

乳源嗜冷菌及其耐热蛋白酶对乳制品品质的影响

韩晓东¹，王海斌¹，王晓敏²，齐亮亮¹，贾红¹，任利强¹，李君冉^{1*}

[1.蒙牛乳业（察北）有限公司，河北张家口 076450；2.国家市场监督管理总局重点实验室（乳品质量数智监控技术），内蒙古呼和浩特 011517]

摘要：嗜冷菌可在0~5℃低温条件下生长繁殖，并会大量分泌胞外耐热蛋白酶，是造成原料奶及其制品腐败变质的主要诱因。耐热蛋白酶经乳制品常规热处理工艺加工后仍有部分活性残留，可持续分解乳中酪蛋白并与脂肪酶产生协同作用，导致乳制品出现苦味、凝块、分层等品质劣变问题，缩短产品货架期。本文系统梳理了乳源嗜冷菌的定义、菌群分类及污染途径，阐述了蛋白酶的分类、耐热特性及其对乳制品品质的作用机制，同时综述现阶段耐热蛋白酶主流检测方法（福林酚法、ELISA法）与嗜冷菌定量定性检测技术（传统平板培养法、PCR、流式细胞术、第三代基因测序技术）的应用现状，并对比各类方法的技术优势与局限性。此外，本研究结合最新技术进展，从源头防控、精准检测、残留耐热蛋白酶活性抑制三大维度展望未来研究重点，以期为乳制品行业实现嗜冷菌与耐热蛋白酶的高效精准管控、产品品质升级及货架期稳定保障，提供理论依据与实践技术支撑。

关键词：原料奶；嗜冷菌；耐热蛋白酶；影响因素

文章编号：1671-4393（2026）04-0057-08 DOI:10.12377/1671-4393.26.04.10

The Effects of Psychrotrophic Bacteria in Milk and Their Heat-resistant Proteases on the Quality of Dairy Product

HAN Xiaodong¹，WANG Haibin¹，WANG Xiaomin²，QI Liangliang¹，JIA Hong¹，
REN Liqiang¹，LI Junran^{1*}

[1.Mengniu Dairy（Chabei）Co.，Ltd，Zhangjiakou Hebei 076450；2.Key Laboratory of Dairy Quality Digital Intelligence Monitoring Technology，State Administration for Market Regulation， Hohhot Inner Mongolia 011517]

作者简介：韩晓东（1982-），男，河北张家口人，本科，工程师，研究方向为乳品检测；
王海斌（1980-），男，江苏宿迁人，本科，助理工程师，研究方向为食品质量与安全；
王晓敏（1987-），男，内蒙古呼和浩特人，本科，工程师，研究方向为食品质量与安全；
齐亮亮（1991-），男，内蒙古赤峰人，本科，助理工程师，研究方向为食品营养与检测；
贾红（1979-），女，河北张家口人，本科，助理工程师，研究方向为乳品检测；
任利强（1979-），女，河北张家口人，专科，助理工程师，研究方向为食品营养与检测。
***通信作者：**李君冉（1996-），女，内蒙古赤峰人，硕士，助理工程师，研究方向为食品加工与安全。

Abstract: Psychrophilic bacteria can grow and reproduce at low temperatures ranging from 0 to 5 °C and secrete large amounts of extracellular heat-resistant proteases, making them a major cause of spoilage and deterioration of raw milk and its products. Even after conventional heat treatment processes used in dairy production, some residual activity of these heat-resistant proteases remains. These residual proteases continuously break down casein in milk and act synergistically with lipases, leading to quality issues such as bitterness, coagulation, and stratification in dairy products, thereby shortening their shelf life. This paper systematically reviewed the definition, bacterial classification, and contamination pathways of lactobacillus-derived psychrophilic bacteria, and elaborates on the classification, thermostable characteristics, and mechanism of action of proteases on dairy product quality. At the same time, it summarized the current application status of mainstream detection methods for thermostable proteases (Folin-Phenol method, ELISA method) and quantitative and qualitative detection techniques for psychrophilic bacteria (traditional plate culture method, PCR, low cytometry, third-generation gene sequencing technology), and compares the technical advantages and limitations of each method. In addition, this study combined the latest technological progress and from three dimensions of source control, precise detection, and inhibition of residual heat-resistant protease activity, looks forward to future research priorities, in order to provide theoretical basis and practical technical support for the dairy industry to achieve efficient and precise control of psychrophilic bacteria and thermostable proteases, product quality upgrade, and stable shelf life guarantee.

Keywords: raw milk; psychrotrophic bacteria; thermostable proteases; influencing factors

牛奶是一种营养丰富且兼具生物活性的天然食品，在维持生命活动、提供核心营养素来源的同时也为微生物菌落生长提供了适宜的培养基。牛奶含水量约为87%，其余13%的干物质构成了以蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素、矿物质等为主的营养密集体系，为微生物代谢与增值提供了充足的物质基础。目前，低温冷藏与高温处理是抑制原料奶中微生物繁殖、延缓原料奶腐败变质的两大重要技术手段。

原料奶中污染微生物按生长温度可分为嗜冷菌、嗜热菌、嗜温菌，其中多种细菌可产生催化乳中蛋白质和脂肪水解的蛋白酶和脂肪酶^[1]。正常原料奶中约有70种天然酶^[2]，其中，蛋白酶有两类，一类是自身分泌的内源型蛋白酶，如纤溶酶，另一类是外来微生物引入的细菌蛋白酶，此类被认为是影响各类乳制品品质和货架期的重要因素。在0~10 °C的低温条件下，原料奶中以乳酸菌、酵母菌为主的嗜温微生物生长受到抑制，但嗜冷菌既可在0~5 °C

的低温环境中生长繁殖，也能在高于20 °C的条件下良好生长并持续增殖，从而逐步成为乳中的优势微生物菌群。目前，荧光假单胞菌是原料奶低温贮藏过程中最常见的嗜冷菌之一，也是对乳制品品质影响显著的菌株。虽然超高温处理可有效杀灭该菌的菌体，但其在低温条件下分泌的蛋白酶具有较强耐热性，灭菌后仍可能残留部分酶活性，持续水解乳中蛋白质。此外，嗜冷菌还能持续分泌热稳定性胞外蛋白酶和脂肪酶，即使经超高温瞬时灭菌处理也难以被完全灭活。残留的酶活性会引发一系列感官品质劣变，如色泽沉淀、风味异常，并导致脂肪上浮、蛋白质凝块、乳清析出、酸包及胀包等问题^[3]，最终缩短超高温瞬时灭菌乳的货架期。

1 原料奶中嗜冷菌的生态分布与污染途径

1.1 嗜冷菌的定义

自1887年研究者首次从鱼类体内分离出可在0 °C条件下生长的微生物以来，学术界对“嗜冷

菌”这一概念的界定经历了多次修订^[4]。周宗澄^[5]围绕温度、压力及营养条件对深海微生物生命活动的影响开展研究,为低温微生物的认知奠定了早期的理论基础。1975年,Morita^[6]对嗜冷菌进行了系统性定义,将生长温度下限 $\geq 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、上限 $\leq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、最适温度 $\leq 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的微生物界定为真正的嗜冷菌;同时,将在 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下能够生长但最适温度较高的微生物划分为耐冷菌,从而对低温微生物进行了清晰的分类。1998年,辛明秀等^[7]进一步完善了嗜冷菌的分类标准,指出嗜冷菌必须依赖低温环境生长,其最高生长温度不低于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$,最适生长温度不高于 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$,并能在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下正常生长。此后,国际乳品联合会(IDF)提出的分类体系被乳制品行业及学术界广泛采纳,该体系将能在 $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下生长的微生物定义为低温菌,而将在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下生长的微生物定义为嗜冷菌^[8]。统一和规范嗜冷菌的分类与定义,对于生鲜乳中嗜冷菌的精准检测、有效控制及产品品质保障具有重要意义。

1.2 嗜冷菌的分类

目前原料奶中嗜冷菌的主要种属有不动杆菌属(*Acinetobacter*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和链球菌属(*Streptococcus*)等,其中假单胞杆菌属中荧光假单胞菌最为常见^[9]。乳源嗜冷菌微生物种群的组成主要取决于季节、地理区域、储存条件和牧场环境。祁腾等^[10]从陕西和宁夏等地的原料奶中分离发现,假单胞菌属、乳球菌属(*Lactococcus*)、不动杆菌属、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)和葡萄球菌属是嗜冷菌中占比较高的属,嗜冷菌的平均浓度为 3.81 lgCFU/mL 。孙苗^[11]研究表明,在新疆乌鲁木齐市和哈密市采集的驼乳嗜冷菌优势菌株为石面单胞菌属(*Epilithonimonas*),其次为不动杆菌属和克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)。赵利旦等^[12]研究表明,广西地区生水牛乳嗜冷菌优势菌株为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)、隆德假

单胞菌(*Pseudomonas lundensis*)、韩国假单胞菌(*Pseudomonas koreensis*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、约翰不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)、(*Acinetobacter guillouiae*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)等。

1.3 嗜冷菌的主要来源

嗜冷菌作为一类适应性极强的微生物,在自然生态系统中呈现出广泛的分布特性,如水、土壤、空气、饲料及牧草等环境介质均为嗜冷菌的生长与繁殖提供了基础条件^[13]。原料奶中的嗜冷菌污染主要为外源性污染,在原料奶采集环节即可侵入生鲜乳体系。由于生理机能健全的奶牛所分泌的乳汁通常被视为无菌,因此在原料奶生产过程中,外部环境成为嗜冷菌引入的主要途径^[14]。牧场环境、生产加工设备、贮存容器、不洁净的挤奶器及奶牛乳房不洁等因素,均会导致原料奶遭受嗜冷菌的污染^[15]。牧场土壤中广泛存在的假单胞菌属和产碱杆菌属(*Alcaligenes*)等嗜冷菌可通过降雨溅射和扬尘扩散等途径附着于饲草表面或挤奶作业环境;若未经彻底灭菌处理的低温水体作为挤奶器具的清洗用水,其中所含嗜冷菌群可通过残留水分引发原料奶的原发性污染。生产加工设备是嗜冷菌二次污染的关键载体,若挤奶机、储奶罐、输送管道等设备的清洗消毒流程不规范,残留奶垢与水分会形成稳定的生物膜结构,为嗜冷菌提供良好的生存与繁殖环境。此外,奶牛体表亦是不可忽视的污染源,乳房皮肤、乳头及被毛表面附着的嗜冷菌,在挤奶过程中会随乳汁直接进入原料奶;尤其当奶牛乳房清洁不彻底或存在隐性乳房炎时,其体表微生物载量显著升高,其中假单胞菌、不动杆菌属等为主要优势污染菌株,会导致原料奶中嗜冷菌含量超出安全阈值。

2 耐热蛋白酶作用于乳制品的机制及其对品质的影响

2.1 耐热蛋白酶催化酪蛋白水解的机制与产物

在低温储存期间,原料奶内部的嗜冷菌会进入

对数生长繁殖期，尽管后续热处理工艺可实现对其菌体的有效杀灭，但此类菌株在生长过程中分泌的蛋白酶具有显著耐热性，部分菌株所产的胞外蛋白酶在140℃条件下的D值为2~300 s。常规乳制品加工中采用的热处理工艺，难以将这类酶完全灭活，经热处理后，未完全灭活的蛋白酶在降温过程中可逐步重新折叠成具有分解蛋白质能力的原始结构，其残余酶活力仍维持在30%~100%范围内^[16]。在加工前，对原料奶进行冷藏是减缓嗜冷菌生长和保障乳制品质量的关键措施。然而，冷藏并不能完全阻止嗜冷菌的生长，嗜冷菌可以合成磷脂，使其能够适应冷藏温度；同时，还会产生耐热碱性金属蛋白酶、脂肪酶和磷脂酶，导致原料奶感官品质劣变，具体表现为黏度上升、凝胶化和酸败^[17]。针对冷藏原料奶中腐败相关嗜冷菌的遗传多样性研究发现，此类菌株在低温条件下可更显著地诱导蛋白质水解和脂肪分解^[18]。

2.2 耐热蛋白酶与脂肪酶的协同腐败作用

嗜冷菌产生的耐热蛋白酶依据存在位置的不同可分为胞内蛋白酶、胞壁蛋白酶和胞外蛋白酶^[19]；依据活性中心催化机制的差异，可分为天冬氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶与金属蛋白酶4类；依据最适反应pH值不同，可分为酸性蛋白酶、中性蛋白酶及碱性蛋白酶^[20]。Zhang等^[21]研究发现，冷藏时间能够影响假单胞菌的代谢并改变其蛋白酶释放形态，导致更多的活性位点得以暴露，进而促进蛋白酶水解。徐煜等^[22]通过对嗜冷菌菌群的构成及特性分析发现，在其分离出的假单胞菌中有60%的菌株具备分泌耐热蛋白酶的能力。此外，有相当比例的假单胞菌表现出双重产酶特性，即同时具备分泌耐热蛋白酶与脂肪酶的能力。

嗜冷菌分泌的耐热蛋白酶与脂肪酶之间存在协同作用，该作用可导致原料乳中营养成分的降解与感官品质的劣变，最终引发产品腐败变质。一方面，上述两类酶直接作用于原料奶中的核心营养物质：耐热蛋白酶以原料奶中的酪蛋白为主要底物，释放氨基酸，产生苦涩的味道并诱导凝胶化；同

时，脂肪酶可降解甘油三酯，促进脂肪氧化，使原料奶具有强烈的苦味和腐臭味，并引起脂肪漂浮，使原料奶变酸。另一方面，耐热蛋白酶与脂肪酶的协同作用还体现在对乳脂球膜的破坏上，两类酶共同降解乳脂球膜的脂质与蛋白质组分，从而释放脂蛋白脂肪酶和碱性磷酸酶以及附着在乳脂球膜上的内源性酶。因此，嗜冷菌与内源性酶的协同作用会改变原料奶的营养成分，直接导致其变质，进而对巴氏杀菌乳、奶酪、冰淇淋等乳制品的保质期产生不利影响^[23]。

2.3 生物膜对酶释放与乳制品腐败的促进作用

生物膜由嗜冷菌自身分泌的胞外聚合物（包括多糖、蛋白质及核酸等）组成，能够在接触表面形成不可逆的黏附。这一普遍的生存策略使微生物得以在环境中持续定殖，并在不利条件下维持生存。原料奶中的微生物群落（如假单胞菌等）不仅能在乳制品中形成生物膜，也可在实验室条件下形成多物种生物膜。研究表明，在巴氏杀菌前的冷藏阶段，假单胞菌属已能够在不锈钢等材料表面形成生物膜^[24]。这一过程必然伴随着复杂的代谢变化。然而，目前关于原料奶冷藏过程中细菌群落结构与代谢活性变化的研究仍较为缺乏。因此，建立针对嗜冷菌及其相关蛋白酶的检测技术至关重要，该技术可为原料奶的保存与灭菌、奶酪和奶粉的生产加工，乃至乳制品整体安全水平的提升提供重要依据。

3 耐热蛋白酶与嗜冷菌检测技术

3.1 耐热蛋白酶检测技术

3.1.1 福林酚法

在众多耐热蛋白酶活性检测技术中，目前应用最为广泛的方法是福林酚法。其核心检测原理是基于耐热蛋白酶水解特性与化学显色反应之间的关联。在特定温度与pH值条件下构建的反应体系中，耐热蛋白酶能催化酪蛋白底物水解，生成含有酚基的氨基酸（如酪氨酸、色氨酸等）。上述水解产物可与福林酚试剂发生氧化还原反应，生成在特定波长处具有特征吸收的钼蓝与钨蓝复合物。由于酶活

力与反应体系的吸光度成正比,据此可计算出蛋白酶活力。因福林酚法因其较高的精确度、准确度和重现性,能直接反映原料奶中耐热蛋白酶的活力水平,故适用于原料奶耐热蛋白酶活力的精密测定。周欢等^[25]通过优化福林酚法试验条件,采用酶标仪测定原料奶耐热蛋白酶活力,所得结果重复性好、检测效率高,更适用于乳品企业原料奶耐热蛋白酶活力的大规模批量检测。杨旭等^[26]为测定耐热蛋白酶活力,采用福林酚法、邻苯二甲醛衍生比色法和甲醛法进行比较研究,结果表明,福林酚法能更准确地反映出原料奶中耐热蛋白酶的活力水平。

3.1.2 酶联免疫吸附法(ELISA法)

ELISA法是目前实验室常规分析中应用广泛的免疫分析方法,具有灵敏度高、选择性好、结果稳定等优势,其核心原理在于利用酶标记抗体参与免疫反应体系。根据操作模式差异,该方法可分为直接法、间接法、夹心法和竞争法。其中,夹心法为常用形式,其步骤为先将抗原固定于固相载体,随后加入酶标记抗体,形成“夹心结构”,最终在酶催化作用下产生显色反应。在此法中,信号强度与待测抗原浓度成正比^[27]。智可佳^[28]研究表明,ELISA法可为弹性蛋白酶提供一种灵敏度高、成本低、稳定性好的检测方法。徐子豪^[29]的研究采用乳酸菌与碱性蛋白酶复合发酵工艺,并通过ELISA法比较分析了酶解复合发酵后产物的致敏性变化。

3.2 嗜冷菌检测技术

3.2.1 传统平板培养法

在现代分子生物技术问世之前,平板培养法曾是微生物分析领域所采用的唯一方法^[30]。检验人员结合微生物的形态特征、革兰氏染色结果及生理生化反应等多维度的检测分析,完成对目标微生物的鉴定^[31]。针对液体乳中嗜冷菌的计数,《NY/T 1331—2007 乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定》^[32]与《SN/T2552.4—2010 乳及乳制品卫生微生物学检验方法》^[33]第4部分:嗜冷微生物菌落计数,以及国际标准《ISO 17410: 2019 食品链微生物学 嗜冷微生物计数水平法》^[34]中均提出2

种计数方式,分别为6.5℃和恒温培养10 d后进行菌落计数,以及21℃恒温培养25 h后进行菌落计数^[35]。吉玲^[36]的研究表明,采用MPC琼脂培养基在21℃培养25 h的计数结果高于其在6.5℃培养10 d的计数结果,产生差异性的原因为21℃的培养温度不仅能满足专性嗜冷菌的生长需求,还为兼性嗜冷菌提供了更适宜的繁殖条件,进而导致菌落总数显著升高。

3.2.2 聚合酶链式反应技术(PCR)

PCR因其高特异性、高灵敏度及快速高效的优势,已成为微生物检测领域的核心技术之一,为传统培养法检测周期长、操作繁琐且检出限低等问题提供了有效技术路径。步雨珊等^[37]以荧光假单胞菌蛋白酶基因aprX为靶标,设计特异性PCR简并引物,建立原料奶中荧光假单胞菌PCR检测方法;该法特异性良好,检出限为 2.57×10^3 CFU/mL。楼坚等^[38]试验结果表明,PCR快速检测法与传统培养基的鉴定结果具有良好的一致性,证明了PCR检测技术的准确性与可信度。

3.2.3 流式细胞技术(FCM)

FCM采用激光技术、电子物理技术、光电测量技术、电子计算机及细菌荧光化学技术,通过荧光染料对液流系统中的细胞标记物进行定量分析,评估酶活性、细胞膜完整性^[39],从而快速计数原料奶中的单个细菌。采用双荧光染色与双模式激光散射检测散装罐原料奶,可精准识别不良卫生、嗜冷菌及乳腺炎相关菌3类特征菌群,明确原料奶主要污染类型,为牧场污染源追溯与控制提供数据支撑;该法有效降低了传统FCM假阳性率与非特异性信号干扰,显著提高了检测结果的可靠性与准确性。Wnuk等^[40]采用吖啶橙染色结合荧光成像FCM,对市售牛乳中8种微生物进行区分鉴定,结果表明,该法可用于牛乳样品中特定微生物的快速筛选。FCM应用于乳中微生物检测时,其检测结果的准确性易受多重因素干扰,其中,乳样前处理方法的差异、缓冲液类型和荧光染料的选择为关键影响因素。此外,检测人员需熟悉样品处理流程及数据分析方法,对操

作者的专业素养要求较高，导致该技术在牧场实际生产中难以实现广泛应用^[41]。

3.2.4 第三代基因测序技术

第一代基因测序技术以Sanger链终止法为核心原理；第二代基因测序技术凭借通量特性实现了测序效率的大幅提升；而第三代基因测序技术则以单分子测序为显著标志，其核心优势在于无需依赖PCR扩增步骤，理论上支持无长度限制的核酸序列测定，从技术层面突破了前两代测序的局限性^[42]。相较于传统测序技术，第三代基因测序技术的应用优势较为突出：其一，有效降低单碱基错误率，可通过对同一序列的测序错误纠正，显著提升测序准确性；其二，不存在测序偏好性，不受回文序列等特殊序列结构的干扰，弥补了第二代测序技术的固有缺陷，能够有效避免假阳性SNP位点的误判；其三，每个序列均可独立进行比对分析，为精准识别变异位点及类型提供了可靠保障；其四，无需PCR扩增过程，减少了人为因素对测序结果的干扰，且具备超长读长与覆盖均匀性的特征，同时可直接检测核酸分子的甲基化修饰信息，为表观遗传研究提供了直接手段。目前，第三代基因测序技术已在多个研究领域得到广泛应用，与常用的16S rRNA 基因测序相比，其目标区域测序长度更长，精确度也显著提升，其中单分子实时测序技术（SMRT）与单分子纳米孔测序技术（NSMS）是当前应用最为广泛的两类核心技术。SMRT测序技术具有鲜明的技术特点：超长读长能力为基因组组装提供了极大便利，其最长读长可突破20 000 bp^[43]，无需模板扩增的特性不仅适用于极端微生物的基因组研究，还从源头避免了PCR扩增过程中可能引入的序列错误；同时，较短的运行时间使得该技术能够在测序酶失活前获取更长的核酸序列，进一步提升测序效率。NSMS测序技术则基于其超高的空间分辨率与直观的检测原理，已发展成为体系完整、功能独特的单分子生物物理学研究手段，兼具单分子分辨率、读长长、操作便携等独特优势。此外，第三代基因测序技术并非局限于独立应用，还常与其他测序方法联

用以实现优势互补^[44]。在乳制品领域的嗜冷菌研究中，Liang等^[45]即采用SMRT技术对山东省牧场原料奶中嗜冷菌的主要污染源进行了系统分析，结果表明，乳酸菌、不动杆菌和肺炎链球菌作为主要嗜冷菌，其环境来源分别对应饲料、水体及奶牛乳房，为牧场嗜冷菌污染的精准防控提供了科学依据。

4 展望

嗜冷菌在低温繁殖过程中会大量分泌胞外蛋白酶，此类酶的最适作用温度多为20~40℃，且具备极强的低温稳定性，即使在巴氏杀菌（60~70℃）后，仍有30%~50%的酶活性残留，可持续分解乳中酪蛋白，这是导致乳制品出现苦味、凝块、分层等品质劣变的核心机制。当前检测方式仍存在短板，传统平板培养法根据标准不同，需21℃培养25 h或6.5℃培养10 d，检测周期长，无法满足现代乳品工业快速质检的需求；分子生物学方法虽能快速检测嗜冷菌基因，但难以反映菌株的产酶能力；耐热蛋白酶活性检测则依赖紫外分光光度法等，操作繁琐且灵敏度有限。未来研究可围绕三方面突破：一是通过优化挤奶设备抑菌材料、筛选乳房益生菌，整合物联网传感器技术，在挤奶设备中嵌入微生物快速检测模块，实时监测设备表面嗜冷菌污染水平，实现污染预警与设备清洁的智能化联动，弥补传统设备仅依赖人工清洁、难以实现精准防控的短板，推动传统挤奶设备向智慧抑菌装备转型升级；二是整合相关检测技术，实现嗜冷菌数量与耐热蛋白酶活性的实时同步检测，多重荧光定量PCR检测技术优化与试剂盒开发：以嗜冷菌特征基因（*aprX*、*lipA*等）和耐热蛋白酶功能基因为双重检测靶标，设计特异性引物与水解探针，优化多重荧光定量PCR反应体系（如引物浓度、退火温度、延伸时间），消除引物二聚体与交叉反应干扰，实现单管内对嗜冷菌基因与耐热蛋白酶基因的同步扩增与定量；三是利用天然抑菌剂特异性抑制残留耐热蛋白酶活性，从植物（如大豆、茶叶）、微生物、动物源材料中筛选特异性蛋白酶抑制剂，采用溶剂萃取、柱层析等分离

纯化技术, 获得高活性、高特异性的天然抑制剂单体从根本上解决乳制品低温货架期品质劣变问题, 为乳制品行业的品质升级提供技术支撑。

参考文献

- [1] 刘继超, 宋思青, 胡聚峰, 等. 污染原料乳的微生物多样性和溯源研究[J]. 中国乳品工业, 2025, 53 (8): 39-44.
- [2] 包雨飞, 华晓巍, 贺凯茹, 等. 影响原料乳中蛋白酶活性的多因素分析及相关性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16 (2): 72-82.
- [3] 陈刚, 周芳芳, 申玉敏, 等. 乳制品中耐热蛋白酶及其检测方法研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2025, 43 (3): 1-13.
- [4] FORSTER J. Ueber einige Eigenschaften leuchtender Bakterien[J]. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, 1887, 2: 340-344.
- [5] 周宗澄. 温度、压力和营养对深海微生物生命活动的影响[J]. 海洋通报, 1983 (5): 100-104.
- [6] Morita R Y. Psychrophilic bacteria[J]. Bacteriological Reviews, 1975 (39): 144-167.
- [7] 辛明秀, 周培瑾. 低温微生物研究进展[J]. 微生物学报, 1998, 38 (5): 400-403.
- [8] 李晶, 王继华, 崔迪, 等. 嗜冷菌适冷代谢机制的研究[J]. 哈尔滨师范大学自然科学报, 2007, 23 (5): 88-91.
- [9] 邱月. 原料乳中嗜冷菌污染来源分析及荧光假单胞菌生物膜特性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2025.
- [10] 祁腾, 张凤, 韩英, 等. 西北地区各牧场中嗜冷微生物多样性研究[J]. 中国乳品工业, 2024, 52 (12): 23-29.
- [11] 孙苗. 驼乳中嗜冷菌多样性分析及其产酶特性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2024.
- [12] 赵利旦, 黄丽, 韦盘秋, 等. 基于宏基因组学分析广西地区生水牛乳中嗜冷菌多样性[J]. 饲料研究, 2023, 46 (19): 81-86.
- [13] 许文君, 郑楠, 王加启, 等. 基于宏基因组测序对中国北方地区生乳中嗜冷菌的群落结构研究[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55 (8): 3659-3668.
- [14] 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.
- [15] 孙苗, 邵伟, 刘政宇, 等. 乳及乳制品中嗜冷菌多样性的研究进展[J]. 食品工业, 2024, 45 (1): 201-206.
- [16] 辛亮. 原料乳中嗜冷菌多样性研究及LAMP快速检测方法的构建[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.
- [17] Ribeiro Júnior J C, de Oliveira A M, Silva F de G, et al. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101 (1): 75-83.
- [18] Matêos A, Guyard-Nicodème M, Baglinière 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]. International Dairy Journal, 2015 (49): 78-88.
- [19] 邓应旺. 荧光假单胞菌W3胞外蛋白酶对UHT乳品质的影响[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2021.
- [20] 艾雨晴, 陈松骏, 秦娟, 等. 微生物产蛋白酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42 (19): 451-458.
- [21] Zhang D, Palmer J, Teh K H, et al. Milk fat influences proteolytic enzyme activity of dairy *Pseudomonas* species[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020 (320): 108543.
- [22] 徐煜, 刘振民, 游春苹. 原料乳中耐冷菌群及其产酶特点[J]. 乳业科学与技术, 2017, 40 (1): 1-8.
- [23] Roy D, Gagnon M. Biofilm Formation in Dairy: A Food Safety Concern—Introduction[J]. Journal of Dairy Science, 2025, 108 (8): 8098-8100.
- [24] 胡子毅. 利用噬菌体控制原料乳中假单胞菌的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- [25] 周欢, 宋艳梅, 范光彩, 等. 福林酚法高通量测定牛奶中蛋白酶活力的优化[J]. 中国乳业, 2024 (7): 92-97.
- [26] 杨旭, 屈小玄, 郭庆贺, 等. 牛奶中蛋白酶活力测定的方法比较[J]. 中国乳品工业, 2014, 42 (6): 48-51.
- [27] 王晓静, 董婷婷. 免疫检测技术在食品致病因子识别中的应用进展与优化策略分析[J]. 实验室检测, 2025, 3 (16): 145-147.
- [28] 智可佳. 铜绿假单胞菌弹性蛋白酶的异源表达、多克隆抗体制备及间接ELISA方法的建立[D]. 武汉: 湖北大学, 2024.
- [29] 徐子豪. 基于表位筛选蛋白酶复合乳酸菌发酵降低牛乳致敏性的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 中华人民共和国农业部. NY/T 1331—2007 乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定[S].
- [33] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2552.4—2010 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第4部分: 嗜冷微生物菌落计数[S].
- [34] ISO. ISO 17410: 2019 食品链微生物学 嗜冷微生物计数水平法[S].
- [35] 吴杰, 郑楠, 王加启, 等. 乳中嗜冷菌检测和分析方法的研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45 (13): 356-364.
- [36] 吉玲. 生鲜乳中嗜冷菌检验的两种培养条件比较[J]. 中国乳品工业, 2020, 48 (7): 55-57.

[37] 步雨珊, 乔文君, 黄冬成, 等.聚合酶链式反应技术快速检测原料乳中荧光假单胞菌[J].食品安全质量检测学报, 2022, 13 (15) : 4766-4772.

[38] 楼坚, 申雨珂, 刘梦云, 等.牛乳中嗜冷菌的PCR快速检测[J].发酵科技通讯, 2017, 46 (1) : 36-41.

[39] 孙玥.UHT乳贮藏期间蛋白质的变化及其生物利用率[D].哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020.

[40] Wnuk M, LewinskaA.Imaging flow cytometry-based analysis of bacterial profiles in milk samples[J].Food and Bioproducts Processing, 2021 (128) : 102-108.

[41] 吴杰, 郑楠, 王加启, 等.乳中嗜冷菌检测和分析方法的研究进展[J].食品科学, 2024, 45 (13) : 356-364.

[42] 崔玉娟.基因测序技术在食品安全检测中的应用[J].食品安全导刊, 2021 (23) : 173-174.

[43] 柳延虎, 王璐, 于黎.单分子实时测序技术的原理与应用[J].遗传, 2015, 37 (3) : 259-268.

[44] Wang Y, Patil K M, Yan S, et al.Nanopore Sequencing Accurately Identifies theMutagenic DNA Lesion O (6) -Carboxymethyl Guanine and Reveals Its Behavior inReplication[J].Angewandte Chemie, 2019, 58 (25) : 8432-8436.

[45] Liang L, Wang P, Wang Z, et al.Species-level source tracing of psychrotrophicbacteria contamination in raw milk from large-scale farms via SMRT sequencing[J].Food Research International, 2025 (203) : 115840.