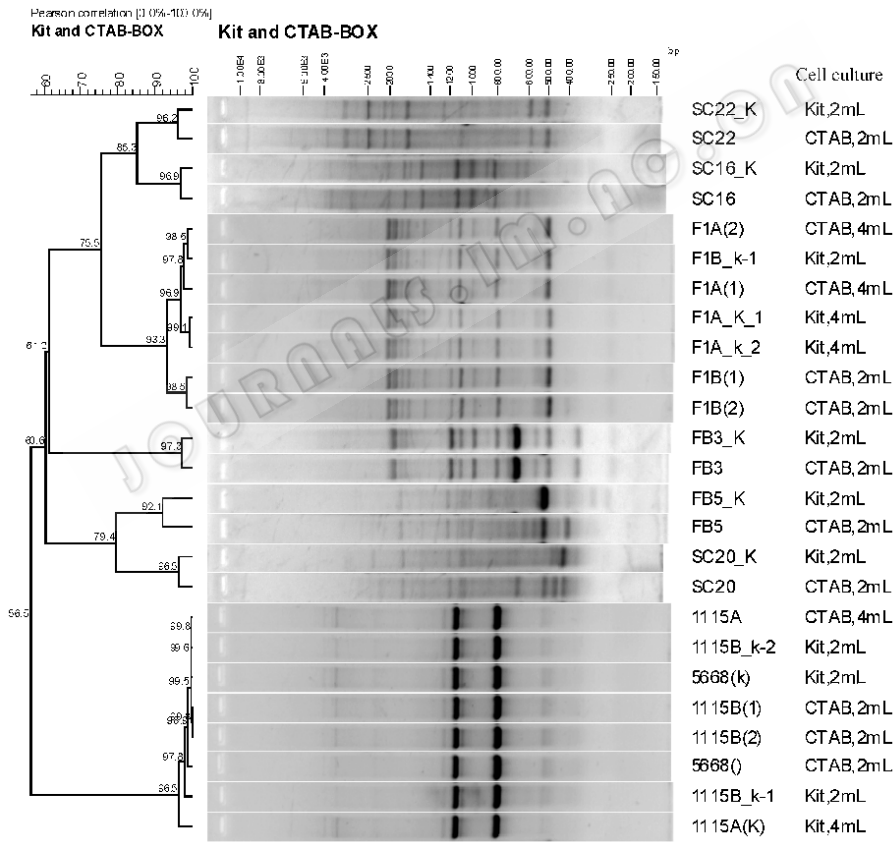


图 1 比较 CTAB 和 Kit 提取 DNA 对 BOXA1R 扩增的影响

Fig.1 Comparison of CTAB and Kit DNA extraction method in BOXA1R-PCR

SC22 :*Lactobacillus parabuchneri* ; F1 :*Lactobacillus brevis* ; FB3 :*Lactobacillus brevis* ; 5668 :*Lactobacillus buchneri* JCM1115 ;*Lactobacillus buchneri* SC16 ,FB5 and SC20 : unknown isolates . K represented Kit .

2.2 DNA 测序鉴定分离菌株并构建啤酒污染菌标准菌库

目前国内还没有针对啤酒污染菌的标准菌库 ,而且 rep-PCR 指纹具有菌株专一性的特点 ,所以本次标准菌库主要是从啤酒厂中得到污染菌后通过

16S rDNA 测序鉴定而建立。

由于 BP 引物专一性较好 ,能够专一性鉴定一些常见的啤酒污染菌 ,适用于 PCR 产物直接测序。为验证 BP 引物扩增的 16S rDNA 的 5'末端的 740bp 用于鉴定菌种的可行性 ,比较了 GenBank 数据库中

的 *L. brevis*、*L. paracasei/casei* 和 *L. buchneri* 三种菌的所有 16S rDNA 序列(1.4kbp 以上)的相似性和 5'末端的 800bp(含 BP 引物扩增的 740bp)序列的相似性。结果表明其相似性基本一致 ,*L. brevis* 的比较如图 2 所示。另外 ,89 株不同的 *Lactobacillus* spp.和 *Pediococcus* spp. 的 5'末端 800bp 序列相似性高于 98% 的只有 *L. curvatus* 和 *L. sakei* 这两种菌。可见

5'末端的 800bp 的序列涵盖了比重较大的高变区 ,适用于准确鉴定菌种 ,如 Lia Rossetti 只是采用 5'末端的 500bp 用于鉴定菌种^[8]。

采用 BP₃ 引物测序 ,在 Genetic Analyzer3130 可以准确分析其中 680bp ~ 710bp 的序列 ,并用于 GenBank 的 BLAST 分析并筛选鉴定。从分离菌中共测序鉴定的分离菌如表 1 所示。

表 1 测序鉴定的菌种和数量
Table 1 The genus identifying by DNA sequencing

<i>Lactobacillus</i> spp.	The number of isolates	<i>Pediococcus</i> spp.	The number of isolates	Other species	The number of isolates
<i>L. brevis</i>	21	<i>P. clausenii</i>	2	<i>Enterococcus faecium</i>	4
<i>L. plantarum</i>	9	<i>P. damnosus</i>	3	<i>Enterococcus gilvus</i>	1
<i>L. casei/paracasei</i>	11	<i>P. acidilactic</i>	4	<i>Bacillus coagulans</i>	1
<i>L. fermentum</i>	9				
<i>L. buchneri/ parabuchneri</i>	6				
<i>L. lactis</i>	1				

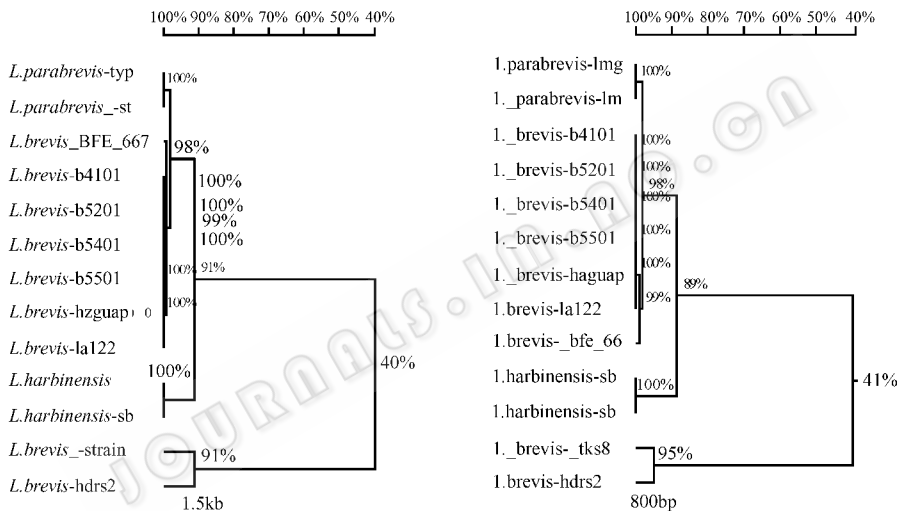


图 2 13 株 *L. brevis* 的 16S rDNA 中 1.5kb 和 5'末端 800bp 序列的聚类分析比较

Fig.2 Comparison of cluster analysis of 1.5kb and 800bp sequence in 16S rDNA between 13 *L. brevis* strains

2.3 三条引物的比较

对 7 株啤酒污染菌扩增结果表明 ERIC 引物扩

增的条带较少 ,而且条带不清晰 ,彼此分离效果不佳。虽然 G. Rasschaert 和 Ángel González 都报道 ERIC 的

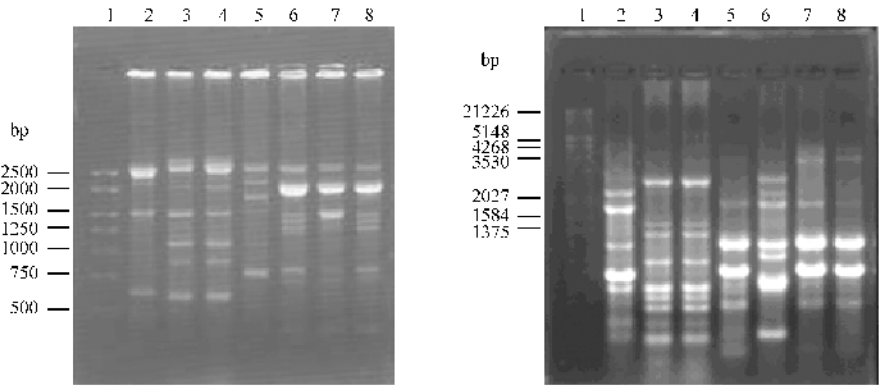


图 3 (GTG)₃ 和 BOXA1R 扩增条带的比较

Fig.3 Comparison of the fingerprint obtained with (GTG)₃ and BOXA1R

A. 1 : 3S 250bp DNA ladder ; 2 : WX-1 (*L. casei*) ; 3 A : WX-2 , WX-3 (*L. plantarum*) ; 5 : JCM1134 (*L. casei*) ; 6 , 7 , 8 : JCM1115 (*L. buchneri*)
A. 1 : λDNA/ *EcoR* I + *Hind* III marker ; 2 : WX-1 (*L. casei*) ; 3 A : WX-2 , WX-3 (*L. plantarum*) ; 5 : JCM1115 (*L. buchneri*) ; 6 : JCM1134 (*L. casei*) ; 7 , 8 : JCM1115 (*L. buchneri*) .

指纹有一定应用价值^[9,10],但从文献报道统计表明 (GTG)₃ 和 BOXA1R 被应用得更多,所以没有对 ERIC 的扩增条件进一步深入优化。而 (GTG)₃ 和 BOXA1R 的指纹如图 3 所示。(GTG)₃ 指纹条带分布在 500bp ~ 2500bp 之间,条带数量变化较大。BOXA1R 指纹的分子量分布较大,即在 250bp ~

4000bp 之间,条带数量较多,而且条带的亮度和彼此分离效果明显好于 (GTG)₃ 的。不过两者指纹均能区分不同菌种,所以需要进一步比较两个引物在快速鉴定啤酒污染菌中的应用。

2.4 建立标准菌的 rep-PCR 指纹图库并对分离菌株快速鉴定

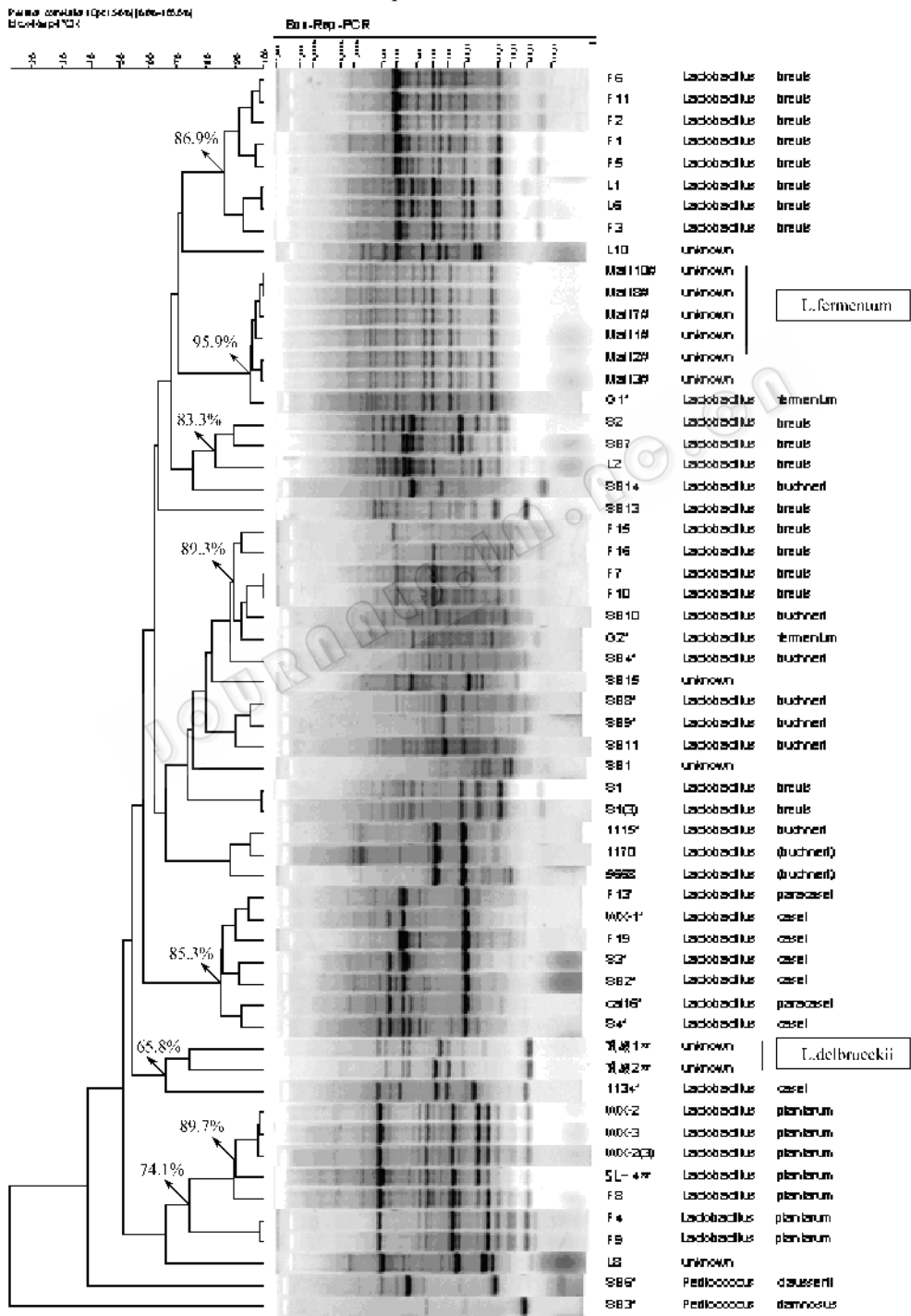


图 4 BOXA1R 的一些分离菌的指纹的聚类分析

Fig.4 Cluster analysis of some isolates ,fingerprints obtained with BOXA1R primer
StrainL8 ,L10 ,SB1 can't be identified by direct sequencing of PCR product.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

对已有分离鉴定的菌株用 BOXA1R 和(GTG)₃ 进行扩增 ,经过 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳并紫外成

像后 ,用 GelCompar II 软件处理电泳图并得到指纹数据库 ,经过聚类分析如图 4 和 5 所示。聚类分析表

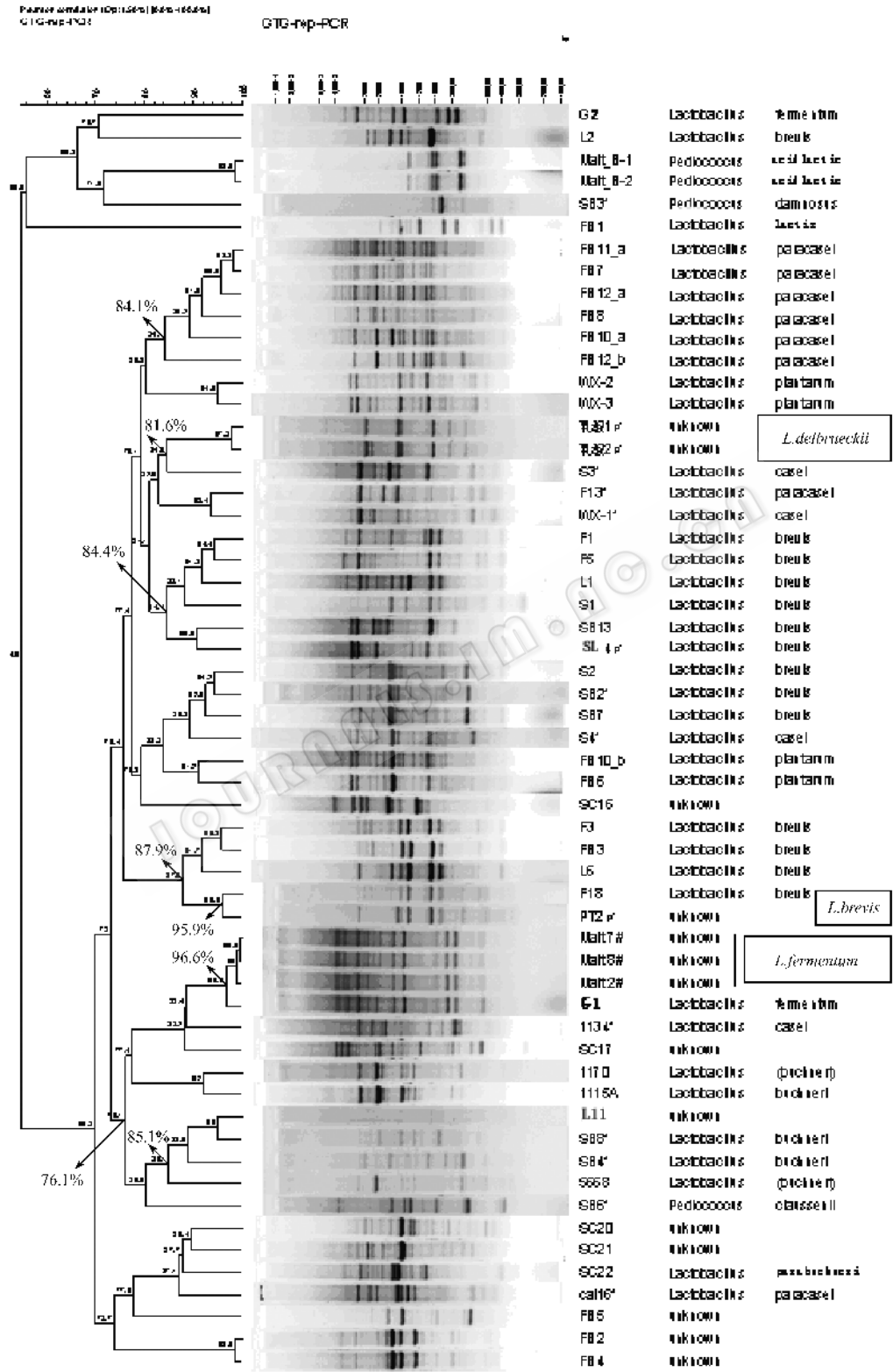


图5 (GTG)₃ 的一些分离菌的指纹的聚类分析

Fig.5 Cluster analysis of some isolates' fingerprints obtained with(GTG)₃ primer
SC16 , SC20 , SC21 , L11 , FB2 , FB4 , FB5 can't be identified by PCR product direct sequencing of PCR product.

明不同菌种的 BOXA1R 指纹相似性一般小于 75% , (GTG)₃ 指纹的一般小于 77% ;而同一种菌的两类指纹的相似性一般均高于 80%。同一种菌的指纹聚类分析如表 2 所示。如 4 种来源的 21 株 *L. brevis* 至少被分成三块 ,每一块的聚类相似性都在 83% 以上 ,共产生 12 种不同的指纹 ,另外 ,*L. brevis* S1 和 *L. brevis* SB13 没有被聚类在一起 ,这可能与 *L. brevis* 的基因多样性有关^[5]。BOXA1R 指纹聚类 *L. buchneri* 和 (GTG)₃ 指纹聚类 *L. plantarum* 的效果都不好 ,这方面需要进一步研究。而其它同属于一种的菌株均被归类在一块 ,另外片球菌的 BOXA1R 指纹数量都在 10 条以下。

Lia Rossetti 验证乳制品中分离的上千株菌的 M13-RAPD 指纹数据库时表明当指纹的相似系数在 80% 以上时可以认为是同一种菌^[8]。G. Rasschaert 认为同一株菌的指纹的相似系数变化可以控制在一定范围^[9]。所以根据已有菌株的指纹聚类分析 ,提出快速鉴定菌种的指纹相似系数阈值。即若未知菌的指纹与数据库中某一株指纹最相近 ,且其相似性系数在某个值以上就可以确认该未知菌属于指纹对应的菌种 ,则就把这个值定义为该菌种的相似系数阈值 (similarity coefficient cut-off , SCC) ,可见 SCC 是统计大量菌种的相似性和总结鉴定实践得出的一个经

验值。在现有的实验规模 ,还无法准确得出菌种的相似系数阈值 ,只能初步确定该值。如 *L. brevis* 的 BOXA1R 指纹的相似系数阈值初步定为 83% ;*L. plantarum* 的为 81% ;*L. casei/paracasei* 的为 85%。*L. brevis* 的 (GTG)₃ 指纹的相似系数阈值为 83% , *L. buchneri* 的定为 85% ,*L. casei/paracasei* 为 84%。

为验证指纹数据库的快速鉴定效果 ,9 株未知菌 (Malt1、2、3、7、8、10 来自麦芽表面 ,PT2 来自豆腐乳 乳酸 1[#]、2[#] 来自酸奶)用于指纹鉴定。通过指纹聚类分析 ,麦芽中分离的 6 株菌的 BOXA1R 指纹与数据库中已知菌 *L. fermentum* G1 (来源于麦芽) 的指纹相似系数为 95.9% ,而 (GTG)₃ 指纹的相似系数为 96.6% ;PT2 与 *L. brevis* F18 的 (GTG)₃ 指纹的相似系数为 95.9%。通过 DNA 测序验证 ,这 7 株菌的指纹鉴定结果均正确。而酸奶中分离的两株菌的 BOXA1R 指纹的与数据库中指纹的最大的相似性系数为 65.8% ,据此推测它们为新的菌种 ;而其 (GTG)₃ 指纹与 *L. casei* S3 指纹最相似 ,且相似系数为 81.6% ,介于 *L. casei/paracasei* 的相似性系数阈值 84% 和 80% 之间 ,难以得出鉴定结果。通过测序表明这两株菌均属于 *L. delbrueckii* (德氏乳杆菌) ,是新的菌种。

表 2 比较 (GTG)₃ and BOXA1R 的指纹对菌株的聚类效果

Table 2 The result of comparing the cluster analysis of fingerprints obtained by (GTG)₃ and BOXA1R primer

Species	The number of the isolates	Primer	The number of subgroups	The minimum similarity coefficient of subgroup	The strains non-included	The number of characteristic fingerprints
<i>L. brevis</i>	21	(GTG) ₃	2	84.4% 87.9%	L2 ,	10
		BOX	3	86.9% 83.3% 89.3%	S1 ,SB13	12
<i>L. casei/paracasei</i>	11	(GTG) ₃	2	84.1% ,82.9%	JCM1134 , Cai16	9
		BOX	2	85.3% ,88.5%	JCM1134	10
<i>L. plantarum</i>	9	(GTG) ₃	/	/	/	/
		BOX	1	74.1%	/	6
<i>L. buchneri</i>	6	(GTG) ₃	1	76.1%	/	5
		BOX	/	/	/	/

以上两种指纹对啤酒污染菌的分类存在一定的缺陷 ,不能有效归类同一种菌 ,这可能是基于基因型分类和基于传统表型分类存在差异的缘故 ,如图 2 中聚类分析表明 *L. brevis* 的 16S rDNA 的最小相似系数为 40%。而这两种指纹在快速鉴定菌种中具有互补性 ,以上鉴定实践表明若能够提高数据库中标准指纹的容量 ,或针对某一个区域如一个啤酒厂建立污染菌的指纹数据库 ,则可以有效地对重复出现的污染菌进行快速鉴定。由于目前还不能快速地鉴定啤酒腐败菌^[11] ,所以菌株专一性的 rep-PCR 指

纹对重复出现的腐败菌的快速鉴定具有重要意义。采用这种方法 ,可以对检测培养基表面生长的单菌落或菌悬液中的细菌在 10 个小时以内进行准确鉴定。

Rep-PCR 快速鉴定技术的应用是多方面的 ,如应用于乳制品中分离菌株的快速鉴定^[12 2] ,对一些病原菌的重新聚类 ,并快速鉴定 ,在临床鉴定方面具有重要意义^[9]。但是影响 rep-PCR 快速鉴定的步骤较多 ,如不同批次电泳、染料的染色效果以及使用的不同仪器比如 PCR 仪、凝胶成像仪等均对指纹的重

复性造成影响,而且准确评价各种菌的相似系数阈值需要收集大量已知菌的指纹和更多的鉴定实践。目前应用于快速鉴定的指纹文库(包括 RAPD 指纹和 rep-PCR 指纹)都只是针对某一个区域或某一种发酵产品^[2,4,8],还没有一个完善的具有广泛应用价值的指纹文库。另外,从 EBC(欧洲酿酒协会)的报告表明目前还不能从酿造样品或成品啤酒中收集污染菌并直接用于 PCR 研究^[13],所以只能采取先培养后再进行快速鉴定的方法。可见将 rep-PCR 快速鉴定技术推广还需完善各种工作,统计各种因素造成的影响,增加指纹鉴定的可靠性,同时为增加鉴定能力和准确程度,可以结合菌种专一性 PCR 或多条引物同时扩增的鉴定技术。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, **37**(6): 1661–1669
- [2] Zamfir M, Vancanneyt M, Makras L *et al.* Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, **29**(6): 487–495
- [3] Lanoot B, Vancanneyt M, Dawyndt P *et al.* BOXA1R-PCR Fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeoauripureus*. *System Appl Microbiol*, 2004, **27**: 84–92
- [4] Svec P, Vancanneyt M, Seman M *et al.* Evaluation of (GTG)₃-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **247**: 59–63
- [5] Gevers D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, **205**: 31–36
- [6] Zheng FY(郑飞云), Jin JZ(金建中), Gu GX(顾国贤). The PCR primers design of beer spoilage lactic acid bacteria. *Liquor-Making Science and Technology*(酿酒), 2002, **29**(2): 44–47
- [7] Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 1994, **5**(1): 25–40
- [8] Rossetti L, Giraffa G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13 generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, **63**: 135–144
- [9] Rasschaert G, Houf K, Imberechts H *et al.* Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, **43**(8): 3615–3623
- [10] González Á, Hierro N, Poblet M *et al.* Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, **102**: 295–304
- [11] Fujii 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 collinoides* and *Lactobacillus coryniformis*. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, **98**: 1209–1220
- [12] Ouadghiri M, Amar M, Vancanneyt M *et al.* Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*, 2005, **251**: 267–271
- [13] Brandl DA. Demonstration of PCR based methods in Brewery quality control. EBC BREWING SCIENCE GROUP-Microbial Contaminants Subgroup. Hartwall Brewery, Lahti, Finland, 2004