

# 乳及乳制品中嗜冷菌的多样性及其 腐败危害研究进展

许文君<sup>1,2,3</sup>, 孟璐<sup>1,2</sup>, 郑楠<sup>1,2\*</sup>

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部奶及奶制品质量安全控制重点实验室, 北京 100193;
2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部奶产品质量安全风险评估实验室, 北京 100193;
3. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 青岛 266109)

**摘要:** 乳是一种营养丰富的物质, 同时也是微生物生长繁殖的理想培养基。生乳的质量是影响乳制品产业链的关键因素, 随着低温储存和冷链运输技术的发展, 生乳中大部分细菌的生长受到抑制, 但嗜冷菌的生长并未受到抑制, 并逐步成为生乳中的优势菌。生乳在冷藏运输或储存期间, 嗜冷菌依旧可以生长繁殖, 其分泌的蛋白酶和脂肪酶可耐高温, 经过巴氏杀菌或超高温灭菌处理后依旧保持活性, 因此, 了解嗜冷菌的多样性及其产生的酶对提高乳及乳制品质量、减少腐败和浪费具有重要作用。本文通过介绍乳及乳制品中嗜冷菌污染现状及腐败危害研究, 旨在为乳及乳制品行业的风险评估提供背景信息, 从源头控制嗜冷菌对生乳的浪费, 保证乳及乳制品的品质。

**关键词:** 生乳; 嗜冷菌; 污染; 蛋白酶; 脂肪酶

## Research progress on the diversity and spoilage of psychrophilic bacteria in milk and milk products

XU Wen-Jun<sup>1,2,3</sup>, MENG Lu<sup>1,2</sup>, ZHENG Nan<sup>1,2\*</sup>

1. Key Laboratory of Quality and Safety Control for Milk and Dairy Products of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Dairy Products of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**ABSTRACT:** Milk is a nutrient-rich substance and an ideal medium for the growth and reproduction of microorganisms. The quality of raw milk is a key factor affecting the dairy industry chain. With the development of low temperature storage and cold chain transportation technology, the growth of most bacteria in raw milk has been inhibited. However, the growth of psychrophilic bacteria are not inhibited, and gradually become the dominant bacteria in raw milk. During refrigerated transportation or storage, psychrophilic bacteria can still grow and reproduce. The

**基金项目:** 中国农业科学院科技创新工程项目(ASTIP-IAS12)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS36)、农产品质量安全风险评估项目(GJFP20220304)、新疆重大科技专项(2020A01001-3-1)

**Fund:** Supported by the Agricultural Science and Technology Innovation Program (ASTIP-IAS12), the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS36), the Quality and Safety Risk Assessment for Agricultural Products (GJFP20220304), and the Major Science and Technology Project of Xinjiang (2020A01001-3-1)

\*通信作者: 郑楠, 博士, 研究员, 主要研究方向为奶产品风险评估与营养功能评价。E-mail: zhengnan@caas.cn

\*Corresponding author: ZHENG Nan, Ph.D, Professor, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yuanmingyuan west Road, Haidian District, Beijing 100193, China. E-mail: zhengnan@caas.cn

proteases and lipases secreted by psychrophilic bacteria are also resistant to high temperature and remain active after pasteurization or ultra-high temperature sterilization. Therefore, it is of great importance to understand the diversity of psychrophilic bacteria and their enzymes to improve the quality of milk and milk products and reduce spoilage and waste. This paper introduced the contamination status and spoilage hazards of psychrophilic bacteria in milk and milk products, in order to provide background information for the risk assessment of milk and milk products, control the waste of psychrophilic bacteria on raw milk from the source, and ensure the quality of milk and milk products.

**KEY WORDS:** raw milk; psychrophilic bacteria; contaminate; proteases; lipases

## 0 引言

乳是一种营养成分十分丰富的物质,含有蛋白质、脂肪、乳糖、矿物质以及维生素等,具有较高的营养价值,但其也是微生物的天然培养基,极易引起腐败变质,因此导致乳及乳制品浪费的一个重要因素是微生物腐败<sup>[1-2]</sup>。生乳的质量是影响乳制品产业链的关键因素,随着低温储存和冷链运输技术的发展,生乳中大部分细菌的生长受到抑制,大大减少了生乳的浪费<sup>[3]</sup>。然而,低温条件下嗜冷菌的生长并未受到抑制,并逐步成为生乳中的优势菌<sup>[4]</sup>。研究表明,生乳在冷藏 1 d 后,嗜冷菌的数量可增加到总活菌数的 50%,冷藏 2 d 后可增加到总活菌数的 90%以上<sup>[5]</sup>。

嗜冷菌广泛存在于自然界,其主要分布在水和土壤中,空气中也含有少量的嗜冷菌,这类菌的最适生长温度为 20~30℃,但该类菌在 7℃或更低温度下仍能生长繁殖<sup>[6]</sup>。在干净的饲养环境下,从一头健康奶牛获得的新鲜生乳中嗜冷菌的数量小于 10<sup>2</sup> CFU/mL,数量只占总菌群的 10%<sup>[7]</sup>。研究表明,在环境清洁的牧场中,乳房内部或乳头表面皮肤的微生物中无法检测到嗜冷菌,所以可能是设备污染或储存条件差引起的生乳中嗜冷菌污染<sup>[8]</sup>。生乳中的微生物污染源头很多,例如牧场环境、乳房内部、乳头表面皮肤、挤奶设备以及储奶罐等都有可能是细菌的源头<sup>[9]</sup>。DU 等<sup>[10]</sup>基于 16S rDNA 测序的污染源追踪技术对污染源进行了定位,结果发现奶杯和药浴杯是造成生乳污染的主要原因。

尽管多年来食品科学技术不断突破,但是嗜冷菌导致的乳及乳制品腐败变质仍然是一个全球性的问题。据估计,在美国,每年大约有四分之一的乳制品在生产过程中损失或者在零售或消费过程中被浪费<sup>[11]</sup>。我国乳及乳制品的浪费问题同样不可忽视,乳及乳制品的腐败变质会给产业带来巨大的经济损失,因此,乳及乳制品变质造成的食物浪费问题亟需解决。本文从我国乳及乳制品中嗜冷菌多样性和嗜冷菌的危害展开分析,探究嗜冷菌的防控方法,旨在提升我国乳及乳制品的稳定性和质量,减少乳制品的浪费,避免腐败造成的经济损失。

## 1 嗜冷菌的多样性

生乳中嗜冷菌的组成取决于许多因素,例如季节、储

存条件、地理区域和牧场的管理水平等<sup>[11-12]</sup>。我国奶牛养殖和生产地域广泛,不同地区和不同季节采集的生乳样品中嗜冷菌的组成水平也存在差异<sup>[13]</sup>。生乳中已被鉴定的嗜冷菌的主要种类为假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、色杆菌属(*Chromobacterium*)、梭菌属(*Clostridium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、链球菌属(*Streptococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和肠杆菌属(*Enterobacterium*)<sup>[14-15]</sup>。假单胞杆菌属是在生乳中含量高的嗜冷菌,主要包括荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)、莓实假单胞杆菌(*Pseudomonas fragi*)和隆德假单胞杆菌(*Pseudomonas lundensis*)等<sup>[16-18]</sup>。

为全面分析生乳中嗜冷菌浓度和群落结构与季节之间的关联,YANG 等<sup>[19]</sup>采用传统培养法和单分子实时(single molecule real-time, SMRT)测序结合的方法,对黑龙江省冬夏两季生乳中嗜冷菌的浓度和组成进行了研究,结果发现,夏季嗜冷菌浓度显著高于冬季,传统培养方法最常分离的属是假单胞杆菌属(*Pseudomonad*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、黄杆菌属(*Chryseobacterium*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*),而 SMRT 法则是检测出短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、詹森菌属(*Janthinobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和肠球菌属(*Enterococcus*)为优势均属,并且两个季节间嗜冷菌的群落结构存在明显差异。该研究为我国东北地区嗜冷菌的控制提供了相应的数据支持。LIANG 等<sup>[20]</sup>分别在夏季、秋季和冬季收集了来自中国 5 个不同省份的 40 份生乳样品,采用 SMRT 法探究地理位置和季节对生乳中细菌群落结构和组成的影响,结果发现,在鉴定出的 35 种细菌中,相对丰度最高的嗜冷菌是凯氏不动杆菌(*Acinetobacter albensis*)、热氏假单胞杆菌(*Pseudomonas gessardii*)、魏氏假单胞杆菌(*Pseudomonas weihenstephanensis*)和拉恩氏菌(*Rahnellaimusitata*),并且不同产地和季节的生乳样品中相对丰度最高的菌属不同。该研究人员还发现运输距离和运输时间与魏氏假单胞杆菌的相对丰度呈正相关,因此认为该菌的含量或许可以成为评价生乳新鲜度的标准。DU 等<sup>[21]</sup>采用传统培养鉴定

和 SMRT 测序方法, 对中国黑龙江、内蒙古、甘肃、河南、安徽、江苏、重庆和湖南等地区的 25 份生乳样品中嗜冷菌的种类组成和多样性进行分析, 共分离出 248 个不同的嗜冷菌菌落, 菌落被鉴定为 21 个属、59 个种, 其中优势属为假单胞杆菌属(58.9%)。在此研究中黑龙江与内蒙古地区的样品中嗜冷菌的群落结构与其他地区存在显著差异, 但两者基本相似, 因此, 牧场需要在不同区域上实施不同控制战略来应对嗜冷菌的污染。GUO 等<sup>[22]</sup>在 2018 年 1 月、5 月和 9 月, 从中国黑龙江大庆、河南焦作、广东清远、江苏宿迁和宁夏银川的 5 个奶牛场共收集 355 份健康荷斯坦奶牛的生乳样品, 并采用 SMRT 法对生乳样品中的微生物群落进行测定分析, 发现 3 种最普遍存在牛奶中的物种是乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、气囊水栖菌(*Enhydrobacter aerosaccus*)和洛菲不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*), 它们在所有分析的生乳样品中有 99%、95%和 94%分别被检测到。该研究在我国广泛的地理区域内生成了生乳菌群组成的新信息。生乳中的微生物来自不同的外部环境, 所以不同的地理位置也会有不同的细菌组成; 不同季节也有不同的环境温度和湿度, 所以这也会对生乳中嗜冷菌的多样性产生强烈影响。因此, 控制生乳中的嗜冷菌多样性是提高乳及乳制品质量、减少腐败和浪费的基础。

生乳经过巴氏杀菌或超高温灭菌(*ultra high temperature instantaneous sterilization*, UHT)处理后, 细菌的水平会大幅下降, 但是嗜冷菌分泌的热稳定细胞外酶或形成孢子的蜡样芽孢杆菌是耐热的, 它们在巴氏杀菌或超高温灭菌处理后也能保持活性, 降解乳制品的蛋白和脂肪, 使乳制品发生腐败变质, 例如造成质地缺陷和产生异味<sup>[23-28]</sup>。生乳在经过巴氏杀菌处理后, 主要引起腐败的嗜冷菌包括假单胞杆菌、能够利用乳糖的大肠菌群、除假单胞杆菌和大肠菌群外的其他嗜冷革兰氏阴性细菌以及能产生孢子的革兰氏阳性腐败菌, 其中, 假单胞杆菌的特定菌株以及其他嗜冷革兰氏阴性细菌和能产生孢子的革兰氏阳性腐败菌可以产生脂肪酶或蛋白酶, 对乳及乳制品的货架期造成不良影响<sup>[29-30]</sup>。相关研究报告称, 蜡样芽孢杆菌在中国广州、深圳、南京和西宁等城市巴氏杀菌乳中广泛存在<sup>[31]</sup>。为研究蜡样芽孢杆菌在乳制品中的污染情况, CHANG 等<sup>[32]</sup>从中国西南 3 个省份(广西、云南和贵州)收集了 150 份生水牛乳和 300 份巴氏杀菌水牛乳, 结果分离鉴定出了 96 株蜡样芽孢杆菌, 其中 50 株(33.3%)来自生水牛乳, 46 株(15.3%)来自巴氏杀菌水牛乳, 肠毒素基因普遍检出, 但分离株与呕吐相关的 *cesB* 基因检出率为 6.25% (6/96), 这表明从生水牛乳和巴氏杀菌水牛乳中分离出的蜡样芽孢杆菌菌株更容易引起人类腹泻而不是呕吐。MENG 等<sup>[33]</sup>从牧场环境和生乳中分离得到的蜡样芽孢杆菌在 25 和 37°C 时, 共有 42 株分离株(89.36%)在含有 UHT 奶的琼脂上产生蛋白水解圈, 而在 7°C 条件下时没有产生蛋白水解圈, 所以应加强

监测 UHT 产品的生乳中蜡样芽孢杆菌污染, 确保生产出高品质的乳制品。

## 2 嗜冷菌的腐败危害

生乳在低温下的储存和运输促进了嗜冷菌的生长和热稳定酶的产生, 对乳制品的质量和保质期构成很大的威胁。一般来说, 微生物分泌的酶在低温下的反应速率会降低, 但嗜冷菌却可以产生适合冷温的酶, 其在低温下仍能保持较高的催化速率, 而且此类酶的蛋白分子具有松散又有弹性的结构, 可根据催化活性的需要进行构象变化, 用来弥补低温环境下活化能的不足<sup>[34]</sup>。大多数的酶活性的最佳温度是 30~40°C, 超过这个温度会失活变性, 但嗜冷菌分泌的耐热酶则不受影响, 尤其是 UHT 奶, 会因为嗜冷菌残留的酶而在货架期内发生老化凝胶、发苦、蛋白水解等品质问题<sup>[14,35]</sup>。已有研究表明, 不同的假单胞杆菌菌株在蛋白水解特性上存在很大差异, 并且储存过程中持续的酶活性会通过分解牛奶酪蛋白导致产品质地缺陷<sup>[36]</sup>。乳及乳制品在 4~7°C 储存时, 假单胞杆菌分泌的脂肪酶比嗜中温菌分泌的脂肪酶更活跃, 巴氏杀菌和 UHT 处理后表现出高稳定性<sup>[37]</sup>。不同的嗜冷菌可以分泌不同类型的酶, 例如荧光假单胞杆菌能够产生蛋白酶、脂肪酶和磷脂酶, 而相关研究表明肺炎克雷氏伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)仅能产生脂肪酶<sup>[38]</sup>。除此以外, 也有研究证明假单胞杆菌(主要是荧光假单胞杆菌)、芽孢杆菌、沙雷氏菌具有很强的蛋白水解潜力, 而其他种类的假单胞杆菌属(主要是非荧光假单胞杆菌)、芽孢杆菌、肠杆菌和不动杆菌属具有很强的脂解作用<sup>[39]</sup>。

### 2.1 蛋白水解酶对乳及乳制品的影响

生乳中嗜冷菌的生长繁殖在冷藏过程中很难被控制, 并且它们分泌的耐热蛋白酶在乳制品加工过程中也很难被灭活。蛋白酶可以定义为水解肽键的酶, 存在于牛奶中的细菌蛋白酶优先降解酪蛋白胶束, 然后释放  $\beta$ -乳球蛋白- $\kappa$ -酪蛋白复合物, 该复合物随后附着在乳清蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白上, 形成交联蛋白的三维网络, 这些混合蛋白可以加速 UHT 奶在储存期间产生异味和凝胶化现象<sup>[16]</sup>。老化凝胶是乳制品的不可逆状态变化, 即包装的内容物失去流动性并形成不可逆的凝胶, 与沉淀现象完全不同<sup>[40]</sup>。在乳及乳制品储存过程中, 蛋白酶也可能水解二级乳脂球膜中的酪蛋白, 导致脂肪球的聚集, 使得牛奶发生变质<sup>[41]</sup>。在奶酪生产过程中, 相关研究表明嗜冷菌分泌的蛋白酶会影响酪蛋白的含量, 从而导致成品产量低、有苦味和质地不好等问题<sup>[42]</sup>。目前被鉴定出的嗜冷菌产热稳定蛋白酶有 Ser2、AprX 等。假单胞杆菌是生乳中具有腐败潜力的主要嗜冷菌, 它能产生一种耐热的胞外蛋白酶 AprX, AprX 编码的碱金属蛋白酶可以改变酪蛋白胶束的物理和化学性

质,导致储存的牛奶变质,而且巴氏杀菌或 UHT 处理都无法将其有效灭活<sup>[43-44]</sup>。沙雷氏菌属,特别是液化沙雷氏菌种,也是生乳中的一种腐败性微生物,其被证明可以分泌一种由 *Ser2* 基因编码的约 52 kDa 的耐热变质金属蛋白酶,因此,这种蛋白酶被命名为 *Ser2*,并且 *AprX* 和 *Ser2* 在蛋白质结构和生化特性上具有高度的同源性<sup>[45-47]</sup>。

UHT 工艺生产的是商业无菌产品,然而生乳中嗜冷菌产生的一些蛋白酶会在 UHT 处理中存活下来,从而限制 UHT 乳制品的保质期。为探究 UHT 处理后不同嗜冷菌分泌的蛋白酶活性,ZHANG 等<sup>[48]</sup>将从生乳中分离出 6 种具有热稳定蛋白水解活性的假单胞杆菌,添加到 UHT 牛奶并在 7°C 的环境下培养 7 d,进行 141°C 10s 的热处理,然后检测蛋白酶活性,结果发现 *Pseudomonas koreensis* DZ138、*Pseudomonas rhodesiae* DZ351 和 *Pseudomonas synxantha* DZ832 产生的蛋白酶活性均保持 100%,而 *Pseudomonas fragi* DZ1、*Pseudomonas fluorescens* DZ390 和 *Pseudomonas lundensis* DZ845 产生的蛋白酶分别保持初始活性的 80.58%、94.81%和 55.32%。DU 等<sup>[49]</sup>以中国内蒙古、黑龙江、甘肃、河南、安徽、江苏、重庆和湖南 8 个地区的 25 份生乳样品为样本,对假单胞杆菌的蛋白水解活性进行了评价,结果是共检出 116 株假单胞杆菌,其中在 4、10 和 25°C 时分别有 68.9%、81.9%和 85.3%的假单胞杆菌具有蛋白水解活性,并且 60.3%的假单胞杆菌分离株会分泌 *AprX* 基因编码的耐热金属蛋白酶。在经过 72°C 热处理 15 s 后,蛋白酶活性为(73±4)%~(84±7)%;132°C 热处理 4 s 后,蛋白酶活性为(62±3)%~(74±2)%。该研究首次比较了中国不同产地生乳中假单胞杆菌的种类多样性和蛋白水解活性,其研究结果为研究假单胞杆菌的多样性和腐败潜力提供了有价值的信息。蜡样芽孢杆菌产生的耐热蛋白酶也是导致乳及乳制品在保质期内腐烂、苦味和凝胶化的主要因素。YANG 等<sup>[50]</sup>从生乳中分离出的 55 株蜡样芽孢杆菌中有 25 株具有产蛋白酶的能力,蜡样芽孢杆菌 C58 具有较强的蛋白酶活性,其蛋白酶在 70°C (30 min)和 100°C (10 min) 热处理后的热稳定性最高。此外,采用蜡样芽孢杆菌 C58 蛋白酶在 28°C (24 h)和 10°C (6 d)条件下孵育 UHT 奶,结果表明,酪蛋白的水解顺序依次为  $\kappa$ -CN、 $\beta$ -CN 和  $\alpha$ S-CN,乳清蛋白未被水解,UHT 奶的蛋白质水解程度、粘度和粒径均有所增加。同时,共聚焦激光扫描显微镜图像显示,蛋白酶使 UHT 奶的稳定性下降,从而形成老化凝胶。因此该研究为控制蜡样芽孢杆菌蛋白酶引起的 UHT 奶变质提供了信息,从而保证液态奶的质量和安

## 2.2 脂肪水解酶对乳及乳制品的影响

脂肪酶包括牛奶天然脂肪酶和牛奶微生物(嗜冷菌)产生的脂肪酶,牛奶天然脂肪酶是在乳腺分泌细胞中合成的脂蛋白脂肪酶,对牛奶进行高温短时巴氏杀菌几乎可以完

全失活<sup>[51]</sup>。生乳热处理前嗜冷菌产生的脂肪酶一直备受关注,因为它们可以承受巴氏或超高温灭菌的温度,最终在乳制品中分解牛奶脂肪。虽然热处理加工过的乳及乳制品中残留的脂肪酶是低浓度的,但随着时间的推移,这些脂肪酶依然能改变乳及乳制品的理化性质,导致保质期长的乳制品风味缺陷或产量下降,如 UHT 奶、奶酪等<sup>[52]</sup>。目前已有地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)、*Acinetobacter* sp. AU07、*Actinomyces sediminis* 和乌汶伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia ubonensis*)被发现可以分泌脂肪酶。脂肪酶是水解酰基甘油的羧酸酯酶,可以将牛奶三酰甘油水解为短链脂肪酸,如丁酸、己酸和辛酸,从而使最终产物具有酸臭、肥皂味和其他的质量缺陷<sup>[16,53]</sup>。

XIN 等<sup>[54]</sup>从中国北方不同地区的生乳样品中分离出 21 株嗜冷菌为潜在的脂肪酶生产菌,通过评估其生长特征、脂肪酶活性和耐热性比较发现,在分离的脂溶性嗜冷菌中,假单胞杆菌属为优势属,荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)是最有潜力的脂肪酶产生菌,而且菌株在高温处理后无法存活,但其脂肪酶可以。YUAN 等<sup>[15]</sup>在常温(28°C)和冷藏(7°C)的条件下研究了生乳中嗜冷菌的腐败潜力,其中耶尔辛氏菌属(*Yersinia*)、绿脓杆菌属(*Pseudomonas*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)具有较高的蛋白水解活性,而不动杆菌属(*Acinetobacter*)具有较高的脂肪水解活性;在 70、80 或 90°C 热处理后,嗜冷菌产生的蛋白酶和脂肪酶仍保持活性,且蛋白酶的热稳定性优于脂肪酶。为了解液化沙雷氏菌的脂解活性及其产生热稳定脂肪酶的能力,SALGADO 等<sup>[55]</sup>研究发现液化沙雷氏菌 L135 (*Serratia liquefaciens* L135)在不同温度下(4、7、37、17、25 和 30°C)的脂解活性随孵育时间的增加而依次增加,对生乳进行 65°C 30 min 处理后,酶保留了 47%的脂解活性,但是 72°C 15 s 处理后,没有检测到对脂肪酶活性的影响。虽然较高温度和较长加热时间的组合会使得酶活性的降低,但是这些处理也会对乳及乳制品的营养和感官特性造成不良影响。因此,任何热处理都不能在保证乳制品质量的情况下有效地灭活蛋白酶和脂肪酶。

## 2.3 毒素对乳及乳制品的影响

蜡样芽孢杆菌是引起乳及乳制品结构和风味变化的重要腐败菌,在环境中普遍存在。蜡样芽孢杆菌孢子是代谢休眠细胞类型,对极端环境条件具有很强的抵抗力,如加热、干燥、辐射和化学处理<sup>[56]</sup>。乳及乳制品中蜡样芽孢杆菌及其毒力因子的存在可引起食物中毒等疾病,食物中毒的主要症状分为腹泻和呕吐,腹泻主要由 3 种肠毒素引起,它们属于孔隙形成毒素家族,包括非溶血性肠毒素(non-hemolytic enterotoxin, Nhe)、溶血素 BL (hemolysin

BL, HBL)和细胞溶素 K (cytolysinK, CytK), 而呕吐综合症则与一种被称为“cereulide”的致命毒素紧密相连, 这种毒素由 *ces* 基因编码的非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)合成<sup>[57]</sup>。MENG 等<sup>[33]</sup>为研究蜡样芽孢杆菌的生物多样性和毒素基因, 从天津某个奶牛场的 82 个环境样品和 18 个生乳样品中共分离出 47 株蜡样芽孢杆菌, 其中毒素基因分析结果显示, 分别有 12.77%和 8.51%的菌株携带 *hblACD* 和 *nheABC* 基因, 但催吐基因 *cesB* 的检出率却为 21.28%。该研究结果揭示了牧场环境和生乳中蜡样芽孢杆菌的特性, 说明奶牛场必须要实行严格的清洁管理, 监测生奶中蜡样芽孢杆菌的含量, 保证奶制品的高质量。GAO 等<sup>[31]</sup>对从中国不同地区的巴氏杀菌奶样品中分离出的蜡样芽孢杆菌, 进行了污染情况、毒力基因等方面的分析。结果发现, 70 个样品(27%)被蜡样芽孢杆菌污染, 并且 45%的菌株含有产肠毒素基因 *hblACD*, 93%的菌株含有 *nheABC* 基因簇。因此, 有必要评估蜡样芽孢杆菌在巴氏杀菌奶中的污染程度和微生物特性, 以此减少乳制品的浪费及食物中毒现象的发生。

### 3 嗜冷菌的防控方法

嗜冷菌数量过高和储存温度不适宜是产生大量耐热酶的主要原因, 所以保持低嗜冷菌数量对于控制酶的产生是极其重要的。在没有使用良好卫生标准规范的牧场中, 嗜冷菌通常会在环境中扩散, 导致最终产品品质变差, 所以有必要保持有效的清洁和卫生。牧场还可以运行危害分析和关键控制点系统, 并进行专门培训提高工人卫生意识, 从而达到控制生乳质量的目的。因此, 为达到优良的微生物标准, 必须在牧场和生产过程中实施标准卫生操作流程, 并要杜绝储存期间的污染<sup>[29]</sup>。首先, 刚挤完的奶的温度约为 35°C, 此温度适合细菌生长繁殖, 所以生乳生产后应迅速冷却到 6°C 以下, 以减缓嗜冷菌的生长繁殖和耐热酶的分泌<sup>[58]</sup>。若生乳没有预冷, 这将导致储奶罐内温度升高, 从而促进嗜冷菌生长和耐热酶的产生, 罐中产生的耐热酶导致生乳发生蛋白质水解现象<sup>[59]</sup>。其次, 在冷藏条件下, 耐热酶仍然可能在嗜冷菌生长繁殖阶段产生, 因此, 冷却后的生乳应尽快加工生产, 避免在储奶罐中停留时间过长。最后, 未受污染的生乳并不等同于未变质的最终乳制品, 因此所有与生乳接触的设备都应进行充分的清洁和消毒, 并尽快开发快速检测方法, 及时检测和量化生乳中的嗜冷菌, 实现从挤奶到出厂都可持续追踪可污染途径, 从源头控制嗜冷菌的污染, 生产高质量的乳制品。总之, 应持续推进现代化养殖、改进乳及乳制品生产加工工艺以及加强监测冷链运输以及储存条件, 来共同推动我国成为奶业强国。

### 4 结束语

乳及乳制品的安全和质量问题是一直在研究及需要

解决的问题。嗜冷菌通过生产热稳定的细胞外酶来缩短乳及乳制品的保质期, 从而造成乳制品行业的经济损失。生乳中嗜冷菌的水平与多样性与地域、季节和牧场的卫生条件息息相关。为了满足人民对高品质乳制品日益增长的需求, 各国应提高对嗜冷菌的多样性和腐败潜力及其对乳制品质量影响的关注。目前我国对生乳中微生物指标的关注点是菌落总数和体细胞数量, 对影响生乳质量安全的嗜冷菌控制未能引起足够的重视, 只有学生奶有嗜冷菌限定标准, 所以这也制约着我国乳及乳制品发展的前景<sup>[60]</sup>。因此, 在生产过程中, 应建立更全面的生乳中嗜冷菌的评价标准, 并对生乳中嗜冷菌的丰富度、多样性和组成进行综合研究。除此以外, 为避免生乳在挤奶、储存和运输过程中的交叉污染, 需要培训工人在挤奶和生产加工过程中实施良好的卫生习惯, 还应尽快研发可靠的实时检测技术来更好地了解生乳中嗜冷菌的多样性。未来还应研究各种热稳定酶的结构特征和分子特性, 全面了解嗜冷菌的腐败机制, 探究生乳中嗜冷菌污染的潜在风险, 为乳及乳制品行业的风险评估提供背景信息, 保证乳及乳制品的保质期和质量。

### 参考文献

- [1] MARTIN NH, TORRES-FRENZEL P, WIEDMANN M. Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss and waste [J]. *J Dairy Sci*, 2021, 104: 1251–1261.
- [2] HOU QC, XU HY, ZHENG Y, *et al*. Evaluation of bacterial contamination in raw milk, ultra-high temperature milk and infant formula using single molecule, real-time sequencing technology [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98:1–9.
- [3] 吴天赐, 张娟, 李楠. 原料乳中嗜冷菌菌群多样性及分析方法研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2021, 49(6): 42–46.  
WU TC, ZHANG J, LI N. Research progress on diversity and analysis methods of psychrophilic bacteria in raw milk [J]. *China Dairy Ind*, 2021, 49(6): 42–46.
- [4] HAHNE J, ISELE D, BERNING J, *et al*. The contribution of fast growing, psychrotrophic microorganisms on biodiversity of refrigerated raw cow's milk with high bacterial counts and their food spoilage potential [J]. *Food Microbiol*, 2019, 79: 11–19.
- [5] LAFARGE V, OGIER JC, GIRARD V, *et al*. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(9): 5644–5650.
- [6] DOGAN B, BOOR KJ. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 130–138.
- [7] DECIMO M, MORANDI S, SILVETTI T, *et al*. Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk [J]. *J Food Sci*, 2014, 79(10): 2081–2090.
- [8] PORCELLATO D, SMISTAD M, BOMBELLI A, *et al*. Longitudinal study of the bulk tank milk microbiota reveals major temporal shifts in composition [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 616429.
- [9] ELMOSLEMANY AM, KEEFE GP, DOHOO IR, *et al*. The association

- between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices [J]. *Prev Vet Med*, 2010, 95(1–2): 32–40.
- [10] DU BY, MENG L, LIU HM, *et al.* Impacts of milking and housing environment on milk microbiota [J]. *Animals*, 2020, 10(12): 2339.
- [11] GIANNINO ML, MARZOTTO M, DELLAGLIO F, *et al.* Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, 130(3): 188–195.
- [12] YAMAZI AK, MOREIRA TS, CAVICCHIOLI VQ, *et al.* Long cold storage influences the microbiological quality of raw goat milk [J]. *Small Ruminant Res*, 2013, 113(1): 205–210.
- [13] 杜兵耀. 生乳中微生物风险关键点分析及假单胞菌特征研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- DU BY. Analysis of risk key points of microorganism in raw milk and characteristics of *Pseudomonas* [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2022.
- [14] WANG JC, ZHENG Y, XI XX, *et al.* Application of pacbio single molecule real-time (SMRT) sequencing in bacterial source tracking analysis during milk powder production [J]. *Food Control*, 2018, 93: 226–234.
- [15] YUAN L, SADIQ FA, LIU TJ, *et al.* Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2018, 19(8): 630–642.
- [16] ZHANG D, PALMER J, TEH KH, *et al.* 16S rDNA high-throughput sequencing and MALDI-TOF MS are complementary when studying psychrotrophic bacterial diversity of raw cows' milk [J]. *Int Dairy J*, 2019, 97: 86–91.
- [17] MENG L, ZHANG YD, LIU HM, *et al.* Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2158.
- [18] MALLETT A, GUEGUEN M, KAUFFMAN N, *et al.* Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices [J]. *Int Dairy J*, 2012, 27(1–2): 13–21.
- [19] YANG XY, GUO XJ, LIU WP, *et al.* The complex community structures and seasonal variations of psychrotrophic bacteria in raw milk in Heilongjiang Province, China [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 134: 110218.
- [20] LIANG LJ, WANG P, ZHAO XM, *et al.* Single-molecule real-time sequencing reveals differences in bacterial diversity in raw milk in different regions and seasons in China [J]. *J Dairy Sci*, 2022, 105(7): 5669–5684.
- [21] DU BY, MENG L, LIU HM, *et al.* Single molecule real-time sequencing and traditional cultivation techniques reveal complex community structures and regional variations of psychrotrophic bacteria in raw milk [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 853263.
- [22] GUO XC, YU ZJ, ZHAO FY, *et al.* Both sampling seasonality and geographic origin contribute significantly to variations in raw milk microbiota, but sampling seasonality is the more determining factor [J]. *J Dairy Sci*, 2021, 104(10): 10609–10627.
- [23] ZHAO SJ, CHEN JL, FEI P, *et al.* Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from dairy products in China [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(5): 3994–4001.
- [24] ZHAO GP, LIU HZ, HE J, *et al.* The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 121(2): 195–200.
- [25] OWUSU-KWARTENG J, WUNI A, AKABANDA F, *et al.* Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 65.
- [26] HANSON ML, WENDORFF WL, HOUCK KB. Effect of heat treatment of milk on activation of *Bacillus spores* [J]. *J Food Prot*, 2005, 68(7): 1484–1486.
- [27] ALONSO VPP, OLIVEIRA-MORAIS J, KABUKI DY. Incidence of *Bacillus cereus*, *Bacillus sporothermodurans* and *Geobacillus stearothermophilus* in ultra-high temperature milk and biofilm formation capacity of isolates [J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 354: 109318.
- [28] GOPAL N, HILL C, ROSS PR, *et al.* The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1418.
- [29] MARTIN NH, BOOR KJ, WIEDMANN M. Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(1): 861–870.
- [30] FUSCO V, CHIEFFI D, FANELLI, *et al.* Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2020, 19(4): 2013–2049.
- [31] GAO TT, DING Y, WU QP, *et al.* Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk in China [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 533.
- [32] CHANG YH, XIE QG, YANG J, *et al.* The prevalence and characterization of *Bacillus cereus* isolated from raw and pasteurized buffalo milk in southwestern China [J]. *J Dairy Sci*, 2021, 104(4): 3980–3989.
- [33] MENG L, ZHANG RR, DONG L, *et al.* Characterization and spoilage potential of *Bacillus cereus* isolated from farm environment and raw milk [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 940611.
- [34] JIN SS, WANG YZ, ZHAO XH. Cold-adaptive mechanism of psychrophilic bacteria in food and its application [J]. *Microb Pathogen*, 2022, 169: 105652.
- [35] XIONG ZQ, LI YY, XIANG YW, *et al.* Short communication: Dynamic changes in bacterial diversity during the production of powdered infant formula by PCR-DGGE and high-throughput sequencing [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(7): 5972–5977.
- [36] MAIER C, HUPTAS C, VON-NEUBECK M, *et al.* Genetic organization of the aprX-lipA2 operon affects the proteolytic potential of *Pseudomonas* species in milk [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1190.
- [37] QUINTIERI L, CAPUTO L, BRASCA M, *et al.* Recent advances in the mechanisms and regulation of QS in dairy spoilage by *Pseudomonas* spp. [J]. *Foods*, 2021, 10(12): 3088.
- [38] VITHANAGE NR, DISSANAYAKE M, BOLGE G, *et al.* Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential [J]. *Int Dairy J*, 2016, 57: 80–90.
- [39] HANTSIS-ZACHAROV E, HALPERN M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits [J].

- Appl Environ Microbiol, 2007, 73(22): 7162–7168.
- [40] ANEMA SG. Storage stability and age gelation of reconstituted ultra-high temperature skim milk [J]. Int Dairy J, 2017, 75: 56–67.
- [41] GAUCHER I, TANGUY G, FAUQUANT J, *et al.* Proteolysis of casein micelles by *Pseudomonas fluorescens* CNRZ 798 contributes to the destabilisation of UHT milk during its storage [J]. Dairy Sci Technol, 2011, 91: 413–429.
- [42] PALUDETTI LF, KELLY AL, GLEESON D. Effect of thermoresistant protease of *Pseudomonas fluorescens* on rennet coagulation properties and proteolysis of milk [J]. J Dairy Sci, 2020, 103(5): 4043–4055.
- [43] DECIMO M, MORANDI S, SILVETTI T, *et al.* Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk [J]. J Food Sci, 2014, 79(10): M2081–2090.
- [44] MATEOS A, GUYARD-NICODEME M, BAGLINIERE F, *et al.* Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in pseudomonas LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk [J]. Int Dairy J, 2015, 49: 78–88.
- [45] BAGLINIERE F, JARDIN J, GAUCHERON, *et al.* Proteolysis of casein micelles by heat-stable protease secreted by *Serratia liquefaciens* leads to the destabilisation of UHT milk during its storage [J]. Int Dairy J, 2017, 68: 38–45.
- [46] BAGLINIERE F, TANGUY G, SALGADO RL, *et al.* Ser2 from *Serratia liquefaciens* L53: A new heat stable protease able to destabilize UHT milk during its storage [J]. Food Chem, 2017, 229: 104–110.
- [47] MACHADO SG, HEYNDRIKX M, BLOCK J, *et al.* Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk [J]. Int J Food Microbiol, 2016, 222: 65–71.
- [48] ZHANG D, LI SQ, PALMER J, *et al.* The relationship between numbers of *Pseudomonas bacteria* in milk used to manufacture UHT milk and the effect on product quality [J]. Int Dairy J, 2020, 105: 104687.
- [49] DU BY, MENG L, LIU HM, *et al.* Diversity and proteolytic activity of *Pseudomonas* species isolated from raw cow milk samples across China [J]. Sci Total Environ, 2022, 838: 156382.
- [50] YANG XY, WANG ZH, ZHANG CX, *et al.* Assessment of the production of *Bacillus cereus* protease and its effect on the quality of ultra-high temperature-sterilized whole milk [J]. J Dairy Sci, 2021, 104(6): 6577–6587.
- [51] ZHANG WQ, WANG B, MA CL, *et al.* A clarifying reagent and microplate-based method for the high-throughput analysis of lipase activity in milk [J]. Eur Food Res Technol, 2021, 247: 2161–2169.
- [52] DEETH HC. Heat-induced inactivation of enzymes in milk and dairy products: A review [J]. Int Dairy J, 2021, 121: 105104.
- [53] SAMARZIJA D, ZAMBERLIN S, POGACIC T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality [J]. Mljekarstvo, 2012, 62(2): 77–95.
- [54] XIN L, ZHANG LW, MENG ZX, *et al.* Lipolytic psychrotrophic bacteria and lipase heat-resistant property in bovine raw milk of North China [J]. J Food Process Pres, 2017, 41(6): e13289.
- [55] SALGADO CA, BAGLINIERE F, VANETTI MCD. Spoilage potential of a heat-stable lipase produced by *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw milk [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 126: 109289.
- [56] BAI Y, MUHAMMAD AI, HU YQ, *et al.* Inactivation kinetics of *Bacillus cereus* spores by plasma activated water (PAW) [J]. Food Res Int, 2020, 131: 109041.
- [57] LIU XY, HU Q, XU F, *et al.* Characterization of *Bacillus cereus* in dairy products in China [J]. Toxins, 2020, 12(7): 454.
- [58] PALUDETTI LF, KELLY AL, O'BRIE N, *et al.* The effect of different precooling rates and cold storage on milk microbiological quality and composition [J]. J Dairy Sci, 2018, 101(3): 1921–1929.
- [59] ZHANG CY, BIJL E, SVENSSON B, *et al.* The extracellular protease AprX from *Pseudomonas* and its spoilage potential for UHT milk: A review [J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2019, 18(4): 834–852.
- [60] 袁磊. 原料奶中嗜冷菌的潜在危害研究-基于腐败特性及其生物被膜形成的角度[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- YUAN L. The potential hazards of psychrotrophic bacteria in raw milk-from the perspectives of spoilage potential and biofilm formation [D]. Hangzhou: Zhengjiang University, 2020.

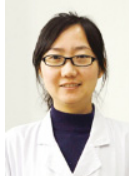
(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

## 作者简介



许文君, 硕士研究生, 主要研究方向为牛奶微生物。

E-mail: xubj2022@163.com



郑楠, 博士, 研究员, 主要研究方向为奶产品风险评估与营养功能评价。

E-mail: zhengnan@caas.cn