

原料乳中嗜冷菌污染现状与防控技术研究进展

何梦丽¹, 秦雪¹, 关宁^{2,3}, 郭占辉³, 王易³, 裴晓燕^{2,3}, 满朝新¹, 姜毓君¹, 杨鑫焱^{1*}

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)(2. 国家乳业技术创新中心, 内蒙古呼和浩特 010110)

(3. 内蒙古伊利实业集团股份有限公司, 内蒙古呼和浩特 010110)

摘要: 原料乳营养丰富, 同时也是微生物生长的良好培养基。嗜冷菌污染是影响原料乳品质变化因素之一。嗜冷菌在原料乳低温储藏过程中伴随着产生蛋白酶和脂肪酶, 引起原料乳腐败变质, 受到了乳品企业的高度重视。此外, 原料乳中的嗜冷菌可来源于牧场和加工环境, 且部分嗜冷菌形成的生物膜会持续污染原料乳加工环境。因此了解嗜冷菌在原料乳中的污染现状并建立有效的防控策略对提高原料乳质量意义重大。该文主要综述了原料乳中嗜冷菌污染现状及其危害, 并讨论了原料乳中嗜冷菌污染的影响因素, 基于嗜冷菌所产部分耐热酶可使原料乳品质劣变及所产生生物膜可造成持续性污染, 该文简述了原料乳中嗜冷菌的防控措施, 旨在为提高原料乳品质及降低嗜冷菌对原料乳造成的危害提供参考依据。

关键词: 嗜冷菌; 原料乳; 防控; 蛋白酶; 脂肪酶; 生物膜; 污染现状

文章编号: 1673-9078(2024)11-410-416

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.11.0748

Current Status of Psychrotrophic Bacteria Contamination in Raw Milk and Research Progress on Prevention and Control Technologies

HE Mengli¹, QIN Xue¹, GUAN Ning^{2,3}, GUO Zhanhui³, WANG Yi³, PEI Xiaoyan^{2,3},
MAN Chaixin¹, JIANG Yujun¹, YANG Xinyan^{1*}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)(2. National Center of Technology Innovation for Dairy, Hohhot 010110, China)(3. Inner Mongolia Yili Industrial Group Co. Ltd., Hohhot 010110, China)

Abstract: Raw milk is rich in nutrients and also a good medium for microbial growth. The contamination of psychrotrophic bacteria is one of the factors affecting the quality of raw milk. Psychrotrophic bacteria produce proteases and lipases during low-temperature storage of raw milk, which causes spoilage and deterioration of raw milk, thus has been highly valued by dairy enterprises. In addition, the psychrotrophic bacteria in raw milk can come from pasture and processing environments and the biofilm formed by some psychrotrophic bacteria can continuously contaminate the raw milk processing environment. Therefore, it is of great significance to understand the current status of psychrotrophic bacteria contamination in raw milk and establish effective prevention and control strategies to improve the quality of raw milk. This paper mainly reviews the current status and hazards of the contamination of psychrotrophic bacteria in raw milk, and discusses the influencing factors of the contamination of psychrotrophic bacteria in raw milk. Based on the fact that some of the heat-

引文格式:

何梦丽, 秦雪, 关宁, 等. 原料乳中嗜冷菌污染现状与防控技术研究进展 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(11): 410-416.

HE Mengli, QIN Xue, GUAN Ning, et al. Current status of psychrotrophic bacteria contamination in raw milk and research progress on prevention and control technologies [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(11): 410-416.

收稿日期: 2023-06-19

基金项目: 国家乳业技术创新中心支持项目 (2021- 国家乳创中心 -11)

作者简介: 何梦丽 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 583343019@qq.com

通讯作者: 杨鑫焱 (1992-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 乳品科学与质量安全, E-mail: 413927466@qq.com

resistant enzymes produced by psychrotrophic bacteria can deteriorate the quality of raw milk and produce biofilms which can cause persistent contamination, this paper briefly describes the measures for the prevention and control of the psychrotrophic bacteria in raw milk, aiming at providing reference for the improvement of raw milk quality and the reduction of the hazards caused by psychrotrophic bacteria to the raw milk.

Key words: psychrotrophic bacteria; raw milk; control; protease; lipase; biofilms; contamination status

原料乳是乳制品生产加工的基本原料, 含有多种人体必需营养素。然而, 原料乳中所含的营养物质也为微生物的生长创造了良好的环境, 导致原料乳在低温储藏、生产加工过程中品质降低现象屡屡发生^[1]。

嗜冷菌存在范围广泛, 如土壤和水中都存在一定量的嗜冷菌, 还有少量的嗜冷菌存在空气中^[2]。嗜冷菌的污染是原料乳加工过程中比较常见的污染问题之一。原料乳中常见的嗜冷菌包括革兰氏阴性菌假单胞菌属、沙雷氏菌属、不动杆菌属、气单胞菌属以及革兰氏阳性菌芽孢杆菌属、微杆菌属^[3]。有研究在调查埃塞俄比亚某牛乳加工厂原料乳中存在的微生物时发现嗜冷菌占原料乳中总菌数 98.1%, 从原料乳中分离出的菌有假单胞菌属、芽孢杆菌属^[4]。某研究调查德国北部某州直接销售的原料乳时发现约有三分之一的原料乳微生物污染超过正常水平, 并且以假单胞菌污染为主^[5]。嗜冷菌本身对原料乳造成的危害有限, 常规热处理即可使它们灭活, 但是原料乳中部分嗜冷菌如假单胞菌具有产生脂肪酶和蛋白酶的能力, 部分酶在经过热处理后仍残留酶活, 可以水解乳脂和蛋白质, 使原料乳品质显著下降^[6]。此外, 在原料乳储藏期间, 部分嗜冷菌如假单胞菌可以在原料乳储罐和管道内部形成生物膜。嗜冷菌形成的生物膜不仅会降低原料乳品质, 而且会对食品安全造成一定危害^[7]。因此了解嗜冷菌在原料乳中的污染现状, 开发有效的防控方法对整个乳品行业至关重要。

本文综述了嗜冷菌对原料乳造成的危害如产生耐热蛋白酶和脂肪酶以及生物膜, 并提出了相应的防控策略, 以期在乳制品实际生产中能够降低因嗜冷菌污染造成的危害, 为更好地防止因嗜冷菌污染造成产品质量下降提供理论依据。

1 原料乳中的嗜冷菌

嗜冷菌在自然界分布广泛, 如水、空气和土壤中都有嗜冷菌存在^[8]。近年来, 乳品工业发展迅速, 规模逐渐扩大, 嗜冷菌污染原料乳逐渐成为影响乳

品质的关键因素^[9]。嗜冷菌可存在于原料乳低温储藏、加工运输过程中^[10], 原料乳中嗜冷菌的污染主要为外源污染, 如不洁净的挤奶器、奶牛乳房及贮藏容器等均会导致嗜冷菌污染原料乳^[11]。此外, 原料乳污染的嗜冷菌还具有多样性。Ryu 等^[12]从韩国四个不同省份的 40 个商业奶牛场无菌收集了 40 个原料乳样品, 基于 16S rRNA 基因测序技术和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) 分析原料乳中微生物的多样性, 在原料乳样品中检测到假单胞菌、乳球菌、不动杆菌和黄杆菌等嗜冷菌, 并且发现假单胞菌在四个省份的原料乳中都存在很大占比。袁磊^[7]通过 16S rRNA 基因测序技术鉴定我国 16 个不同地区 / 牧场的原料乳样品中的嗜冷菌, 发现假单胞菌属、黄杆菌属、不动杆菌属和沙雷氏菌属是这些原料乳样品中的主要优势嗜冷菌, 主要的属水平分布如下表所示。雷鸣等^[13]在分析从原料乳中分离的嗜冷菌的微生物多样性时, 发现原料乳中的嗜冷菌主要包括假单胞菌、不动杆菌及黄杆菌。而假单胞菌分泌的耐热蛋白酶是引起原料乳品质劣变的重要因素, 不动杆菌和黄杆菌在低温条件下继续生长繁殖, 若其产生的毒素在加工设备中不断积累, 不仅会影响原料乳品质, 还会引发食品安全问题^[13]。此外, 部分嗜冷菌在低温下具有生物膜形成能力如假单胞菌, 生物膜一旦形成, 不仅难以通过传统的清洁方式完全除去, 还会对原料乳品质造成破坏^[7]。

2 嗜冷菌的危害

嗜冷菌污染原料乳后会降低原料乳品质, 部分嗜冷菌产生的耐热蛋白酶和脂肪酶在牛乳贮藏期间通过分解蛋白质和脂肪导致牛乳发生沉淀、凝乳和变味, 缩短产品货架期^[14]。此外, 部分嗜冷菌产生生物膜, 引起加工环境的持续性污染。

2.1 嗜冷菌分泌的耐热酶

大多数嗜冷菌能够产生蛋白酶、脂肪酶, 而这些酶部分对热处理有极好的耐受性且能水解原料乳

中的蛋白质、脂肪等^[15], 不仅会降低乳产品的感官体验, 而且会给乳品企业造成一定的经济损失。

表 1 原料乳中的属水平嗜冷菌分布情况

Table 1 Distribution of psychrotrophic bacteria at genus level in raw milk

样品	菌属	比重/%
原料乳	假单胞菌属	58.8
	不动杆菌属	13.3
	黄杆菌属	6.0
	鞘氨醇杆菌属	4.2
	沙雷氏菌属	3.1
	拉恩氏菌属	2.3
	布丘氏菌属	2.1
	金黄杆菌属	1.9
	莱茵海默氏菌属	1.5
	紫色杆菌属	1.5
	气单胞菌属	1.3
	其他	4.0

2.1.1 蛋白酶

由嗜冷菌分泌的部分胞外蛋白酶具有一定的耐热性, 可以在热处理如巴氏杀菌和超高温 (Ultra High Temperature, UHT) 处理后保持部分活性^[15], 残留在牛乳中的蛋白酶会分解乳成分蛋白质, 释放出带苦味的氨基酸和短肽^[16], 不仅会降低感官体验, 而且会使产品保质期缩短。此外, 蛋白酶可分解酪蛋白, 使蛋白发生胶凝化^[17], 进而使 UHT 灭菌乳产生凝块。散装牛奶储存罐和乳品加工厂储存在 4 °C 的原料乳样品中检测到沙雷氏菌的存在, 其产生的热稳定蛋白酶 Ser2 在超高温处理后仍然具有活性, 并且能水解酪蛋白胶束, 导致 UHT 牛奶不稳定^[18]。此外, 部分嗜冷菌产生的耐热蛋白酶如假单胞菌产生的胞外蛋白酶 AprX 空间结构相对稳定^[19], 即使在高温条件下, 其三维结构仍然保持完整, 在热处理后, 尽管酶的活性可能受到影响, 但其在适宜的温度下仍具有良好的复活性^[20]。因此, 如果原料乳中蛋白酶的初始量较大, 则使用单一的热处理将不能达到抑制蛋白酶的目的。

2.1.2 脂肪酶

脂肪酶水解原料乳中的甘油三酯, 导致脂解酸败, 其特征在于产生与丁酸相关的异味^[7]。大多数的脂肪酶在巴氏杀菌后甚至在超高温处理后仍保留部分活性^[21]。

原料乳中的嗜冷菌如假单胞菌、黄杆菌和不动杆菌水解乳脂肪能力较强。大部分假单胞菌在 7 °C

下生长并产生脂肪酶^[22], 部分脂肪酶具有耐热性, 在经过巴氏杀菌和 UHT 处理后, 仍可保留酶活。有研究发现乳源中的嗜冷菌荧光假单胞菌和霉菌假单胞菌所分泌的脂肪酶在经过 65 °C、30 min 处理后, 脂肪酶的酶活残留率分别为 51% 和 37%^[23]。脂肪酶在原料乳加工前的冷藏过程中分解乳脂并释放与风味有关的游离脂肪酸, 且所产游离脂肪酸的种类与菌株种类密切相关^[5]。此外脂肪酶作用于原料乳中的脂类物质产生游离的短链脂肪酸 (丁酸、己酸和辛酸), 短链脂肪酸具有浓郁的口感, 降低乳制品的感官质量^[5]。此外, 产生游离的短链脂肪酸使原料乳酸度升高产生腐败。乳中游离脂肪酸容易被氧化, 会导致乳的风味发生变化, 降低产品质量和货架期。

2.2 嗜冷菌形成的生物膜

部分嗜冷菌如假单胞菌能够形成生物膜, 生物膜一旦形成, 会引起产品加工环境的持续性污染。嗜冷菌形成生物膜的过程如图 1^[24]所示。嗜冷菌形成生物膜以后, 处于生物膜中的细菌比浮游细菌对各种环境压力具有更高的适应性且处在生物膜状态下的嗜冷菌产耐热酶的能力高于所对应浮游状态下嗜冷菌产耐热酶能力^[7], 这提高了耐热酶在原料乳中的产生几率。部分嗜冷菌形成的生物膜已被公认为乳制品行业中致病性的污染源, 是造成设备损坏、能源成本增加、产品变质以及食源性疾病和交叉污染的原因^[7]。此外, 生物膜内部的微生物受到保护, 免受消毒剂的作用, 因此难以通过常规清洁程序去除, 生物膜在食品工业中构成了主要的卫生问题, 损害食品安全。美国曾在多州爆发单细胞增生李斯特菌污染冰淇淋事件, 这次事件的爆发最终追溯到冰淇淋加工设备, 该设备含有难以根除的单细胞增生李斯特菌的生物膜^[25]。

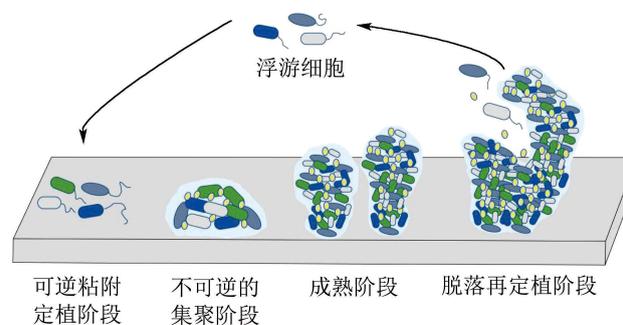


图 1 生物膜形成过程

Fig.1 Biofilm formation process

3 原料乳中嗜冷菌污染的影响因素

3.1 季节影响

环境温度和湿度受季节的变化而改变,其变化对原料乳中的嗜冷菌产生极大的影响^[26]。Li等^[27]基于16S rRNA基因测序技术分析连续一年采集的原料乳样品,发现假单胞菌属、乳球菌属和不动杆菌属是最普遍的属,并且假单胞菌和黄杆菌的相对丰度较高并受气温的影响。有研究发现韩国京畿省冬季原料乳中嗜冷菌的数量高于其他季节,与其他季节存在显著差异^[28,29]。这是因为夏季挤奶器具和冷却器等清洗杀菌尤为彻底^[30]。此外,有研究人员对黑龙江省的原料乳进行研究,发现不同季节其中的嗜冷菌数量有所差异,夏季肠杆菌属、肠球菌属和紫色杆菌属是原料乳中的优势菌群,冬季短波单胞菌属、不动杆菌属是原料乳中优势菌群,结果显示随季节变化嗜冷菌的浓度变化显著,夏季嗜冷菌的丰度高于冬季^[31]; Vithanage等^[32]和 Zucali等^[33]研究分析了夏季原料乳中嗜冷菌丰度更高可能是因为夏季环境湿度和高温促进了微生物的生长。由此可见,原料乳中存在的嗜冷菌在不同国家受季节的影响呈现出不同的趋势^[30]。

3.2 地域影响

在自然环境中嗜冷菌分布极其广泛^[34],不同地域环境对原料乳中的嗜冷菌含量影响很大。有研究人员基于高通量测序对新疆和山东的驴奶中细菌群落进行比较分析,发现两个地区的菌群丰度差异显著,其中山东样品中丰度最高的属是假单胞菌和黄杆菌,新疆样品中丰度最高的属是不动杆菌和黄杆菌^[35]。Guo等^[36]利用中国产奶区分布广的优势,收集了来自中国不同省份的355个农场健康奶牛的原料乳样品以调查地域因素对原料乳微生物的影响,发现宿迁的原料乳样品中乳球菌和不动杆菌的检出率显著高于银川,焦作的原料乳样品中假单胞菌的检出率显著高于其他地区。Xin等^[37]研究了中国北京、黑河和哈尔滨地区牧场的原料乳中嗜冷菌的多样性,发现嗜冷菌群落因地理位置而异。

4 对嗜冷菌污染的防控

近年来,随着科学技术的不断进步,越来越多的防控技术被开发用来降低原料乳被嗜冷菌污染的

风险。相关的防控技术大致可分为三方面:物理、化学和生物防控技术,主要针对原料乳及其加工环境和牧场环境进行防控处理,以降低原料乳中嗜冷菌的污染。虽然目前部分技术在实际生产中的应用较少,但这些技术将为未来更好地防控嗜冷菌提供理论基础,并为乳品企业规避嗜冷菌污染原料乳提供更多的选择。

4.1 物理防控

4.1.1 加压二氧化碳技术

目前二氧化碳被认为是一种防腐剂,二氧化碳的无毒、可回收、环保、廉价等优点可以让消费者放心^[38]。采用加压二氧化碳技术,这是一种非热巴氏杀菌方法,工作压力小于50 MPa和温度小于50 °C,加压二氧化碳技术可以通过降低细胞内和细胞外pH值,使酶失活并可以改变细胞膜通透性来灭活微生物^[39]。CO₂不仅可以抑制嗜冷菌的生长,还可以降低嗜冷菌合成耐热酶,而且不会对原料乳的营养成分产生不利影响^[40]。

4.1.2 高压均质和微滤技术

在乳制品加工过程中常用到高压均质技术^[40],高压均质用于降低酶的活性,并且在标准牛奶样品中观察到这种均质化的显著效果,在100和150 MPa处理的样品中,假单胞菌引起的蛋白水解呈现不同程度的减少,其中150 MPa处理的样品,假单胞菌引起的蛋白水解减少了近一半^[3]。在进行UHT处理前和处理后,双均质化处理可防止由脂肪酶造成的UHT灭菌乳脂肪分解,也显著改善了其贮存期^[41]。微滤是一种从原料乳中物理去除微生物的技术,它减缓肽的蛋白水解和积累,延缓凝胶颗粒和沉淀物的形成,并延长乳制品保质期。微滤后的巴氏杀菌比没有微滤的巴氏杀菌更有效的灭活微生物,这表明微滤后残留的细菌细胞与原料乳中的细菌一样容易受到热处理^[3]。

4.1.3 冷大气等离子体技术

冷大气等离子体(Cold Atmospheric Plasma, CAP)在食品工业中得到了广泛的研究^[24],被认为是一种快速、环保、多功能的抗菌和抗生物膜技术,其活性成分可以协同灭活多种微生物,破坏生物膜中的胞外多糖基质^[24]。冷等离子体的出现为食品行业控制生物膜污染提供了更多选择,促进了食品行业的发展^[42],但建立等离子体剂量与处理效果之间

的精确关系, 并实现等离子体剂量的有效控制, 是解决其实际应用的关键所在^[43]。

4.1.4 脉冲电场技术

脉冲电场 (Pulsed Electric Field, PEF) 已被证明对各种乳制品 (包括牛奶、奶酪、酸奶和发酵乳制品) 中的微生物灭活有效, 是乳制品行业中一种很有前途的可持续非热食品加工技术, 可在不降低牛奶和奶制品的营养、功能和感官特性的情况下最大限度地减少传统热处理的有害影响^[44]。研究表明, PEF 处理可以有效减少腐败菌、酵母菌、霉菌甚至病原微生物的数量, 同时保留处理产品的感官和营养属性^[44]。但由于 PEF 设备体积大、造价高, 且电极在高电压下容易电解, 严重阻碍了 PEF 工业化的推广^[45]。PEF 处理室内场强均匀且需要高电压以达到足够高的电场强度才达到稳定的杀菌效果, 这对高压脉冲发生器提出了较高的要求^[45]。因而研究改进高压电源, 寻找新型电极, 发展新技术、新装备以克服当前 PEF 杀菌中存在的问题是推广其实际应用的关键所在^[45]。

4.2 化学防控

化学消毒剂的投入既可以通过阻断致病菌的生长繁殖, 预防生物膜的产生, 也可以通过杀死成熟生物膜中的细菌, 逐步裂解并清除生物膜^[46]。过氧化氢、过氧乙酸和次氯酸钠是食品行业中常用的广谱消毒剂, 具有显著的杀菌和抗生物膜效果^[24]。高浓度的消毒剂可通过氧化还原反应直接破坏细菌细胞结构杀死细菌, 而低浓度消毒剂的抗菌原理则是引发细菌胞内氧化应激反应, 利用氧化应激产物 (主要成分为过氧化物和自由基) 的毒性作用杀死细菌^[47]。对原料乳储存容器和乳制品生产加工设备采用化学消毒剂消毒抑菌, 可通过抑制嗜冷菌或灭活其产生的胞外酶降低嗜冷菌的危害^[17]。

4.3 生物防控

4.3.1 噬菌体

裂解噬菌体干预措施被考虑作为细菌的抗菌剂。裂解噬菌体与抗生素杀死细菌的机制不同。噬菌体可以感染细菌细胞, 并通过特异性裂解宿主细菌细胞并释放后代, 不断重复这个循环, 从而导致靶细菌减少^[48]。噬菌体具有极高的宿主特异性, 只能感染特定的菌株, 它们对细菌的特异性也决定了它们无法感染人类细胞^[48], 所以其具有一定的安全

性。Wongyoo 等^[49]的研究发现 Φ C106 和 Φ 21A 噬菌体可以作为原料乳中有效的消毒剂, 其不仅可以减少假单胞菌的生长, 还可以抑制蛋白酶的产生。在 Nascimento 等^[50]的一项研究中, 发现两种裂解噬菌体 UFJF_PfDIW6 和 UFJF_PfSW6 可以防止荧光假单胞菌生长和蛋白水解诱导的原料乳变质。Hu 等^[51]发现在 4 °C 和 25 °C 下, 当将噬菌体加入原料奶中时, 在实验储存期间都观察到嗜冷菌和总细菌减少了 1 个对数。Tanaka 等^[29]发现噬菌体在 63 °C 加热 30 min 后, 检测不到其活性。因此, 使用噬菌体感染嗜冷菌可能是减少原料乳中嗜冷菌初始细菌数的合理方法。

4.3.2 抗菌肽

抗菌肽 (Antimicrobial Peptide, AMP) 是一种具有广谱抗菌活性的肽^[52], 通过与带负电荷的细胞膜结合使其形成孔隙, 可导致细菌死亡^[53]。由于其对多种细菌和真菌具有杀菌活性, 可以作为天然的、安全的食品抗菌剂^[54]。同时, 有研究表明, 一些抗菌肽可以有效控制生物膜的形成, 甚至对成熟的生物膜造成破坏。Jannadi 等^[55]的研究发现抗菌肽 Pep19-2.5 和 Pep19-4LF 不仅能够降低变形链球菌的生长及其形成生物膜的能力, 还能够破坏成熟的变形链球菌生物膜。

5 总结

嗜冷菌污染原料乳会对乳品质造成不良影响, 且污染的嗜冷菌多以假单胞菌、不动杆菌和黄杆菌及沙雷氏菌为主。部分嗜冷菌产生的耐热蛋白酶和脂肪酶可以分解蛋白质和脂肪, 使原料乳品质劣变。此外, 嗜冷菌多以生物膜的形式存在环境中, 在挤奶或加工过程中易从生物膜内释放并分散到原料乳中, 对原料乳造成持续性污染。当前防止乳品加工设备接触面上形成生物膜的标准方法是原位清洗, 但其存在局限性, 不能达到彻底清洗的结果, 导致微生物接触表面不断积累并形成生物膜结构并易对产品造成交叉污染。因此采用有效的技术控制原料乳中嗜冷菌污染及嗜冷菌产生的酶和生物膜可减少企业损失并提高乳制品质量。然而当前虽存在许多防控技术如噬菌体干预、冷大气等离子体等, 但真正在实际生产中应用的技术较少。希望未来能够开发更多高效且实际用性强的防控技术。

参考文献

- [1] 邱月,秦雪,马钰,等.原料乳中腐败微生物对液态乳品质的影响及防控[J].食品安全质量检测学报,2023,14(16):8-15.
- [2] 王敏,张小玲.规模牧场生鲜乳中嗜冷菌控制措施探究[J].中国奶牛,2023,4:65-68.
- [3] YUAN L, SADIQ F A, BURMØLLE M, et al. Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: a review [J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(7): 1148-1159.
- [4] MAHARI T, GASHE B A. A survey of the microflora of raw and pasteurized milk and the sources of contamination in a milk processing plant in Addis Ababa, Ethiopia [J]. Journal of Dairy Research, 1990, 57(2): 233-238.
- [5] BÖHNLEIN C, FIEDLERI G, LOOP J, et al. Microbiological quality and safety of raw milk from direct sale in northern Germany [J]. International Dairy Journal, 2021, 114: 104944.
- [6] YAN M, LUO L, LI D, et al. Biofilm formation risk assessment for psychrotrophic *Pseudomonas* in raw milk by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. LWT, 2023, 176: 114508.
- [7] 袁磊.原料奶中嗜冷菌的潜在危害研究[D].杭州:浙江大学,2020.
- [8] 吴荣荣,王倩,王敏,等.原料乳中嗜冷菌的危害分析及控制研究[J].中国酿造,2008,196(19):13-16.
- [9] 李建洲.新疆地区生鲜乳中嗜冷菌分离鉴定及污染源分析[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2020.
- [10] 张峰,张雅婷,张虹玉,等.原料乳加工过程中嗜冷菌研究进展[J].工业微生物,2021,51(3):53-59.
- [11] 洪青,李楠,刘振民.原料乳中嗜冷菌快速检测与控制技术研究进展[J].乳业科学与技术,2019,42(6):41-45.
- [12] RYU S, PARK W S, YUN B, et al. Diversity and characteristics of raw milk microbiota from Korean dairy farms using metagenomic and culturomic analysis [J]. Food Control, 2021, 127: 108160.
- [13] 雷鸣,胡楠,王远一飞,等.低温储存条件对原料乳嗜冷菌及细菌多样性的影响[J].中国乳品工业,2019,47(7):14-18.
- [14] 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 Microbiology, 2019, 79: 11-19.
- [15] CORRÊA A P F, DAROIT D J, VELHO R V, et al. Hydrolytic potential of a psychrotrophic *pseudomonas* isolated from refrigerated raw milk [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2011, 42(4): 1479-1484.
- [16] YUAN L, SADIQ F A, BURMØLLE M, et al. Insights into bacterial milk spoilage with particular emphasis on the roles of heat-stable enzymes, biofilms, and quorum sensing [J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(10): 1651-1660.
- [17] 朱雅玲.浅谈如何控制生鲜乳中的嗜冷菌[J].中国乳业,2013,137(5):49-50.
- [18] BAGLINIERE F, SALGADO R L, SALGADO C A, et al. Biochemical characterization of an extracellular heat-stable protease from *Serratia liquefaciens* isolated from raw milk [J]. Journal of Food Science, 2017, 82(4): 952-959.
- [19] ZHANG C, BIJL E, SVENSSON B, et al. The extracellular protease AprX from *Pseudomonas* and its spoilage potential for UHT milk: a review [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(4): 834-852.
- [20] 邓应旺,韩雪,涂远强,等.牛乳中嗜冷菌产耐热酶的研究进展[J].食品工业,2021,42(6):373-377.
- [21] RIBEIRO JÚNIOR J C, DE OLIVEIRA A M, SILVA F D G, et al. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk [J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(1): 75-83.
- [22] ZHANG D, PALMER J, TEH K H, et al. Identification and selection of heat-stable protease and lipase-producing psychrotrophic bacteria from fresh and chilled raw milk during up to five days storage [J]. LWT, 2020, 134: 110165.
- [23] XIN L, ZHANG L W, MENG Z X, et al. Lipolytic psychrotrophic bacteria and lipase heat-resistant property in bovine raw milk of North China [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2017, 41(6): e13289.
- [24] CHEN Q Y, ZHANG X G, WANG Q Q, et al. The mixed biofilm formed by *Listeria monocytogenes* and other bacteria: Formation, interaction and control strategies [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 17: 1-17.
- [25] FLINT S, BREMER P, BROOKS J, et al. Biofilm Formation and Control in the Dairy Industry [M]. Mcsweeney P L H, Mcnamara J P, editor, Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition), Oxford: Academic Press, 2022: 87-94.
- [26] 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.
- [27] LI N, WANG Y Z, YOU C P, et al. Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions [J]. Scientific Reports, 2018, 8: 2371.
- [28] 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.
- [29] MASANORI K, MATSUI. Bacterial count and flora of bulk cooler storage milk [J]. Japan Animal Husbandry Society, 1974, 45(11): 592-596.
- [30] CREDIT B, LEE H, OH N, et al. Seasonal, regional distribution and sympathy of cold-resistant microorganisms in crude oil [J]. Korean Journal of Agricultural Science, 2013, 40(1): 27-34.
- [31] YANG X Y, GUO X J, LIU W P, et al. The complex community structures and seasonal variations of psychrotrophic

- bacteria in raw milk in Heilongjiang Province, China [J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2020, 134: 110218.
- [32] VITHANAGE N R, DISSANAYAKE M, BOLGE G, et al. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential [J]. *International Dairy Journal*, 2016, 57: 80-90.
- [33] ZUCALI M, BAVA L, TAMBURINI A, et al. Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk [J]. *Journal of Dairy Research*, 2011, 78(4): 436-441.
- [34] SALWAN R, SHARMA V, KASANA R C, et al. Bioprospecting psychrotrophic bacteria for serine-type proteases from the cold areas of western himalayas [J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(5): 795-806.
- [35] LUOYIZHA W, WU X, ZHANG M, et al. Compared analysis of microbial diversity in donkey milk from Xinjiang and Shandong of China through high-throughput sequencing [J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109684.
- [36] GUO X, YU Z, ZHAO F, 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]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(10): 10609-10627.
- [37] XIN L, MENG Z X, ZHANG L W, et al. The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows' milk from North China [J]. *International Dairy Journal*, 2017, 66: 34-41.
- [38] SHENG L, ZU L, MA M. Study of high pressure carbon dioxide on the physicochemical, interfacial and rheological properties of liquid whole egg [J]. *Food Chemistry*, 2021, 337: 127989.
- [39] BENITO-ROMAN O, SANZ M T, ILLERA A E, et al. Pectin methyltransferase inactivation by High Pressure Carbon Dioxide (HPCD) [J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2019, 145: 111-121.
- [40] 张树飞,薛玉玲,崔玥,等.牛乳中嗜冷菌及其耐热酶研究进展[J].*中国乳品工业*,2020,48(11):35-38,44.
- [41] D'INCECCO P, ROSI V, CABASSI G, et al. Microfiltration and ultra-high-pressure homogenization for extending the shelf-storage stability of UHT milk [J]. *Food Research International*, 2018, 107: 477-485.
- [42] 胡越,陈倩,刘骞,等.冷等离子体对微生物生物膜抑制作用的研究进展[J].*食品科学*,2021,42(11):271-277.
- [43] 梅丹华,方志,邵涛.大气压低温等离子体特性与应用研究现状[J].*中国电机工程学*,2020,40(4):1339-58,425.
- [44] CAVALCANTI R N, BALTHAZAR C F, MARGALHO L P, et al. Pulsed electric field-based technology for microbial inactivation in milk and dairy products [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2023, 54: 101087.
- [45] 齐梦圆,刘卿妍,石素素,等.高压电场技术在食品杀菌中的应用研究进展[J].*食品科学*,2022,43(11):284-292.
- [46] KHELISSA S, GHARSALLAOUI A, FADEL A, et al. Microencapsulation of benzalkonium chloride enhanced its antibacterial and antibiofilm activities against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(3): 1136-1146.
- [47] 马悦,吴梦洁,李卓思,等.食品接触表面生物被膜形成机制及防控方法研究进展[J].*食品科学*,2023,44(7):276-285.
- [48] WANG D, ZHAO X, WANG H. Recent advances of bacteriophage-derived strategies for biofilm control in the food industry [J]. *Food Bioscience*, 2023, 54: 102819.
- [49] WONGYOO R, SUNTHORNTHUMMAS S, SAWAENGWONG T, et al. Isolation of bacteriophages specific to *Pseudomonas mosselii* for controlling milk spoilage [J]. *International Dairy Journal*, 2023, 145: 105674.
- [50] DO NASCIMENTO E C, SABINO M C, CORGUINHA L D, et al. Lytic bacteriophages UFJF_PfDIW6 and UFJF_PfSW6 prevent *Pseudomonas fluorescens* growth *in vitro* and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage [J]. *Food Microbiology*, 2022, 101: 103892.
- [51] HU Z, MENG X C, LIU F. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Pseudomonas* spp., a novel biological intervention for preventing spoilage of raw milk [J]. *International Dairy Journal*, 2016, 55: 72-78.
- [52] QI S, ZHAO S, ZHANG H, et al. Novel casein antimicrobial peptides for the inhibition of oral pathogenic bacteria [J]. *Food Chemistry*, 2023, 425: 136454.
- [53] KONG J, WANG Y, HAN Y, et al. Octominin: An antimicrobial peptide with antibacterial and anti-inflammatory activity against carbapenem-resistant *Escherichia coli* both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2023, 35: 172-180.
- [54] 余楠楠,陈琛.Nisin抗菌肽在食品抗菌防腐中的应用[J].*食品研究与开发*,2020,41(17):198-204.
- [55] JANNADI H, CORREA W, ZHANG Z, et al. Antimicrobial peptides Pep19-2.5 and Pep19-4LF inhibit *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 133: 103546.