

# 原料乳中嗜冷假单胞菌危害 及控制研究进展

徐煜,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:**假单胞菌是对原料乳危害最大的嗜冷菌之一,极易在冷藏条件下成为优势菌群。大多数嗜冷假单胞菌有分泌蛋白酶和脂肪酶的能力,并导致原料乳及产品变质。本文对原料乳假单胞菌的危害特点,快速检测和新型控制工艺研究进展进行综述。最后探讨了嗜冷假单胞菌的研究方向。

**关键词:**嗜冷假单胞菌,危害,检测,控制

## Research progress in hazards and control of psychrotrophic *Pseudomonas* in raw milk

XU Yu, REN Jing\*

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

**Abstract:** *Pseudomonas*, one of the most harmful psychrotroph in raw milk, can easily grow to be dominant microflora in the refrigerated conditions. Most of the psychrotrophic *Pseudomonas* secrete the protease and lipase, resulting in milk metamorphism. The article summarized the advance on the hazard characteristics, rapid detection methods and the new control technology of *Pseudomonas*. At last, the research direction of psychrotrophic *Pseudomonas* was discussed.

**Key words:** psychrotrophic *Pseudomonas*; hazard; detection; control

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)13-0380-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.072

嗜冷菌是影响原料乳及其制品质量和安全的关键微生物。嗜冷菌在生长代谢过程中,分泌的耐热性蛋白酶和脂酶,导致原料乳在高温灭菌后凝胶、沉淀、变苦和酸败<sup>[1]</sup>。同时,蛋白酶还会影响原料乳发酵,造成产品口感和风味缺陷<sup>[2-3]</sup>。一些嗜冷菌具有潜在致病性<sup>[4-5]</sup>,影响了原料乳的安全。假单胞菌是原料乳及其制品中常见的主要污染菌,同时是对原料乳危害最大的嗜冷菌之一<sup>[6]</sup>。因此,对假单胞菌危害特点,危害机制以及检测控制方法的研究,对控制原料乳中嗜冷菌的危害,保障乳品安全有重要意义。本综述对嗜冷假单胞菌危害性及检测和控制工艺的研究进展进行综述。

### 1 原料乳中嗜冷假单胞菌的危害

嗜冷假单胞菌对原料乳的危害体现在两个方面:首先,假单胞菌在原料乳冷藏过程中,生长繁殖造成菌体数超标。假单胞菌对温度变化适应力强,在 7、22 和 30℃ 都能正常生长<sup>[7]</sup>,特别是在原料乳低温冷藏或运输过程中,嗜冷假单胞菌选择性生

长,往往成为许多国家和地区原料乳中主要污染微生物<sup>[4,8-11]</sup>。假单胞菌在自然界中广泛存在,极易对原料乳生产链造成污染<sup>[10]</sup>,不仅对原料乳的收集,运输和冷藏等各个生产环节造成初次污染,而且还容易再次污染巴氏灭菌后的原料乳<sup>[8]</sup>。另一方面,嗜冷假单胞菌分泌的蛋白酶和脂肪酶会导致原料乳变质<sup>[2]</sup>。嗜冷假单胞菌分泌蛋白酶,降解原料乳中的酪蛋白,产生疏水性多肽,会导致原料乳发苦。而嗜冷菌分泌的脂肪酶,降解原料乳中的脂肪,产生游离脂肪酸,会导致原料乳酸败。这些蛋白酶和脂肪酶往往具有耐热性,能在原料乳巴氏杀菌处理后仍然保持相当活性,进而影响乳产品货架期<sup>[1-2]</sup>。

#### 1.1 嗜冷假单胞菌在原料乳生产中的危害

影响原料乳中嗜冷假单胞菌生长繁殖能力的因素有很多,在不同条件下,嗜冷假单胞菌对原料乳的危害大小也不同。这些条件包括:气候条件、原料乳含氧量和 pH,原料乳的疏水性变化以及不同灭菌工

收稿日期:2014-12-01

作者简介:徐煜(1986-),男,博士,研究方向:乳品安全。

\*通讯作者:任婧(1980-),女,博士,高级工程师,研究方向:乳品安全。

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD12B08;2012BAK17B14)。

艺对原料乳的处理。

研究表明,假单胞菌在原料乳中的出现频率有一定的季节性。原料乳中假单胞菌在春天和秋天出现频率更高<sup>[12]</sup>,危害风险更大。而在冬天,假单胞菌出现频率相对较低,冬天出现频率最高的是嗜温菌,其原因可能是嗜温菌对假单胞菌的生长有竞争抑制作用。

原料乳的含氧量和 pH,对嗜冷假单胞菌的生长和蛋白酶、脂肪酶的分泌有重要影响。研究表明,降低原料乳含氧量和 pH 能抑制嗜冷假单胞菌的生长。在贮存阶段,向原料乳中充入氮气(N<sub>2</sub>)排出溶解氧,能抑制原料乳中嗜冷假单胞菌的生长<sup>[13]</sup>。但是这种处理方式对于嗜冷假单胞菌的抑制效果不如用二氧化碳(CO<sub>2</sub>)处理。向原料乳中充入 CO<sub>2</sub> 处理不仅能降低原料乳的含氧量,还能降低原料乳的 pH,能更好地抑制嗜冷假单胞菌的生长以及蛋白酶、脂肪酶的分泌,并延长产品的货架期<sup>[14]</sup>。但是 CO<sub>2</sub> 处理引起的原料乳 pH 下降,会造成一定的钙和脂肪的减少。

原料乳在加工过程中自身疏水性的变化,能影响嗜冷假单胞菌的数量分布。在奶酪加工的过程中,随着奶油的分离,在脱脂原料乳中未检测到假单胞菌,假单胞菌对脱脂原料乳危害风险最小<sup>[3]</sup>。而假单胞菌主要出现在奶油中(所占嗜冷菌比例可以达到 33%),是其中主要的嗜冷菌,对奶油危害风险最大。造成这种分布比率差异的原因,可能是假单胞菌细胞表面的疏水性较强,对奶油的亲性和性较强,更倾向分布于奶油中。

不同灭菌工艺处理对原料乳中假单胞菌控制效果也大不相同。加热的灭菌工艺对嗜冷假单胞菌数量控制效果最好。Rasolof<sup>[15]</sup>的研究表明,二氧化碳处理以及微孔过滤处理的原料乳在 4℃ 冷藏的第 7d 时,假单胞菌分别占嗜冷菌总数的 56.6% 和 55.6%。而在加热处理的原料乳中,假单胞菌仅占 0.6%。然而巴氏消毒以及超高温瞬时处理(UHT)等加热的杀菌技术,会不可避免地带来原料乳营养成分和活性物质的破坏。

## 1.2 嗜冷假单胞菌不同种类的危害性

嗜冷菌分泌蛋白酶,脂肪酶和卵磷脂酶的能力,是对其危害性评价主要指标。嗜冷假单胞菌分泌这三种酶的能力差异很大,这些差异性不仅存在于不同种的假单胞菌之间,也存在于同种不同变型的假单胞菌之间。

假单胞菌种类众多,原料乳中常见的嗜冷假单胞菌包括荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*P. putida*)、莓实假单胞菌(*P. fragi*)、腐烂假单胞菌(*P. putrefaciens*)、海雀假单胞菌(*P. lundensis*)以及不常见的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)<sup>[4,7]</sup>。不同假单胞菌分泌酶根据 rRNA-DNA 型杂交不同,分为 5 个 rRNA 类,真正的假单胞菌被限定在第一个 rRNA 类<sup>[16]</sup>,这类包括荧光假单胞菌和非荧光假单胞菌<sup>[17]</sup>。

大部分恶臭假单胞菌没有明显的蛋白酶、脂肪酶和卵磷脂酶的产酶活力<sup>[9,18]</sup>,对原料乳的危害较

小。海雀假单胞菌和莓实假单胞菌能产生蛋白酶,会成为原料乳冷藏过程中的主要嗜冷菌群,对原料乳的危害较大<sup>[17-18]</sup>。荧光假单胞菌在原料乳中发现的频率最高,是原料乳冷藏过程中常见的主要嗜冷菌群<sup>[19-20]</sup>。69% 的荧光假单胞菌同时具有脂肪酶、蛋白酶和卵磷脂酶活性<sup>[18]</sup>,对原料乳的降解速率也最高,是危害潜力最大的假单胞菌<sup>[7,17]</sup>,也是引起乳品变质的最常见微生物<sup>[18]</sup>。

并不是所有的荧光假单胞菌都对原料乳有破坏性影响。荧光假单胞菌根据表型特征分为 5 个生物变型<sup>[17]</sup>。不同变型对原料乳的危害是不同的,有的变型同时产蛋白酶和脂肪酶,严重危害原料乳品质<sup>[7]</sup>,有的变型分泌的蛋白酶对原料乳变质影响不大<sup>[10]</sup>,有的荧光假单胞菌却能在原料乳加工过程中加速奶酪成熟<sup>[21]</sup>。这些荧光假单胞菌生物变型之间的基因差异以及表型差异小,很难区分。因此,建立亚种水平上的鉴别方法,对原料乳中荧光假单胞菌的危害性评估非常重要<sup>[10]</sup>。

## 1.3 嗜冷假单胞菌分泌的蛋白酶

嗜冷菌分泌的蛋白酶,根据催化机理分为四种<sup>[1]</sup>:丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、金属蛋白酶。它们往往能降解原料乳中的酪蛋白,导致原料乳变苦和凝胶并影响奶酪发酵<sup>[22]</sup>。嗜冷假单胞菌产蛋白酶能力强,分泌的蛋白酶主要为金属蛋白酶,具有耐热性,主要通过降解酪蛋白引起原料乳变质。

大多数嗜冷假单胞菌产蛋白酶能力强。其产蛋白酶的温度分布范围广泛,在 15~30℃ 都产蛋白酶<sup>[3]</sup>。少数假单胞菌如莓实假单胞菌(*P. fragi*) 在 30℃ 不产蛋白酶。许多假单胞菌在原料乳中 22℃ 生长两天,就能产生至少一种耐热的蛋白酶,这些蛋白分子量相似,在 39.2~45.3ku 之间<sup>[7]</sup>。假单胞菌产酶的能力和核糖核酸型有关,相同的核糖核酸型通常含有相同的胞外蛋白酶活、卵磷脂酶活和脂肪酸酶活<sup>[18]</sup>。

假单胞菌分泌的金属蛋白酶,其活性中心金属离子为锌或钙离子,催化最优 pH 是 6.5~8<sup>[1,7]</sup>。假单胞菌的蛋白酶具有耐热性,在 pH 为 7 的缓冲液中,77℃ 加热 17s 后仍然保持 55%~65% 的活性,140℃ 加热 5s 后仍然保持 20%~40% 的活性<sup>[7]</sup>。

假单胞菌蛋白酶主要降解原料乳中的酪蛋白,对乳清蛋白的降解很少<sup>[17,23]</sup>。蛋白酶降解酪蛋白,会导致原料乳的物理化学性质发生明显变化,包括原料乳沉积,Zeta 电势和酪蛋白胶束水合作用降低,以及释放出多肽<sup>[24]</sup>。假单胞菌蛋白酶对  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白、 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白、 $\beta$ -酪蛋白和  $\kappa$ -酪蛋白的降解能力是不同的,其中荧光假单胞菌蛋白酶对酪蛋白降解能力的大小顺序是  $\beta$ -酪蛋白 >  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白 >  $\kappa$ -酪蛋白 =  $\alpha_{s2}$ -酪蛋白<sup>[25]</sup>。

荧光假单胞菌蛋白酶 AprX 的研究最深入。AprX 蛋白属于 serralysin 家族<sup>[26]</sup>,是耐热蛋白酶,对四种酪蛋白都有降解作用。AprX 对酪蛋白降解没有特定的剪切位点,具有广谱的催化活性。AprX 对  $\kappa$

酪蛋白的降解是导致酪蛋白胶束水合能力以及 zeta 电势下降的主要因素。当原料乳中 AprX 浓度达到 0.2mg/L 时,就会引发酪蛋白胶束的水解,在这个浓度下,只需要 8d 时间,就会导致 UHT 奶出现沉淀<sup>[25]</sup>。

## 2 原料乳中嗜冷假单胞菌的检测

随着乳制品工业的发展,快速、灵敏并同时能评估嗜冷假单胞菌以及胞外酶的危害性,是对嗜冷假单胞菌检测提出的新要求。

传统的平板培养分离方法,其优点是能根据特征颜色反应直观地鉴别微生物并反映活菌数<sup>[27]</sup>,然而检测时间长,重复性低<sup>[28]</sup>。近些年,一些新型快速检测方法,如实时定量 PCR、环介导等温扩增、荧光原位杂交、流式细胞技术、ATP 生物发光技术<sup>[29]</sup>等技术已经得到开发和应用。其中荧光原位杂交<sup>[30]</sup>、流式细胞等技术<sup>[31]</sup>能快速检测嗜冷假单胞菌,并对活菌计数,可以达到和平板计数一致的结果。多重 PCR 结合微阵列荧光显色方法,能快速检测嗜冷假单胞菌的同时,还能同步检测其他目标细菌<sup>[32]</sup>。然而由于并不是所有的嗜冷假单胞菌对原料乳都有破坏性影响,对其快速检测并活菌计数不能反映嗜冷假单胞菌的真实危害性。

针对嗜冷假单胞菌危害性基因设计引物,运用随机多样性扩增 PCR (Randomly amplified polymorphic DNA - PCR, RAPD - PCR) 结合 16S rRNA 测序分析<sup>[4,10]</sup>可以对嗜冷假单胞菌进行快速检测并反映其危害性。当前对嗜冷假单胞菌比较关注的危害性基因是碱性金属蛋白酶基因 *apr* (alkaline metalloprotease)<sup>[26]</sup>。其中碱性金属蛋白酶基因 *aprX* 基因研究最多,*aprX* 编码的碱性金属蛋白酶 *AprX*,能降解酪蛋白引发原料乳变质<sup>[25]</sup>。*aprX* 作为标志性危害基因能检测大部分的假单胞菌。如 Marchand 等人在调查的 55 种假单胞菌中,用 *aprX* 基因为 PCR 检测引物,能检测到 42 种<sup>[7]</sup>。然而,以 *aprX* 为标记基因检测不出另一个重要的污染假单胞菌-海雀假单胞菌<sup>[7]</sup>。不过,另一个标记基因-氨甲酰磷酸合成酶基因 *carA* 可以检测海雀假单胞菌,但是 *carA* 基因不适合检测荧光假单胞菌<sup>[10]</sup>。因此,这两个基因标记在嗜冷菌的检测中可以互补使用。

*aprX* 基因还存在于几种嗜冷荧光假单胞菌中<sup>[17]</sup>,可以用于评估荧光假单胞菌的不同变型对原料乳的危害。由于基因 *aprX* 位于操纵子区域,负责编码脂肪酶、蛋白酶阻抑物、蛋白酶分泌装置 (proteasesecretion apparatus) 和转运蛋白 (autotransporter proteins)。这个操纵子在不同菌株间的组织结构是不一样的<sup>[17]</sup>。例如荧光假单胞菌 F 和 CIP7325 的基因结构是 *aprX-inh-aprD-aprE-aprF*;而只有荧光假单胞菌 ATCC17400 的结构是 *aprX-inh*。因此,对 *aprX* 基因的检测不但可以评估荧光假单胞菌不同亚型的危害性,还可以用于解决荧光假单胞菌分型难题。

以基因 *aprX* 为标记基因,通过 PCR 和 16S rRNA 测序方法,检测牛奶中的嗜冷菌,检测速度快,信息

全面,可以反映嗜冷假单胞菌的真实危害性,但是也有局限。比如,测序结果不能反映原料乳中的活菌数。此外,基因 *aprX* 的检测并不能反映假单胞菌分泌蛋白酶 *AprX* 的水平。因为蛋白酶 *AprX* 产生水平和 *aprX* 基因的表达和调控有关,所以 *aprX* 基因的检测还不能真正评估胞外蛋白酶对牛奶的腐败危害<sup>[17]</sup>。

酶联免疫法可以直接检测牛奶中污染微生物胞外蛋白酶<sup>[33]</sup>。然而此方法的局限在于需要针对不同的蛋白酶制得对应的免疫蛋白,而且酶联免疫的广谱性不强,成本较高<sup>[7]</sup>。因此,开发快速、灵敏并同时能评估嗜冷假单胞菌以及胞外酶危害性的检测方法,仍然需要进一步的研究。

## 3 原料乳中嗜冷假单胞菌的灭菌工艺

随着消费需求的提升,消费者对牛乳营养品质的要求也不断提高。怎样在有效杀灭致病菌和其他污染菌的同时,最大程度地保存原料乳中活性蛋白、维生素等营养物质,是新型杀菌工艺的研究方向。

传统的杀菌工艺如低温杀菌(60~66℃,5~20s),巴氏杀菌(72℃,15s)和超高温灭菌(如143℃,3s)等灭菌工艺能对嗜冷菌有效地杀灭和控制<sup>[21]</sup>,但是加热工艺容易带来原料乳活性营养成分的破坏。另外,添加过氧化物酶或者天然蛋白酶的抑制剂,加产细菌素的乳球菌和嗜热乳酸杆菌,对原料乳充二氧化碳或氮气等方法也能抑制嗜冷菌生长以及蛋白酶分泌<sup>[21,13-14]</sup>,但是这些方法并不能很好地杀灭和控制嗜冷菌。因此,新型非加热处理工艺,如高压脉冲电场(Pulsed Electric Fields, PEF)<sup>[34]</sup>,高强度光脉冲场(High Intensity Light Pulses, HILP)<sup>[35]</sup>,超声技术<sup>[36]</sup>等成为关注的杀菌技术。

低温加热结合新型非加热工艺的组合使用,以及运用合适的数学模型优化灭菌条件是当前原料乳新型灭菌工艺的研究热点。其中超声技术和高压脉冲电场已经应用到原料乳中嗜冷假单胞菌的控制研究中。

压力加热超声(Manothermosonication, MTS)可以对原料乳中的嗜冷荧光假单胞菌有较好的杀灭效果,在温度(36℃),声强度(90W/cm<sup>2</sup>),处理时间(240s)和恒定压力(225kPa)下,可以将荧光假单胞菌(*P.fluorescens*)数量降低至 1.6log CFU/mL。中心复合响应面模型(Central Composite Response Surface Model, ccRSM)分析表明 MMTS 对荧光假单胞菌(*P.fluorescens*)消灭效果是呈线性趋势的,这个模型是预测 MTS 对生奶中常见微生物失活效果的良好方法<sup>[37]</sup>。

高压脉冲电场(PEF)技术可以在低温极短时间对荧光假单胞菌进行杀灭。在 32.5℃,电场 42.5kV/cm 和处理时间 106μs 的条件下,就可以使荧光假单胞菌(*P.fluorescens*)数量下降 10<sup>5</sup> 左右<sup>[38]</sup>。若继续提高灭菌温度,或者和超声、高强度光脉冲场等技术联用 PEF 还能够达到更好的杀菌效果。PEF 影响杀菌效果的主要因素是电场强度,高压脉冲电场电穿孔作用能破坏各种微生物的细胞膜,这是其杀菌的主要

原理。PEF 能够对产品批次处理或者连续处理。杀菌时间短,能广谱性杀菌,而不会改变原料乳的风味和营养,是近几年研究的热点<sup>[39]</sup>。

目前还没有高强度光脉冲场(HILP)对原料乳中假单胞菌灭菌效果的研究,但已有文章报道了 HILP 对原料乳中大肠杆菌和李斯特菌灭菌效果<sup>[35]</sup>。

除了物理电学的方法,微生物控制荧光假单胞菌的技术也在研究中。Monique R. Eller 等<sup>[40]</sup>人尝试用噬菌体控制食品中的荧光假单胞菌,从巴西乳品工业废水中分离到荧光假单胞菌噬菌体,并得到完整的基因序列。为进一步研究打下了良好基础。然而噬菌体对假单胞菌控制研究刚刚起步,同时噬菌体的使用安全性也需要进一步研究。

#### 4 嗜冷假单胞菌研究展望

随着基因和生物信息技术的进步,新型检测方法对假单胞菌在原料乳生产、储存和加工中的危害研究更加深入细致。开发快速、灵敏并同时能评估嗜冷假单胞菌以及胞外酶的危害性的检测方法,仍然是需要解决的问题。特别是对荧光假单胞菌分型、鉴定并进行危害风险的评估,不仅需要寻找合适标记基因,更需要结合新型的快速检测技术。

虽然新型非加热杀菌工艺,能够实现在杀灭嗜冷假单胞菌及其他污染微生物的同时,最大程度地保留牛乳的营养和风味,但是这些新型工艺仍然处在实验室研究阶段,成本较高,需要新型的数学模型优化工艺。因此,运用新的数学模型,优化新型非加热杀菌工艺,降低成本,并将这些工艺工业化,仍需深入研究。

#### 参考文献

[1] Chen L, Daniel R M, Coolbear T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders [J]. International Dairy Journal, 2003, 13(4): 255-275.

[2] Rao M B, Tanksale A M, Ghatge M S, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 1998, 62(3): 597-635.

[3] Franciosi E, De Sabbata G, Gardini F, et al. Changes in psychrotrophic microbial populations during milk creaming to produce Grana Trentino cheese [J]. Food Microbiology, 2011, 28(1): 43-51.

[4] Munsch - Alatosava P, Alatosava T. Phenotypic characterization of raw milk - associated psychrotrophic bacteria [J]. Microbiological Research, 2006, 161(4): 334-346.

[5] Munsch - Alatosava P, Alatosava T. Antibiotic resistance of raw-milk-associated psychrotrophic bacteria [J]. Microbiological Research, 2007, 162(2): 115-123.

[6] Chen T R, Wei Q K, Chen Y J. *Pseudomonas* spp. and *Hafnia alvei* growth in UHT milk at cold storage [J]. Food Control, 2011, 22(5): 697-701.

[7] Marchand S, Vandriesche G, Coorevits A, et al. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 133(1-2): 68-77.

[8] Eneroth A, Christiansson A, Brendehaug J, et al. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora [J]. International Dairy Journal, 1998, 8: 829-834.

[9] Wiedmann M, Weilmeier D, Dineen S S, et al. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2085-2095.

[10] Ercolini D, Russo F, Ferrocino I, et al. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk [J]. Food Microbiology, 2009, 26(2): 228-231.

[11] 张阳阳. 上海地区原料乳中嗜冷菌的筛查及高产蛋白酶嗜冷菌产酶培养基的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.

[12] Hantsis - Zacharov E, Halpern M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(22): 7162-7168.

[13] Vianna P C, Walter E H, Dias M E, et al. Effect of addition of CO<sub>2</sub> to raw milk on quality of UHT-treated milk [J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(8): 4256-4262.

[14] Munsch - Alatosava P, Gursoy O, Alatosava T. Potential of nitrogen gas N<sub>2</sub> to control psychrotrophs and mesophiles in raw milk [J]. Microbiological Research, 2010, 165(2): 122-132.

[15] Rasolofoa E A, St - Gelais D, LaPointe G, et al. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 138(1-2): 108-118.

[16] Palleroni N J, Kunisawa R, Contopoulos R, et al. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas* [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1973, 23: 333-339.

[17] Dufour D, Nicodeme M, Perrin C, et al. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(2): 188-196.

[18] Dogan B, Boor K J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 130-138.

[19] Marchand S, Heylen K, Messens W, et al. Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples [J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(2): 467-482.

[20] Ercolini D, Russo F, Blaiotta G, et al. Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the *carA* gene [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(7): 2354-2359.

[21] Sorhaug T, Stepaniak L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects [J]. Trends in Food Science & Technology, 1997, 8: 35-41.

[22] Fajardo - Lira C, Oria M, Hayes K D, et al. Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from

*Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83(10): 2190–2199.

[23] Rajmohan S, Dodd C E, Waites W M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93: 205–213.

[24] Baglinière F, Tanguy G, Jardin J, et al. Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: Implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(4): 2593–2603.

[25] Baglinière F, Matéos A, Tanguy G, et al. Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilisation [J]. *International Dairy Journal*, 2013, 31(2): 55–61.

[26] Martins M L, de Araujo E F, Mantovani H C, et al. Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 102(2): 203–211.

[27] Bochner B R. Global phenotypic characterization of bacteria [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, 33: 191–205.

[28] Vithanage N R, Yeager T R, Jadhav S R, et al. Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 189: 26–38.

[29] 于艳艳, 丁甜, 刘东红. 原料乳中嗜冷菌快速检测新技术研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(11): 359–367.

[30] Yamaguchi N, Kitaguchi A, Nasu M. Selective enumeration of viable Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. in milk within 7h by multicolor fluorescence in situ hybridization following microcolony formation [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(6): 746–750.

[31] Yamaguchi N, Ohba H, Nasu M. Simple detection of small amounts of *Pseudomonas* cells in milk by using a microfluidic device [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(6): 631–636.

[32] Chiang Y C, Tsen H Y, Chen H Y, et al. Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria*

*monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 88(1): 110–116.

[33] Matta H, Punj V. An immunoassay for detection of heat-stable proteases from thermophilic psychrotrophic *Bacillus* spp. of dairy origin [J]. *Microbiological Research*, 2000, 155(3): 197–203.

[34] Sharma P, Bremer P, Oey I, et al. Bacterial inactivation in whole milk using pulsed electric field processing [J]. *International Dairy Journal*, 2014, 35(1): 49–56.

[35] Palgan I, Caminiti I M, Muñoz A, et al. Effectiveness of High Intensity Light Pulses (HILP) treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(1): 14–20.

[36] Marx G, Moody A, Bermudez-Aguirre D. A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: high hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 151(3): 327–337.

[37] Cregenzán-Alberti O, Halpin R M, Whyte P, et al. Suitability of ccRSM as a tool to predict inactivation and its kinetics for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas fluorescens* in homogenized milk treated by manothermosonication (MTS) [J]. *Food Control*, 2014, 39: 41–48.

[38] Cregenzán-Alberti O, Halpin R M, Whyte P, et al. Study of the suitability of the central composite design to predict the inactivation kinetics by pulsed electric fields (PEF) in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas fluorescens* in milk [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2014, on pressing.

[39] Buckow R, Chandry P S, Ng S Y, et al. Opportunities and challenges in pulsed electric field processing of dairy products [J]. *International Dairy Journal*, 2014, 34(2): 199–212.

[40] Eller M R, Salgado R L, Vidigal P M, et al. Complete Genome Sequence of the *Pseudomonas fluorescens* Bacteriophage UVFV-P2 [J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(1): 1–6.

(上接第 379 页)

群的调节作用 [J]. *食品科学*, 2009, 30(23): 428–431.

[19] Bamman M M, Hill V J, Adams G R, et al. Gender differences in resistance-training-induced myofiber hypertrophy among older adults [J]. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 2003, 58(2): B108–B116.

[20] 孙伟, 王鹏, 丁家桐, 等. 湖羊 Myostatin 和 Myogenin 基因

表达的发育性变化及与屠宰性状的关联分析 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(24): 5129–5136.

[21] 王广. 党参多糖对肠道菌群失调小鼠的调整作用机制的初步研究 [D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2010.

[22] 陈丹丹, 顾胜华, 张金娜, 等. 肠道菌群对免疫系统的影响及其群落分析方法 [J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(3): 542–546.