

牛乳中嗜冷菌危害及其检测方法研究进展

朱萍, 李楠, 任婧*

(光明乳业股份有限公司研究院, 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436)

摘要: 虽然低温保藏及冷链技术限制了牛乳中微生物的繁殖与代谢, 但是在低温环境中恰恰非常适合嗜冷菌的生长代谢, 并影响牛奶质量。生产中通常用巴氏杀菌和超高温灭菌来杀灭牛奶中的嗜冷菌, 却无法消除由嗜冷菌所分泌的较高的耐热性的脂肪酶和蛋白酶, 进一步影响乳及乳制品风味质地。因此快速检测牛乳中的嗜冷菌, 对于控制生牛乳中嗜冷菌繁殖、提高乳制品产品质量、延长货架期等都具有重要的现实意义。本文主要总结与讨论了牛乳中嗜冷菌的危害以及几种常见的对原料奶中嗜冷菌快速检测的方法, 包括直接荧光过滤技术、电阻抗法、酶联免疫吸附法、流式细胞计数法、氨肽酶法、聚合酶链反应结合酶联免疫吸附法, 并将它们在工业应用上的优缺点进行了比较, 并对此领域的技术发展方向给予展望。

关键词: 嗜冷菌; 原料乳; 快速检测; 危害

Advancement on detection methods and hazard of psychrophilic bacteria in milk

ZHU Ping, LI Nan, REN Jing*

(State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Dairy Research Institute, Bright Dairy and Food Co., Ltd., Shanghai 200436, China)

ABSTRACT: The techniques of cryopreservation and cold chain limit the microbial reproduction and metabolism in milk. However, a low temperature environment is very suitable for the growth and metabolism of psychrophilic bacteria. Pasteurized and ultra high temperature sterilization is usually used to kill *psychrophile*, but they are unable to remove the heat-resistant lipase and protease produced by the *psychrophile*, finally to affect the flavor and texture of dairy products. Therefore, rapid detection of milk *psychrophile* in raw milk is important for microbial control, quality improvement and shelf-life extending. This paper summarizes and discusses the hazards of *psychrophile* in milk, as well as several common rapid detection methods for *psychrophile* in raw milk. These methods include direct fluorescence filtering technology, electrical impedance method, enzyme-linked immunosorbent assay, flow cytometry, aminopeptidase enzyme, and PCR-ELISA method. The advantages and disadvantages in industrial application are also compared, and the development directions of those techniques in this field are discussed.

KEY WORDS: psychrophilic bacteria; raw milk; rapid detection; hazard

基金项目: 科技部“十二五”国家科技支撑计划(2012BAD12B08, 2012BAK17B14)

Fund: Supported by “The Twelfth Five” National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2012BAD12B08, 2012BAK17B14)

*通讯作者: 任婧, 高级工程师, 主要研究方向为乳品安全及微生物分子生物学。Email: renjing@brightdairy.com

*Corresponding author: REN Jing, Senior Engineer, Dairy Research Institute, Bright Dairy & Food Co., Ltd, Bldg 2, No.1518, West Jiangchang Road, Shanghai 200436, China. Email: renjing@brightdairy.com

1 引言

20 世纪 80 年代初, 开发奶源和保证供给是我国乳品行业的主要任务; 到 90 年代主要需要解决的问题是原料乳的掺假; 90 年代中期开始, 对原料乳的新鲜度、细菌数含量提出了更高的要求。而进入 21 世纪, 在对生活水平要求越来越高的今天, 原料乳的安全卫生问题越来越受到关注。作为影响乳制品保质期的最主要因素, 原料乳中嗜冷菌的污染可谓是重中之重, 因此对嗜冷菌的检测研究显得尤为重要。

嗜冷菌是一类菌的总称, 这类菌一般是在 $0^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ 之间最适宜生长, 由于这个温度范围与其他菌的最适生长温度范围相比要低很多, 故此得名嗜冷菌。嗜冷菌主要包括两类微生物。一类是专性嗜冷菌 (*Psychrophiles*), 另一类为兼性嗜冷菌 (*Psychrotrophics*) 又名耐冷菌^[1]。其中专性嗜冷菌最高生长温度不超过 20°C , 最适生长温度为 15°C 或者更低, 在 0°C 依然可以生长繁殖。而兼性嗜冷菌的最高生长温度高于 20°C , 最适生长温度高于 15°C , $0^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 也能生长繁殖, 适应的温度范围更广, 在环境中存在更为广泛, 食品中的腐败菌大部分为兼性嗜冷菌^[2,3]。嗜冷菌种类繁多, 在已知的嗜冷菌中, 细菌是数量和种类最多的一类, 涉及 30 多个属, 其中属于革兰氏阴性的假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和革兰氏阳性的杆菌属 (*Bacillus*) 较多。这些嗜冷菌广泛地分布于各种低温环境中。除细菌外, 在寒冷地区也发现有放线菌、霉菌、酵母和低温藻类^[4]。

2 牛乳中主要的嗜冷菌及嗜冷菌的危害

嗜冷菌广泛存在牛乳的外部环境中, 如: 土壤、灰尘、空气、水、草料、粪便中等, 而牛体乳房部位、挤奶设备、管道、容器内以及挤奶现场环境中的嗜冷菌最有可能进入牛奶中。

2.1 牛乳中的嗜冷菌

牛乳中的嗜冷菌中最常见的是假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 特别是荧光假单胞菌 (*Ps.fluorescens*)。除此之外还存在有产碱杆菌属 (*Alcaligenes*), 色杆菌属 (*Chromobacterium*), 黄杆菌属 (*Flavobacterium*), 芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 梭菌属 (*Clostridium*), 棒状杆菌属 (*Corynebacterium*), 链球菌属 (*Streptococcus*), 乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和微球

菌属 (*Microbacterium*) 等^[5,6]。在假单胞菌中, 部分假单胞菌具有强力分解脂肪和蛋白质的能力, 可将原料奶中蛋白分解成蛋白胨, 把脂肪分解从而产生脂肪哈败味。产碱杆菌, 其本身不能分解原料奶中的糖类产酸, 但其能产生灰黄色、棕黄色的色素, 使得原料奶中所含的有机盐分解成碳酸盐, 从而使牛乳转变为碱性, 并导致乳品产生黏性变质^[7]。

2.2 嗜冷菌的危害

微生物中嗜冷菌的污染是影响乳产品保质期的最主要因素。作为冷藏原料奶中生长的优势菌群, 嗜冷菌在原料奶没有及时冷却、冷却温度不达要求或贮存时间过长时, 就会大量繁殖, 并产生耐热水解酶, 如蛋白质分解酶和脂肪分解酶, 这些水解酶能破坏牛乳中的主要成分、脂肪、蛋白质和卵磷脂^[8]。嗜冷菌胞外蛋白酶耐热的机制在于经过高温处理后, 未被破坏的处于非折叠状态的蛋白酶分子 (无活性) 重新折叠成有活性的天然构象^[9]。因此该类酶能够耐受巴氏杀菌 ($72^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$) 和超高温 (UHT) ($120^{\circ}\text{C} \sim 150^{\circ}\text{C}/0.5 \sim 8.0\text{ s}$) 灭菌工艺处理, 在低温贮存过程中逐渐被激活, 并在奶制品储藏过程中继续分解其中的脂肪和蛋白质, 导致产品出现苦味、结块、分层, 从而引起牛乳腐败变质。

总之, 嗜冷菌能破坏原料奶中成分, 主要是由于嗜冷菌活动产生能分解脂肪、蛋白质的耐热脂肪酶、蛋白酶。这些热稳定性胞外降解性酶类 (主要是脂肪酶、蛋白酶) 在巴氏杀菌消毒过程中基本不受影响, 甚至经过超高温杀菌处理后仍能保持部分活性, 最终, 蛋白酶水解乳蛋白带来例如苦味、异味、果味和酵母味^[10] 等非正常风味; 而脂肪酶水解牛乳脂肪的过程会释放出一些游离脂肪酸, 这些脂肪酸会造成牛乳制品腐臭、异味、碱味和苦味^[11]。由于游离脂肪酸增加, 乳产品风味将会出现如乳酪味、腐烂味、不洁味或酵母味等^[12] 不良风味。这些由嗜冷菌产生的脂肪酶、蛋白酶还会造成片式热交换器的淤塞, 造成清洗困难^[13]。

2.3 嗜冷菌的控制

在 Kumarsan 等^[14] 对牛乳在不同储藏温度下的腐败程度变化的研究实验中表明, 降低温度虽然能够有效减缓嗜冷菌生长速度、降低酶活, 但是一般适用于菌数 10^3 cfu/mL 的情况。Champagne 等^[15] 在实验中发现, 若将原料乳先在 $65^{\circ}\text{C} \sim 69^{\circ}\text{C}$ 下热处理 15 s ,

再进行巴氏杀菌,则能够使革兰氏阴性嗜冷菌的数目减少 77%~79%,但是,这种预处理对产芽孢的革兰氏阳性嗜冷菌没有作用。所以对嗜冷菌的控制不是简单冷、热处理,而是要将低温储藏、高温处理和离心除菌^[16]相结合,并且使用清洁卫生的生产设备,才能真正有效减少嗜冷菌的污染。

3 嗜冷菌的检测方法及其分析比较

嗜冷菌危害的严重性,更加突显出嗜冷菌检测方法的重要性。

3.1 检测方法

目前对于原料乳中嗜冷菌的检测方法有很多种,但这些方法在时间及针对性上都存在各自的缺陷^[17]。在上世纪 90 年代,对微生物快速、自动化检测的研究已经进入了蓬勃发展的阶段,那些基于微生物学、化学、生物化学、生物技术、免疫学技术、血清学技术的快速、自动化分析方法均可应用于食品中微生物的分离、前期检测、特性研究及计数^[18]。这其中大多数方法都适用于对奶制品的检测。

目前公认的方法主要有三类:一、平板检测及其改良方法;二、直接检测法;三、间接检测法。其中直接检测方法包含直接荧光过滤技术、流式细胞计数法、实时聚合酶链反应检测法、聚合酶链反应结合酶联免疫吸附法、荧光原位杂交探针法、时间/温度梯度凝胶电泳、双向电泳、ATP 生物发光法;间接检测方法包含测定游离脂肪酸、测定氨肽酶活性、鲎变形细胞溶解物、酶联免疫吸附法、电阻抗法、石英晶体微天平法^[19]。而以上各类检测方法中平板检测法、直接荧光过滤技术、电阻抗法、酶联免疫吸附法、流式细胞法、氨肽酶法以及 PCR-ELISA 法这七种属于比较常见的检测方法。

3.1.1 平板检测法

平板检测法是取样品稀释液接种至琼脂培养基,在 5℃~6.5℃恒温培养 10 天后计数^[20]。或者将样品在 21℃增菌培养后,采用选择性培养基在 21℃培养 25 h,然后将样品中 G 杆菌作为嗜冷菌污染的指标。平板检测法是比较常见的一种方法,但存在着很多缺陷。经过改进,在美国 3 M 公司的细菌总数测试纸片的支持下,纪振杰等^[21]利用标准平板计数法的原理,在 4℃下培养样品 10 d,使得平板检测操作更

简单,观察更方便。虽然平板计数法耗时比较长,但是计数结果比较准确,所以常常作为衡量各种快速检测方法相关性的标准值。

3.1.2 直接荧光过滤技术(direct epifluorescent filter technique, DEFT)

直接荧光过滤技术是将经胰蛋白酶和 Triton X-100 处理过的原料乳进行膜过滤,原料乳中的微生物就会被留在过滤器上面。然后对膜上的细菌进行吖啶橙染色,再置于紫外显微镜下进行观察。被染成绿色荧光的是死亡细胞,而呈现橘红色、橘灰色或者橘黄色荧光的则为存活下来的细胞。最后用仪器来进行计数处理^[22-24]。作为一种快速检测方法,直接荧光过滤技术相对于传统的培养计数检测有了较好的改进^[25]。该检测方法与平板检测法的相关性系数为 0.91~0.94。

DEFT 方法的优点在于系统使用简单,运用图像分析仪在紫外显微镜下观察计数,每小时处理的样本可以大于 100 个,检测数量较大^[26]。而且整个检测过程时间上相对于平板检测具有很大的优越性,检测结果可以在 1 小时内获得。这个方法在对原料乳中细菌的计数上得到了很好的应用^[27]。DEFT 方法的缺点在于对嗜冷菌没有特异性识别,检测出来的是冷藏原料乳中细菌的总数量,缺少针对性。而且当检测样品中细菌含量较少时,还需要对检测样品进行预培养处理来增加目标微生物的数量,从而提高检测结果的精确度。虽然检测时间很短,但是预培养所需要的时间比较长,一般要 24~48 h 或者更长,所以预培养会相对耗时一些。再者,该检测方法所需要的仪器比较昂贵,检测成本较高,在实际工业应用上较难开展。

3.1.3 电阻抗法(electrical impedance measurement)

电阻抗法是通过测量微生物代谢引起培养基的电特性变化来测定样品微生物含量的一种快速检测方法。在培养过程中,微生物生理代谢作用会激活培养基中的电活性物质。随着微生物增长,培养基中电活性分子和离子逐渐取代了电惰性分子,使其电导性增强,电阻抗降低。研究表明,电导率随时间的变化曲线与微生物生长曲线十分相似,当微生物的起始数量不同时,出现指数增长期的时间也不同,通过建立二者之间的关系,就能通过检测出培养基电特性变化推演出微生物的原始数量^[28]。起初电阻抗法被用于检测原料乳中的嗜冷菌数量和细菌总数

时, 得出的结果与平板计数法相关度很低^[29-31]。Firstenberg 等^[32]通过优化微生物的生长条件, 控制培养温度, 在测定原料奶中嗜冷菌数量和细菌总数时, 得到了电阻抗测定结果和标准平板计数结果之间很高的相关系数, 使电阻抗法在原料奶检测方面的应用步伐向前推进了一大步。目前该技术已经被开发成商用系统, 如 BACTOMETER 和 MALTHUS, 可以快速有效地报告出细菌总数或特定菌群数。该检测方法与平板检测法的相关性系数为 0.96。

电阻抗法的优点在于它是利用仪器来对样品进行测定, 检测时间比传统的标准平板计数法要缩短很多^[33], 从而大大减少人力的投入。由此看出, 电阻抗方法相对于平板计数检测法在工业应用上具有优越性。电阻抗法的缺点在于虽然相对于平板检测法, 电阻抗法所需时间缩短很多, 但是要是用于现代工业中检测大量待测原料奶样品, 10~21 h 的检测时间仍显较长。这样会使得电阻抗法在工业上的推广利用受到限制。

3.1.4 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

酶联免疫吸附法是一种通过让抗体与酶复合物结合, 然后通过显色来检测的方法, 简称 ELISA 法。这是基于酶反应的一种高灵敏度和高特异性的检测方法, 可以从复杂的样品体系中与目标反应物特异结合, 从而进行检测。该检测方法与平板检测法的相关性系数为 0.96^[34]。

酶联免疫吸附法的优点在于得到的结果与标准平板计数法相似, 而且它的灵敏度还很高^[35]。酶联免疫吸附法的缺点在于, 由于像牛奶中的酪蛋白和乳清蛋白会和目标微生物竞争与抗体结合, 此时会对样品带来干扰作用, 影响酶联免疫吸附法检测样品中的目标微生物。

3.1.5 流式细胞计数法(flow cytometry method, FCM)

流式细胞计数法是对悬浮于流体中的微小颗粒先进行染色, 然后使悬液单向流过高强度光源的焦点, 每个染色颗粒经过焦点时发出一束散射光或荧光, 光线经过一系列光电仪器收集、处理后进行计数、分析。区别于标准平板计数法中只对能在培养基中生长的活细胞计数, 该检测方法是对待测样品中所有的细菌进行计数, 所以该检测方法所得的结果在检测牛奶微生物质量方面更加具有代表性。该检测

方法与平板检测法的相关性系数为 0.91^[36]。

流式细胞计数法的优点在于: 第一它是对总体细胞进行计数, 包括活细胞和死细胞, 对死细胞的检测可以知道原来样品质量的情况^[37]。第二与标准的平板计数法相比, 当样品中待测菌数量很少时, 标准平板计数法不能将其检出, 而流式细胞计数法仍然可以检出, 由此看来流动血细胞法具有很高的灵敏度^[38,39]。所以流式细胞计数法对食品中的目标微生物的检测和计数可以提供快速、敏感、可靠的途径。流式细胞计数法缺点在于: 第一该法只能用于细菌总数的检测, 缺少针对性。第二该法的精度受到包括细菌种类、着色过程、浓缩过程、细菌的新陈代谢状况和检测过程中对细菌本身的伤害程度等在内的多重因素的影响。第三所需要的计数器价格很昂贵, 而且实验操作也很复杂, 对实验操作员的操作手法有很高的要求。

3.1.6 氨肽酶法

氨肽酶法是采用间接或者直接两种方法测定冷藏原料乳中革兰氏阴性嗜冷菌的氨肽酶活性, 建立酶活性与革兰氏阴性嗜冷菌菌落数之间的线性关系, 从而估算嗜冷菌数量的一种方法^[40]。因为在冷藏原料乳中主要的微生物类群就是革兰氏阴性嗜冷菌, 假单胞菌(*Pseudomonas* spp.) 占其中的绝大部分^[41]。大多数革兰氏阴性嗜冷菌细胞壁中含有氨肽酶, 这种氨肽酶可以与特定的底物反应, 即使细胞是完整的, 反应也会进行, 而且活性很高。同样的条件下, 革兰氏阳性菌裂解活性就比较低^[42]。该检测方法与平板检测法的相关性系数为 0.93~0.95。氨肽酶法的优点在于第一所需仪器一般实验室都具备, 如恒温槽、培养箱、离心机以及分光光度器, 所以成本较低利于推广运用。第二实验操作方法比较简便, 不需要特殊的技术, 所以对实验人员要求不是很高^[43]。第三此方法为显色反应, 当样品中微生物数量达到一定的范围时就可以显现出颜色, 一般为无色→淡黄色→深黄色^[44]。如果只是做一个简单的定性检测, 那么就不需要使用仪器, 通过眼睛观察反应后的颜色就可以得样品中微生物的大概数量, 这是其他检测方法所达不到的。若以欧盟对饮用奶的微生物质量的要求($< 10^5$ CFU/mL), 当反应出现黄色, 那么就可以直接拒绝这样的产品, 而不用进行复杂的分析。因而氨肽酶法可以在一个合理的时间内检测原料奶的质量。氨肽酶法的缺点在于第一当对样

品进行离心时,会引起原料奶的凝集成块,影响后续检测。第二因为嗜冷菌是由革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌组成的,而在相同的条件下革兰氏阳性细菌却不能裂解底物或只表现出很弱的裂解活性。所以这个方测得的是革兰氏阴性菌的数量,这样检测结果比样本中实际含有的嗜冷菌的数量要少,影响检测结果。

3.1.7 PCR-ELISA 法

PCR-ELISA 法是将 PCR 技术(聚合酶链式反应扩增技术)和 ELISA 技术(酶联免疫吸附技术)结合起来用于检测冷藏牛奶中细菌的数量。此法是以共价交联在 PCR 管壁上的寡核苷酸作为固相引物进行 PCR 扩增,PCR 产物通过杂交和凝胶电泳双重检测,结果通过酶标仪直接输出,无人为误差。该检测方法与平板检测法的相关性系数为 0.94^[45]。

PCR-ELISA 法优点在于其基于免疫学和基因技术方法提供一种互补的、创新的途径来检测食品中的微生物,这样不但缩短了分析的时间,而且仍然保持着很高的可靠性和灵敏度。这种检测方法操作简单、具有很高的灵敏度和特异性,是快速检测食品中微生物的一个重要方法^[46-49]。PCR-ELISA 法的缺点在于:第一跟 PCR 检测类似,死亡细胞会对检测结果产生较大干扰,因为死亡细胞会使其产生假阳性反应,无法确定样品中分离出来的 DNA 来源^[50]。第二 PCR 分析实验数据处理比较困难,而且需要使用的仪器价格比较昂贵,成本投入很高。第三在实验中提取所需要的 DNA 时,PCR 会受到培养基、DNA 准备液和样品中一些物质的抑制。这种抑制作用会使得 DNA 聚合酶变性、DNA 沉淀等^[51],而且想要从样品中移除这些抑制物是比较困难的,这是影响实验精确度的最主要因素。第四,从微生物中提取 DNA 或者 RNA 需要在实验室条件下才能操作,所以很难放到工业应用上。

3.2 方法比较

通常以一个快速检测方法与标准平板计数法之间的相关度来衡量这个检测方法的可行性。从表 1 中可以发现与标准平板检测计数相关度较高的是电阻抗法和 ELISA 法,而 DEFT、FCM、氨肽酶法、PCR-ELISA 法这四种方法与标准平板计数法的相关度都接近。检测时间和检测成本都是用来衡量该检测方法是否适用于工业生产,根据表格不难看出,DEFT 法的检测时间是最短的,而电阻抗法的检测时间最长,其余四种方法检测时间相差不大。从成本上来看,电阻抗法、FCM、PCR-ELISA 法这三种检测方法的成本都偏高,而成本较低的是 ELISA 法。综合检测时间和检测成本来看,最具优势的为氨肽酶法,不仅成本低而且检测时间短。

4 展望

嗜冷菌污染已然成为现代乳品加工过程中迫切需要解决的问题,也正是因为嗜冷菌污染的严重性,才使得对嗜冷菌的快速检测显得尤为重要。

目前,几种常用的快速检测方法在具有优势的同时也都存在着一定的劣势,还需要进一步研发改善。而一个好的快速检测方法,不但要仪器轻便、成本低廉、操作简单,而且还要有高的精确度、灵敏度、可靠性,这样才能在工业应用中开展实施。当下人们越来越关注食品安全卫生,所以对原料乳中嗜冷菌的快速检测,首先要能保证产品对消费者的安全性,再者还要能保证产品的营养和感官质量。原料乳中嗜冷菌快速检测方法在关注其可行性的同时还要注重环境友好性,因为这是一个长远发展的问题。当然提高奶站或牧场整体建设水平和工作人员的素质,对减少原料奶中嗜冷菌污染也是非常重要的因素。

表 1 各快速检测方法的比较
Table 1 The comparison of rapid detection method

检测方法	DEFT	电阻抗法	ELISA	FCM	氨肽酶法	PCR-ELISA
相关系数	0.91 ~ 0.94	0.96	0.96	0.91	0.93 ~ 0.95	0.94
检测时间	10 ~ 20 min	> 8 h	> 3 h	3 ~ 4 h	2.5 h	> 2.5 h
检测成本	低	高	较低	高	低	高

参考文献

- [1] 李广武. 低温生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998.
Li GW. Cryobiology[M]. Changsha: Science and Technology Press, 1998.
- [2] Ingram M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms [J]. *Ann Inst Pasteur Lille*, 1965, 16: 111–118.
- [3] Morita RY. Psychrophilic bacteria[J] *Bact Rev*, 1975, 39: 144–166.
- [4] 唐兵, 唐晓峰, 彭珍融. 嗜冷菌研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2002, 22(1): 51–53.
Tang B, Tang XF, Peng ZR. Advancement on psychrophilic bacteria [J]. *J Microbiol*, 2002, 22(1): 51–53.
- [5] Sorhaug T, Stepaniak L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects[J]. *Trends Food Sci Tech*, 1999, 8: 35–41.
- [6] Samagh BS Cunningham JD. Numerical taxonomy of the genus *Pseudomonas* from milk and milk Products [J]. *J Dairy Sci*, 1971, 55: 19–24.
- [7] 何光华, 吴石金, 康华阳, 等. 原料乳嗜冷菌的危害分析及控制[J]. *中国乳品工业*, 2006, 34(8): 33–36.
He GH, Wu SJ, Kang HY, *et al.* The hazard analysis and control of psychrotrophic bacteria in raw milk[J]. *China Dairy Ind*, 2006, 34(8): 33–36.
- [8] Fox P. Proteinases in dairy technology[J]. *Netherlands Milk and Dairy J*, 1981, 2: 35.
- [9] 于春宇, 孙彦琴, 余爱英, 等. 生乳中嗜冷菌的危害及其控制[J]. *河南畜牧兽医*, 2007, 28(1): 36–37.
Yu CY, Sun YQ, Yu AY, *et al.* Hazards and control raw milk psychrotrophic bacteria [J]. *Henan Anim Husbandry Vet*, 2007, 28(1): 36–37.
- [10] Ren T, Frank J, Christen G. Characterization of lipase of *Pseudomonas fluorescens* 27 based on fatty acid profiles [J]. *J Dairy Sci*, 1988, 71(6): 1432–8.
- [11] Stead D. Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses[J]. *J Dairy Res*, 1986, 53(3): 481–505.
- [12] 杜晓明, 潘涛轩, 赵娟. 乳中低温菌的来源、危害及其控制方法[J]. *中国乳业*, 2002, 11(5): 34–38.
Du XM, Fan CX, Zhao J. The sources, harm and control method of bacteria in milk hypothermia [J]. *China Dairy*, 2002, 11(5): 34–38.
- [13] 苏景辉, 于敏艳, 孟凡玉. 嗜冷菌对原料奶质量的影响及控制方法[J]. *食品与发酵科技*, 2011, 47(3): 100–102.
Su JH, Yu MY, Meng FY. The impact on the quality and control method of psychrophile in raw milk[J]. *Food Ferment Technol*, 2011, 47(3): 100–102.
- [14] Kumarsan G, Annalvilli R, Sivakumar K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of spoilage [J]. *J Appl Sci Res*, 2007, 3: 1383–1387.
- [15] Champagne CP, Laing RR, Roy D, *et al.* Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control [J]. *Crit Rev Food Sci Nut*, 1994, 34(1): 1–30.
- [16] Eneroth A, Ahrne S, Molin A, *et al.* Contamination of milk with Gram negative spoilage bacteria during filling of retail containers [J]. *Int J Food Microbiol*, 2000, 57: 99–106.
- [17] 胥伯强. 嗜冷菌对长货价期乳制品的影响[J]. *食品安全与检测*, 2003, 3: 50.
Xu BQ. Psychrophile impact on the prices of goods long period of dairy products [J]. *Food Safe Inspect*, 2003, 3: 50.
- [18] Fung DYC. Food microbiological analysis[M]. New York: Marcel Dekker, 1997.
- [19] 李琳, 冷凝, 杜明, 等. 嗜冷菌快速检测方法研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2013, 41(1): 25–31.
Li L, Leng N, Du M, *et al.* Research progress on rapid methods for detecting psychrophilic bacteria [J]. *China Dairy Ind*, 2013, 41(1): 25–31.
- [20] 郭本恒. 乳品微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
Guo BH. Dairy Microbiology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2001.
- [21] 纪振杰, 郭德军, 王欣. 原料乳中嗜冷菌数检测方法的比较[J]. *乳业科学与技术*, 2007, (3): 131–132.
Ji ZJ, Guo DJ, Wang X. Comparison of raw milk psychrotrophic bacteria detection method [J]. *Dairy Sci Technol*, 2007, (3): 131–132.
- [22] Pettipher GL. Review: the direct epifluorescent filter technique [J]. *J Food Tech*, 1986, 21(5): 535–541.
- [23] Graham L, Pettipher RM, Charles M, *et al.* Rapid membrane filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1980, 39(2): 423–429.
- [24] Ubaldina MR, Kroll RG. The direct epifluorescent filter technique (DEFT): increased selectivity, sensitivity and rapidity [J]. *J Appl Bacteriol*, 1985, 59: 493–499.
- [25] Couto JA, Hogg T. Evaluation of a commercial fluorochromic system for the rapid detection and estimation of wine lactic acid bacteria by DEFT [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1999, 28(1): 23–26.
- [26] Pettipher GL, Watts YB, Langford SA, *et al.* Preliminary evaluation of COBRA, an automated DEFT instrument, for the rapid enumeration of micro-organisms in cultures, raw milk, meat and fish [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1992, 14: 206–209.

- [27] Pettipher GL. The direct epifluorescent filter technique in rapid microbiological methods [M]. New York: Elsevier, 1989.
- [28] 周向华, 王衍彬, 叶兴乾, 等. 电阻抗法在食品微生物快速检测中的应用[J]. 粮油加工与食品机械, 2003, (10): 73-75.
Zhou HX, Wang YB, Ye XQ, *et al.* Application of electrical impedance method for rapid detection of microorganisms in food [J]. Oil Food Pro Mach, 2003, (10): 73-75.
- [29] Cady P, Hardy D, Martins S, *et al.* Automated impedance measurements for rapid screening of milk microbial content [J]. J Food Prot, 1977, 41(4): 277-282.
- [30] O'Connor FO. An impedance method for determination of bacteriological quality of raw milk [J]. Food Sci Tech, 1979, (3): 93-98.
- [31] Gnan S, Luedecke L. Impedance measurements in raw milk as an alternative to the standard plate count [J]. J Food Prot, 1982, 45(1): 4-10.
- [32] Firstenber-eden R, Tricarico MK. Impedimetric determination of total, mesophilic and psychrotrophic counts in raw milk [J]. J Food Sci, 1983, 48(6): 1750-1754.
- [33] Fontana M, Busiello S, Bisotti S, *et al.* Rapid enumeration of clostridial spores in raw milk samples using an impedimetric method [J]. J Rapid Meth Aut Mic, 2002, 10 (2): 107-116.
- [34] Gutierrez R, Gonzalez I, Gracia I, *et al.* Monoclonal antibodies and an indirect ELISA for detection of psychrotrophic bacteria in refrigerated milk [J]. J Food Prot, 1997, 60(1): 23-27.
- [35] Mansfield LP, Forsythe SJ. The detection of salmonella using a combined immunomagnetic separation and ELISA end-detection procedure [J]. Lett Appl Microbiol, 2000, 31(4): 279-283.
- [36] Thusitha SG, Paul VA, Duncana VA. flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(3): 1228-1232.
- [37] Holm C, Mathiasen T, Jespersen L. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk [J]. J Appl Microbiol, 2004, 97(5): 935-941.
- [38] Yamaguchi N, Ohba H, Nasu M. Simple detection of small amounts of pseudomonas cells in milk by using a microfluidic device [J]. Lett Appl Microbiol, 2006, 43(6): 631-636.
- [39] Flint S, Walker K, Waters B, *et al.* Description and validation of a rapid (1 h) flow cytometry test for enumerating thermophilic bacteria in milk powders [J]. J Appl Microbiol, 2007, 102(4): 909-915.
- [40] Susana M, Juan AO, Lorenzo DLH, *et al.* A rapid method for the estimation of the microbiological quality of refrigerated raw milk based on the aminopeptidase activity of Gram-negative bacteria [J]. Int Dairy J, 2005, 15(1): 79-84.
- [41] Manzan S, Ordonez JA, Delahoz L, *et al.* A rapid method for the estimation of the microbiological quality of refrigerated raw milk based on the aminopeptidase activity of gram-negative bacteria [J]. Int Dairy J, 2005, 15(1), 79-84
- [42] Cerny G. Method for a distinction of gram negative from gram positive bacteria [J]. European J Appl Microbiol, 1978, 3(3): 223-225
- [43] Manzan S, Ordonez JA, Delahoz L, *et al.* A rapid method for the estimation of the microbiological quality of refrigerated raw milk based on the aminopeptidase activity of gram-negative bacteria [J]. Int Dairy J, 2005, 15(1), 79-84.
- [44] Tomas L AL, Ordonez JA, De Fernando GG. The pnitroaniline test to assess the bacterial microbiota of raw ground meat aerobically stored [J]. Meat Sci, 2006, 72(2): 222-228.
- [45] Gutierrez R, Garcia T, Gonzalez I, *et al.* A quantitative PCR-ELISA for the rapid enumeration of bacteria in refrigerated raw milk [J]. J Appl Microbiol, 1997, 83(4): 518-523.
- [46] Daly P, Collier T, Doyle S. PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk [J]. Lett Appl Microbiol, 2002, 34(3): 222-226.
- [47] Sharpe AN. Developments in rapid methods for detection of agents of foodborne disease [J]. Food Res Int, 1994, 27(3): 237-243.
- [48] Fung DYC. What's needed in rapid detection of foodborn pathogens [J]. Food Technol, 1995, 49(6): 64-67.
- [49] Ingeborg H, Angelika L, Petra R, *et al.* Comparison of different approaches to quantify staphylococcus aureus cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese [J]. Appl Environ Microb, 2001, 67, 3122-3126.
- [50] Pa-Gunnar L, Hahn-Hagerdal B, Radstrom P. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens [J]. Trends Food Sci Tech, 1994, 5(12): 384-389.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



朱萍, 本科, 主要研究方向为食品质量与安全管理。
E-mail: zhuping2@brightdairy.com



任婧, 高级工程师, 主要研究方向为乳品安全及微生物分子生物学。
E-mail: renjing@brightdairy.com