DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251024001
引用格式: 季小荣, 郑晓茜, 刘钦钰. 双重实时荧光聚合酶链式反应技术检测非活菌型发酵乳中乳酸菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(5): 264–270.
JI XR, ZHENG XQ, LIU QY. Detection of lactic acid bacteria in non-viable fermented milk by duplex real-time fluorescent polymerase chain reaction technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(5): 264–270. (in Chinese with English abstract).

双重实时荧光聚合酶链式反应技术检测非活菌型发酵乳中乳酸菌

季小荣*, 郑晓茜, 刘钦钰

(江苏省产品质量监督检验研究院, 南京 210007)

摘 要: 目的 建立双重实时荧光聚合酶链式反应(real-time fluorescent polymerase chain reaction, RT-PCR)方法检测非活菌型发酵乳中唾液链球菌亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种的分析方法。**方法** 优化双重 RT-PCR 法反应体系中两个目标引物探针的比例、引物探针的浓度、Mg^{2+}的浓度以及反应程序中退火温度, 验证该方法的特异性和重复性, 最后对市场上购买的实际样本进行目标菌的检测。**结果** 20 μL 反应体系中两个目标引物探针的比例为 1:1、上下游引物(10 μmol/L)各 0.30 μL、探针(10 μmol/L)各 0.150 μL、Mg^{2+}的浓度为 3.0 mmol/L 以及退火温度为 60 ℃扩增效果较好, 24 批次市场上购买的实际样本均检出唾液链球菌亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种。**结论** 本研究建立的方法可快速、准确检测出非活菌型发酵乳中是否含有唾液链球菌亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种, 为食品真实性监管提供有效的技术支撑。

关键词: 非活菌型发酵乳; 双重实时荧光聚合酶链式反应; 乳酸菌

Detection of lactic acid bacteria in non-viable fermented milk by duplex real-time fluorescent polymerase chain reaction technology

JI Xiao-Rong*, ZHENG Xiao-Qian, LIU Qin-Yu

(*Jiangsu Product Quality Testing and Inspection Institute*, *Nanjing* 210007, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a duplex real-time fluorescent polymerase chain reaction (RT-PCR) method for detecting *Streptococcus salivarius* subspecies and *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* in non-viable fermented milk. **Methods** The optimal reaction system of duplex RT-PCR was optimized by adjusting the ratio of 2 target primers/probes, primer/probe concentrations, Mg^{2+} concentration and annealing temperature. The specificity and reproducibility of the method were validated. Finally, the target bacteria were detected in the actual samples purchased from the market. **Results** Optimal amplification was achieved in a 20 μL reaction system containing primer-probes for both targets at a 1:1 ratio, 0.3 μL each of forward and reverse primers (10 μmol/L), 0.15 μL each of probes (10 μmol/L), 3 mmol/L Mg^{2+} and an annealing temperature of 60 ℃. Both *Streptococcus salivarius*

收稿日期: 2025-10-24
第一作者/*通信作者: 季小荣(1989—), 男, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物与基因检测。E-mail: 1051012397@qq.com

subspecies and *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* were detected in all 24 batches of commercial samples. **Conclusion** The established method enables rapid and accurate detection of *Streptococcus salivarius* subspecies and *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* in non-viable fermented milk, providing effective technical support for food authenticity supervision.

KEY WORDS: non-viable fermented milk; duplex real-time fluorescent polymerase chain reaction; lactic acid bacteria

0　引　言

发酵乳以生牛(羊)乳、食品工业用浓缩乳、乳粉中的一种或多种为原料, 经杀菌、发酵后制成的 pH 降低的产品[1–2]。发酵乳具有口味独特, 营养价值高等特点, 而且作为益生菌的载体, 具有调解肠胃、增强免疫力等保健功能[3–7]。但活菌型的发酵乳需要 2~8 ℃低温保存, 且保质期较短, 增加了运输和存储的成本及风险, 因此研究开发出了热处理的发酵乳[8]。

热处理的发酵乳即非活菌型发酵乳, 是活菌型发酵乳发酵后再经过巴氏杀菌热处理二次杀菌后形成的产品, 二次杀菌是为了杀死活性乳酸菌, 彻底防止在储存过程中的继续发酵, 这样可以在常温条件下保质期更长[9]。非活菌型发酵乳与活菌型发酵乳两者执行的产品质量标准均为 GB 19302—2025《食品安全国家标准 发酵乳》, 但由于非活菌型发酵乳经热处理后乳酸菌已失活以及检测标准的和检测技术研究的滞后, 该标准中对发酵后经热处理的产品不作要求。因此, 这类产品实际是否含有标签的配料表中标示的乳酸菌, 目前未能进行有效的监管。随着消费者与监管部门对产品真实性的重视程度日益提升, 为有效防范虚假标注、以次充好等乱象, 建立针对非活菌型发酵乳标签标示乳酸菌的快速、可靠检测方法, 具有重要的研究价值与实际应用前景。一方面, 明确非活菌型发酵乳标签中标示的乳酸菌是否真实存在, 填补现行国家标准在该类产品乳酸菌检测方法领域的空白, 推动相关产品质量标准的完善与细化; 另一方面, 既能够增强消费者信任, 也能为监管部门提供技术支撑, 从而规范市场行为, 促进行业健康发展。

通过对市场调研和查找相关文献, 一般非活菌型发酵乳发酵使用的乳酸菌是唾液链球菌亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种这两种[10]。根据传统的微生物检测方法, 只能检测活菌, 无法检测非活菌型的发酵乳的乳酸菌[11–12]。因此, 目前非活菌型发酵乳的乳酸菌相关研究较少。随着分子生物学检测技术的不断发展, 实时荧光聚合酶链式反应(real-time fluorescent polymerase chain reaction, RT-PCR)技术因其具有特异性强、重复性好、灵敏度高、检测时间短、无污染性、不受样品形态限制等特点, 被广泛用于食品中乳酸菌的检测[13–17]。由于非活菌型的发酵乳这类产品标签上标示的乳酸菌至少有两种, 单重实时荧光法存在检测效率偏低、针对性不强等问题。而多重 RT-PCR 技术是在 RT-PCR 技术基础上开发出一项检测技术, 可在同一反应体系中加入多个目标引物和探针同时扩增, 节省人力物力成本[18–19], 已成为检测领域越来越受重视的检测技术及研究对象。目前, 利用多重 RT-PCR 技术检测非活菌型发酵乳乳酸菌的相关研究较少。

因此, 本研究根据非活菌型发酵乳的特点, 拟采用双重 RT-PCR 检测技术, 同时检测产品标签上标示的唾液链球菌亚种与德氏乳杆菌保加利亚亚种, 突破传统检测方法只能检测活菌的局限, 提高检测效率, 针对食品标签的真实性进行快速检测, 为填补非活菌型发酵乳乳酸菌检测领域的监管盲区提供全新思路, 为食品真实性监管提供有效的技术支撑。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　标准菌株

唾液链球菌亚种(*Streptococcus salivarius* subspecies, FSCC225005)、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgarica*, GIM1.155)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*, GIM1.140)、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*, GIM1.207)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*, FSCC173018)菌株(广东环凯微生物有限公司)。

1.1.2　样　品

本次研究的样品为巴氏杀菌热处理发酵乳, 均从江苏省各地超市购买。

1.1.3　仪器与设备

PL2002 电子天平(精度 0.01 g, 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); GR85DH 高压灭菌锅[致微(厦门)仪器有限公司]; LRH-250F 生化培养箱(精度 0.1 ℃, 上海一恒科学仪器有限公司); AllegraX-30R 冷冻高速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司); 2000C 超微量分光光度计、QuanStudio7 RT-PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司); MagNAPure96 全自动核酸提取仪(瑞士罗氏集团)。

1.1.4　试　剂

溶菌酶(复合酶, 50 mg/mL)、蛋白酶 K(复合酶, 20 mg/mL)

[天根生化科技(北京)有限公司]; 2×PCR 反应预混液(2×, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 核酸提取或纯化试剂(3×192 次, 瑞士罗氏集团)。

1.1.5 引物与探针

引物探针序列参考标准 GB 4789.35—2023《食品安全国家标准 食品微生物检验 乳酸菌检验》, 引物与探针由上海生工合成, 具体序列见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 核酸提取

将样本用无菌水稀释 2 倍; 吸取 1 mL 样本稀释液加入 2 mL 离心管中离心, 12000 r/min, 5 min; 弃上清液, 然后加入 200 μL 溶菌酶, 37 ℃孵育 1 h; 加入 40 μL 蛋白酶 K, 56 ℃加热 2 h; 吸取 200 μL 上机, 后续提取工作由全自动核酸提取仪完成。提取完成后, 用超微量分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度。

1.2.2 RT-PCR 反应体系

总反应体系体积 20 μL: 2×PCR 预混液 10 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μL、探针(10 μmol/L)各 0.4 μL, 模板 DNA 1 μL, 灭菌去离子水补足至 20 μL。

1.2.3 RT-PCR 反应条件

50 ℃ 5 min, 95 ℃预变性 3 min; 94 ℃变性 5 s, 60 ℃退火延伸 40 s(同时收集荧光信号), 40 个循环。

1.2.4 结果判定

实验结果根据阈值循环数(cycle threshold, Ct)进行判定。Ct 值不超过 35, 且有典型扩增曲线, 则判定扩增序列检出; Ct 值介于 35~40, 且有典型扩增曲线, 则重复一次, 若再次扩增结果仍小于 40, 且有典型扩增曲线, 判定扩增序列检出, 再次扩增结果不低于 40, 判定扩增序列未检出; Ct 值不低于 40, 判定扩增序列未检出。

1.2.5 特异性

以唾液链球菌亚种、德氏乳杆菌保加利亚亚种作为阳性对照菌株, 以植物乳杆菌、婴儿双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌作为阴性对照菌株, 先分别使用一个阳性对照菌株, 进行验证引物探针的特异性, 然后使用混合阳性菌株, 进行验证引物探针的特异性。

1.2.6 双重反应体系优化

(1)两个目标引物探针的比例

反应体系中两个目标引物探针体积比例分别为 1:0.8、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2, 其余条件保持一致, 比较 Ct 值的大小, 研究优化最佳比例。

(2)引物探针的浓度

20 μL 反应体系中两个目标引物体积为 0.20、0.25、0.30、0.40 μL, 探针体积为 0.100、0.125、0.150、0.200 μL, 其余条件保持一致, 比较 Ct 值的大小, 研究优化最佳浓度。

(3) Mg^{2+}的浓度

反应体系中 Mg^{2+}的浓度分别为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mmoL, 其余条件保持一致, 比较 Ct 的大小, 研究优化 Mg^{2+}的浓度。

1.2.7 退火温度的优化

退火温度根据标准 GB 4789.35—2023 中的反应条件进行优化设计, 反应条件中退火温度分别设置为 58、60、62 ℃, 其余条件保持一致, 比较 Ct 值的大小, 研究优化退火温度。

1.2.8 重复性

随机一个阳性样本重复测试 16 次, Ct 值的标准偏差不高于 25%。

1.2.9 实际样本检测

从市场上购买了 24 批次非活菌型发酵乳样本, 涵盖了市场上常见品牌以及口味, 每个样本标签上均标示含有唾液链球菌亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种, 按照建立的实验方法进行检测。

1.3 数据处理

每个实验设置 3 个平行, 实验结果的 Ct 值平均值、标准偏差使用 QuanStudio7 RT-PCR 仪自带分析软件进行数据处理和分析。利用 WPS (2025 版)软件对实验结果进行表格绘制。

2 结果与分析

2.1 核酸提取结果

使用上述提取方法提取购买的 24 批次样本, DNA 质量浓度均大于 10 ng/μL, 最大质量浓度为 57.510 ng/μL, 只有 3 批次样本的 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间, 其余 A_{260}/A_{280} 比值小于 1.8。

表 1 目标引物与探针序列

Table 1 Target primer and probe sequences

菌种	引物序列(5'-3')	探针序列(5'-3')
德氏乳杆菌保加利亚亚种	ACTTTAGCCCATACCTGCGT	VIC-CCGGTTGCCCGTTTCCTGCGG-TAMRA
	GTAAATTCCAAGCCGCCCTT	
唾液链球菌亚种	GCCTGATTCTGGTGAGCAAG	FAM-TCCACTGCACCAGAGTCAATCAGCT-TAMRA
	CCGCAACTGAGTCAACAACA	

2.2　特异性结果

以唾液链球菌亚种作为阳性对照菌株, 检出目标菌唾液链球菌亚种, 且有扩增曲线典型, 未检出德氏乳杆菌保加利亚亚种; 以德氏乳杆菌保加利亚亚种作为阳性对照菌株, 检出目标菌德氏乳杆菌保加利亚亚种, 且有扩增曲线典型, 未检出唾液链球菌亚种; 以植物乳杆菌、婴儿双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌作为阴性对照, 无典型扩增曲线, 未检出唾液链球菌亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种。因此, 目标引物探针的特异性符合要求。

2.3　双重反应体系优化结果

2.3.1　两个目标引物探针的比例优化结果

为了减少双重 PCR 反应时不同目标引物探针相互干扰, 提高扩增效率, 反应体系中两个目标引物探针比例进行了优化, 具体检测结果见表 2, 结果表明不同目标引物探针均检出目标序列, 两个目标引物探针体积比例 1:1 时, 两者的各自 Ct 值最小, 同时两者之间的 Ct 值差值也是最小, 表明两个目标引物探针比例 1:1 时, 两者之间相互干扰减少, 扩增效果较好。

2.3.2　引物探针的浓度优化

20 μL 双重 PCR 反应体系中两个目标引物探针不同浓度的检测结果见表 3, 结果表明: 引物体积为 0.30 μL, 探针体积为 0.150 μL, 两个目标的各自 Ct 值最小, 同时两者之间的 Ct 值差值也是最小, 因此该引物探针浓度扩增效果较好。

2.3.3　Mg^{2+}的浓度优化

反应体系中不同 Mg^{2+}的浓度的检测结果见表 4, 反应体系中不同 Mg^{2+}的浓度的扩增曲线见图 1。Mg^{2+}的浓度过高或过低都会影响扩增效率, 结果表明: 反应体系中 Mg^{2+}的浓度为 3.0 mmol/L, 两个目标的各自 Ct 值最小, 同时两者之间的 Ct 值差值也是最小, 因此该 Mg^{2+}的浓度扩增效果较好。

2.3.4　退火温度的优化结果

不同退火温度为检测结果见表 5, 退火温度越高, 两者之间的 Ct 值差值越小, 退火温度 62 ℃时, 两者之间的 Ct 值差值最小,但两个目标的各自 Ct 值偏大, 扩增减弱。退火温度 60 ℃时, 两个目标的各自 Ct 值最小, 扩增效果较好。

2.3.5　重复性结果

随机一个阳性样本重复测试 16 次, 唾液链球菌亚种 Ct 值的平均值为 16.428, 标准偏差为 10.3%, 德氏乳杆菌保加利亚亚种 Ct 值的平均值为 29.049, 标准偏差为 22.5%。满足重复性标准偏差不高于 25%的要求, 该实验方法重复性良好。

2.3.6　实际样本检测结果

市场上随机购买的 24 批次样本, 按照建立的实验方法进行检测, 24 批次样本均检出唾液链球菌亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种, 具体检测结果见表 6。

表 2　反应体系中两个目标引物探针各比例检测结果

Table 2　Detection results of the ratio of a total of 2 target primers and probes in the reaction system

分组	两个目标引物探针的比例				
	1:08	1:01	01:01.2	01:01.5	1:02
唾液链球菌亚种(Ct 值)	16.131	15.763	15.841	16.167	16.502
德氏乳杆菌保加利亚亚种(Ct 值)	25.025	23.902	24.814	24.319	24.963

表 3　20 μL 双重 RT-PCR 反应体系中两个目标引物探针不同浓度的检测结果

Table 3　Detection results of a total of 2 target primers and probes at different concentrations in a 20 μL duplex RT-PCR reaction system

分组	不同条件			
引物体积/μL	0.20	0.25	0.30	0.40
探针体积/μL	0.100	0.125	0.150	0.200
唾液链球菌亚种(Ct 值)	16.634	16.654	16.612	16.527
德氏乳杆菌保加利亚亚种(Ct 值)	27.306	25.572	25.468	25.889

表 4　反应体系中不同 Mg^{2+}的浓度的检测结果

Table 4　Detection results of Mg^{2+} concentrations in the reaction system

分组	Mg^{2+}的浓度				
	2.0 mmol/L	2.5 mmol/L	3.0 mmol/L	3.5 mmol/L	4.0 mmol/L
唾液链球菌亚种(Ct 值)	16.634	16.227	16.200	16.172	16.139
德氏乳杆菌保加利亚亚种(Ct 值)	27.306	26.066	25.773	25.906	25.814

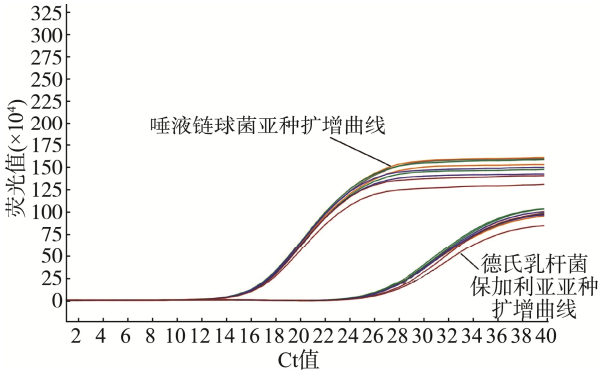


图 1 反应体系中不同 Mg^{2+}的浓度的扩增曲线

Fig.1 Amplification curves of different concentrations of Mg^{2+} in the reaction system

表 5 不同退火温度检测结果

Table 5 Detection results at different annealing temperatures

分组	退火温度		
	58 ℃	60 ℃	62 ℃
唾液链球菌亚种(Ct 值)	16.778	15.977	17.630
德氏乳杆菌保加利亚亚种(Ct 值)	26.566	25.036	26.462

样本的前处理和 DNA 提取是本研究的检测方法至关重要的第一步[20], 直接关系到后续实验成功与否。一方面, 非活菌型发酵乳中的乳酸菌都是死菌, 无法使用传统微生物方法进行增菌分离纯化后再提取; 另一方面, 发酵乳的蛋白、糖、脂肪等含量较高, 这些作为抑制剂会影响 DNA 的提取效果, 增加提取难度[21−22], 因此本研究先对样本进行前处理, 然后将磁珠法提取试剂盒和全自动核酸提取仪相结合, 最后使用全自动核酸提取仪进行直接提取非活菌型发酵乳中乳酸菌 DNA。本研究先对样本进行了 2 倍稀释, 降低样本中蛋白、糖、脂肪等这些抑制剂的干扰; 加入蛋白酶 K, 去除样本中蛋白质等杂质[23]; 加入溶菌酶, 有利于乳酸菌的裂解[24−26]。最后将前处理好的样本液使用全自动核酸提取仪提取, 1 h 可完成对 96 个样本的提取, 大批量样本检测时, 能够减少人员操作, 提高工作效率, 减少实验误差[26−29]。使用上述提取方法提取购买的 24 批次样本, DNA 浓度均满足要求, 但大部分样本的 DNA 提取纯度并不理想, A_{260}/A_{280} 比值小于 1.8, 表明含有蛋白质等杂质的污染[30]。

为了降低两个目标引物探针之间的相互干扰, 提高扩增效率, 本研究对反应体系中两个目标引物探针的比例、引物探针的浓度、Mg^{2+}的浓度以及反应程序中退火温度进行了优化, 确定了最佳反应体系为: 总反应体系体积 20 μL: 2×PCR 预混液 10 μL, Mg^{2+} (20 mmoL) 3 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.3 μL、探针(10 μmol/L)各 0.15 μL, 模板 DNA 1 μL, 灭菌去离子水补足至 20 μL, 最佳反应程序为: 50 ℃、5 min, 95 ℃预变性 3 min; 94 ℃变性 5 s, 60 ℃退火延伸 40 s(同时收集荧光信号), 40 个循环。为了保证实验方法可靠性, 提高检测的准确率, 本研究还对该检测方法的特异性和重复性进行了方法验证, 该方法的特异性和重复性均符合要求。

最后从市场上随机购买的 24 批次样本, 按照建立的实验方法进行检测, 24 批次样本均检出唾液链球菌亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种, 均与样本标签标示的保持一致。从实验数据上初步分析, 唾液链球菌亚种的 Ct 值均小于德氏乳杆菌保加利亚亚种的 Ct 值, 两者 Ct 值的大小关系是否与添加的菌量多少有关, 还有待进一步研究。

表 6 实际样本检测结果

Table 6 Results of actual sample test

分组	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
唾液链球菌亚种(Ct 值)	20.250±0.189	21.303±0.215	22.555±0.160	21.517±0.234	21.819±0.059	21.705±0.187	20.834±0.197	22.112±0.098	20.539±0.029	22.476±0.158	20.973±0.131	22.263±0.230
德氏乳杆菌保加利亚亚种(Ct 值)	24.996±0.039	26.157±0.204	26.294±0.151	26.706±0.197	26.934±0.063	28.886±0.011	27.355±0.228	30.389±0.219	29.672±0.239	31.669±0.176	31.259±0.060	36.789±0.237
分组	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
唾液链球菌亚种(Ct 值)	22.111±0.183	24.566±0.032	22.656±0.210	21.420±0.162	19.886±0.249	20.011±0.109	22.987±0.217	21.905±0.017	21.421±0.247	20.379±0.014	22.573±0.014	22.621±0.029
德氏乳杆菌保加利亚亚种(Ct 值)	35.623±0.129	33.940±0.166	29.890±0.006	26.502±0.151	28.773±0.227	32.422±0.183	31.282±0.008	21.421±0.106	32.185±0.185	29.416±0.162	37.013±0.123	28.224±0.101

注: 1~24 为样品编号。

3 结论与讨论

本研究针对非活菌型发酵乳中乳酸菌无法传统微生物培养法检测的技术痛点, 以产品配料表中标示的唾液链球菌亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种的特异性基因序列为靶点设计引物探针序列, 通过全自动核酸提取仪直接提取

样本中乳酸菌 DNA, 优化构了建双重 RT-PCR 的反应体系, 具有良好的特异性和重复性, 实现了两个目标菌的同步检测, 提高了检测效率。本研究方法适用于快速检测非活菌型发酵乳(巴氏杀菌热处理发酵乳)中的唾液链球菌亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种, 鉴别产品标签的真实性。基于现有的研究, 该检测方法还存在一些不足之处, 需要进一步优化改进: (1)优化 DNA 提取方法。乳酸菌 DNA 的提取纯度未达到要求, 需要进一步研究如何去除 DNA 样本中蛋白质等杂质, 提高提取 DNA 的纯度以及提取方法的稳定性, 评估不同纯度 DNA 样本对本方法检测灵敏度是否存在影响, 验证本方法可接受的 DNA 纯度范围, 使用内参基因验证 DNA 提取液里是否存在抑制剂的影响; (2)开发定量检测方法。本研究只对非活菌型发酵乳中的唾液链球菌亚种和德氏乳杆菌保加利亚亚种进行定性检测, 但产品标签上不仅标示了乳酸菌的具体名称, 还标示了乳酸菌的含量, 因此还需实现目标乳酸菌的精准量化, 防范标签虚假标注; (3)扩大适用范围。市面含有非活菌型乳酸菌的产品种类越来越多, 不同产品标签上标示的乳酸菌的种类也不相同, 因此还需扩大该检测方法的适用范围以及增加检测乳酸菌的种类。

参考文献

[1] 常旭龙, 周青霞, 马文聪, 等. 不同发酵剂发酵酸奶的风味及理化特性的研究[J]. 食品工业科技, 2025, 46(8): 263–271.
CHANG XL, ZHOU QX, MA WC, *et al*. Research on the flavor and physicochemical characteristics of yogurt fermented by different starter cultures [J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(8): 263−271.

[2] 唐凯伟, 黄晓英, 易宇文, 等. 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌单菌发酵与复配发酵对酸奶品质的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 127–132.
TANG KW, HUANG XY, YI YW, *et al*. Effects of fermentation with single and co-culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on the quality of yogurt [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(23): 127–132.

[3] 杨新尧, 康志远. 后热处理工艺对酸奶贮藏过程中后酸化控制的影响[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(8): 58–64.
YANG XY, KANG ZY. Effects processus post-caloris curationis in post-acidificationis potestate in yogurt storage [J]. China Dairy Industry, 2019, 47(8): 58–64.

[4] 刘玉佳, 张玉双, 刘宗儒, 等. 保加利亚乳杆菌发酵乳中奶酪味香气的关键风味成分研究[J]. 食品与发酵工业, 2026, 52(1): 360–365.
LIU YJ, ZHANG YS, LIU ZR, *et al*. Research on key flavor components of cheesy aroma in fermen-ted milk produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. Bulgaricus [J]. Food and Fermentation Industries, 2026, 52(1): 360–365.

[5] 顾晨荣, 俞漪, 张娜娜, 等. 荧光定量 PCR 方法检测杀菌型乳酸菌产品中的耐药基因[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(17): 5927–5932.
GU CR, YU Y, ZHANG NN, *et al*. Detectio medicamentorum resistentiae genes in bactericidal acido lactico bacteria productorum per fluorescence quantitatis PCR methodum [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(17): 5927–5932.

[6] 何彬彬, 郜佳慧, 卢纹慧, 等. 嗜热链球菌半乳糖突变株的选育及其发酵特性[J]. 中国食品学报, 2025, 25(1): 26–38.
HE BB, TAI JH, LU WH, *et al*. Generatio et fermentatio notarum mutant galactosae stractis *Streptococcus thermophilus* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2025, 25(1): 26–38.

[7] 吴阳, 韩文静, 仪垂江, 等. 益生菌发酵乳的研究进展[J]. 乳品与人类, 2024(2): 31–37.
WU Y, HAN WJ, YI CJ, *et al*. Investigatio progressus lactis probiotici fermentati [J]. Dairy and Humankind, 2024(2): 31–37.

[8] 李青玥, 李晓霞, 王然, 等. 不同热处理条件对副干酪乳酪杆菌 K56 发酵乳质构和风味物质变化的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(9): 12–22.
LI QY, LI XX, WANG R, *et al*. Influence of varying heat treatment conditions on texture and flavor compound profiles in fermented milk produced by *La*C*ticaseibacillus paracasei* K56 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(9): 12–22.

[9] 陈尔凝, 洪云鹤, 洪甜, 等. 常温酸乳制品抑制金黄色葡萄球菌生长作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(24): 232–238.
CHEN ERN, HONG YH, HONG T, *et al*. Investigatio de inhibitione incrementi *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(24): 232–238.

[10] 户行宇, 姚梦柯, 孙婷, 等. 常温酸奶发酵剂产胞外多糖对 DSS 诱导肠炎的改善作用[J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 378–387.
HU XY, YAO MK, SUN T, *et al*. Emendatio effectus extracellularum polysaccharides producti a cubiculi temperatura yogurt initiator in DSS-inducta enteritis [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44 (12): 378–387.

[11] 周帅康, 胡连霞, 王孟阳, 等. 基于实时荧光定量环介导等温扩增技术快速检测发酵乳中嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌[J]. 乳业科学与技术, 2024, 47(3): 9–15.
ZHOU SK, HU LX, WANG MY, *et al*. Celeri deprehensio *Streptococcus thermophilus* et *La*C*tobacillus bulgaricus* in lac fermentato secundum real-time fluorescence quantitatis anulus mediatus amplificationis isothermal technologiae [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2024, 47(3): 9–15.

[12] 俞漪, 顾晨荣, 张娜娜, 等. 定量 PCR 技术检测杀菌型产品中乳酸菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(13): 4507–4513.
YU Y, GU CR, ZHANG NN, *et al*. Detection of *Lactobacillus* in bactericidal products by quantitative PCR [J]. Journal of Food Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(13): 4507–4513.

[13] 赵文静, 李妍, 高鹏飞. 实时荧光定量 PCR 技术在乳酸菌定量检测中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 433–437.
ZHANG WJ, LI Y, GAO PF. Application of real-time fluorescent quantitative PCR in quantitative detection of lactic acid bacteria [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2009, 28(4): 433–437.

[14] 赵磊, 刘洋, 凌李维, 等. 发酵乳中活性益生菌三重 PCR 定量检测方法的建立[J]. 中国乳品工业, 2025, 53(1): 73–80.
ZHAO L, LIU Y, LING LW, *et al*. Establishment of a triple PCR quantitative detection method for active probiotics in fermented milk [J]. China Dairy Industry, 2025, 53(1): 73–80.

[15] 覃璐琪, 梁晓琳, 潘海博, 等. 采用实时荧光定量 PCR 法同时定性定量检测发酵乳中多种益生菌[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(15): 238–244.
TAN LQ, LIANG XL, PAN HB, *et al*. Real-time quantitative PCR for simultaneous qualitative and quantitative detection of multiple probiotics in fermented milk [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(15): 238–244.

[16] 汪华, 左靖文, 杨学军, 等. 三重荧光 PCR 检测沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏菌 O157: H7[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(10): 4179–4187.
WANG H, ZUO JW, YANG XJ, *et al*. Triple fluorescent PCR detection of *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(10): 4179–4187.

[17] 杨明阳, 田建军, 赵丽华, 等. 基于 RT-PCR 与平板计数法对比分析发酵香肠发酵过程中的乳酸菌数[J]. 中国食品学报, 2020, 20(11): 265–272.
YANG MY, TIAN JJ, ZHAO LH, *et al*. Comparative analysis of *Lactic acid bacteria* counts in fermented sausage using RT-PCR and plate count method [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(11): 265–272.

[18] 解盈盈, 刘丽, 林永强, 等. 双重 TaqMan 探针实时荧光 PCR 法鉴别威灵仙和升麻[J]. 中药材, 2025, 48(5): 1113–1118.
JING YY, LIU L, LIN YQ, *et al*. Dual-Taqman probe real-time fluorescent PCR for differentiating clematis and cimicifuga [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2025, 48(5): 1113–1118.

[19] 林碧莲, 柯振华, 陈筱婷, 等. 多重实时荧光定量 PCR 快速检测婴儿奶粉中沙门氏菌、克罗诺杆菌和金黄色葡萄球菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(11): 4375–4381.
LIN BL, KE ZH, CHEN XT, *et al*. Rapid detection of *Salmonella*, *Cronobacter*, and *Staphylococcus aureus* in infant formula using multiplex real-time fluorescent quantitative PCR [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8(11): 4375–4381.

[20] 肖其胜, 杨捷琳, 丁卓平, 等. 五种 DNA 提取方法对酸奶及菌粉中益生菌 DNA 提取效果比较[J]. 食品工业科技, 2016(3): 307–311.
XIAO QS, YANG JL, DING ZP, *et al*. Comparative study on five DNA extraction methods for probiotic DNA in yogurt and powdered probiotics [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016(3): 307–311.

[21] BUNTHOF CJ, ABEE T. Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 2934–2942.

[22] 杨景博, 初鸿, 孙翠翠, 等. PCR 技术在乳品微生物检测中的应用[J]. 乳品与人类, 2023(3): 34–30.
YANG JB, CHU H, SUN CC, *et al*. Applicatio PCR technologiae in lacticiniis microbialis detectio [J]. Dairy and Humankind, 2023(3): 34–30.

[23] 吴松芳, 陆宜隽. 通过调节蛋白酶 K 消化时长优化 DNA 提取方法[J]. 生物化工, 2019, 5(6): 150–153.
WU SF, LU YJ. Optimizing DNA extraction methods by adjusting protease K digestion duration [J]. Biological Chemical Engineering, 2019, 5(6): 150–153.

[24] 刘娜, 王亚萍, 王学硕, 等. 九种核酸提取裂解剂对 PCR 扩增效率影响研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(6): 843–848.
LIU N, WANG YP, WANG XS, *et al*. Study on the effects of nine nucleic acid extraction lysis agents on PCR amplification efficiency [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(6): 843–848.

[25] 刘红娟, 贡汉生, 孟祥晨. 乳酸菌质粒 DNA 高效快速提取方法的建立[J]. 食品工业科技, 2008(9): 115–117.
LIU HJ, GONG HS, MENG XC. Development of an efficient and rapid plasmid DNA extraction method for lactic acid bacteria [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008(9): 115–117.

[26] 刘艳容, 舒永红, 杨佳玮, 等. 食品中乳酸菌定量检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 358–365.
LIU YR, SHU YH, YANG JW, *et al*. Advances in quantitative detection methods for lactic acid bacteria in food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 358–365.

[27] 耿帜, 徐远东, 包一熙, 等. 4 种全自动核酸提取系统对新型冠状病毒假病毒提取效果的比较[J]. 临床血液学杂志, 2021, 34(10): 685–688.
GENG Z, XU YD, BAO YX, *et al*. Comparative study on the extraction efficiency of SARS-CoV-2 pseudoviruses by four fully automated nucleic acid extraction systems [J]. Journal of Clinical Hematology, 2021, 34(10): 685–688.

[28] 柳梦思, 时国强, 卢鑫, 等. 基于全自动核酸提取的荧光定量 PCR 鉴别羊肉制品的真伪[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(10): 3148–3155.
LIU MS, SHI GQ, LU X, *et al*. Authenticity identification of lamb products using fully automated fluorescent quantitative PCR for nucleic acid extraction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(10): 3148–3155.

[29] 沙燕华, 黄宪章, 黄小亭, 等. 4 种全自动核酸提取仪提取全血 DNA 效率的比较[J]. 国际医药卫生导报, 2019, 25(15): 2487–2490.
SHA YH, HUANG XZ, HUANG XT, *et al*. Comparison of efficiency of whole blood DNA extraction by four fully automatic nucleic acid extraction systems [J]. International Medicine and Health Guidance News, 2019, 25(15): 2487–2490.

[30] 梁美丹, 肖剑, 陈楷, 等. 磁珠法提取植物蛋白饮料 DNA[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(13): 5363–5368.
LIANG MD, XIAO J, CHEN K, *et al*. Extraction of plant protein beverages DNA by magnetic beads [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(13): 5363–5368.

(责任编辑: 冯东慧 蔡世佳)