

乳品真菌污染及快速检测技术研究进展

Recent advances in rapid detection techniques of fungus contamination in dairy products

杨同香¹ 常小静² 吴孔阳³ 费鹏¹

YANG Tong-xiang¹ CHANG Xiao-jing² WU Kong-yang³ FEI Peng¹

陈俊亮¹ 唐浩国¹ 刘丽莉¹ 康怀彬¹

CHEN Jun-liang¹ TANG Hao-guo¹ LIU Li-li¹ KANG Huai-bin¹

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2. 河南三剑客农业股份有限公司, 河南 漯河 462000; 3. 洛阳师范学院生命科学学院, 河南 洛阳 471934)

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2. The Sunjock Dairy, Henan Agriculture Co., Ltd., Luohe, Henan 462000, China; 3. College of Life Science, Luoyang Normal University, Luoyang, Henan 471934, China)

摘要:真菌及其所产危害物已成为食品中最为严重的污染之一。文章主要就近年来乳及乳制品中真菌污染概况以及真菌快速检测技术相关研究进行概述,对比传统检测方法和快速检测技术在乳品应用概况,可通过进一步改进快速检测技术体系及开发新型检测体系,更好地监控乳品质量,推动乳品行业持续健康发展。

关键词:真菌;乳品;微生物污染;快速检测

Abstract: Fungus and their harmful substances become one of the most serious contamination in food. This article mainly summarizes the researches on the fungus contamination profile and fungus rapid detection techniques in dairy and dairy products in recent years. Comparing the application of traditional detection methods and rapid detection techniques in dairy products, it will improve the rapid detection techniques system and develop new detection system to better monitor the dairy products quality and promote the sustainable and healthy development of the dairy industry.

Keywords: fungus; dairy products; microbial contamination; rapid detection

在食品加工和农业生产过程中,易受到真菌及其所产毒

素危害,控制食品和饲料中霉菌和酵母菌数量仍然是一项重中之重的工作^[1-2]。因此,尽早发现并确定微生物种类、数量、所产危害物质,监视以及抑制真菌生长等研究工作显得尤为重要^[3]。乳及乳制品在生产加工过程中,由于受到原料乳质量、加工工艺、加工环境条件、生产人员技术水平等因素影响,会发生微生物污染事件,另外产品在冷藏、运输、销售等环节也容易被微生物污染。尽管通过一些预防和控制方法,比如生产质量管理规范(GMP)以及技术改进等,微生物污染问题仍然是生产商们面临的重要问题^[4-5]。近年来,研究人员对乳及乳制品中常见食源性致病菌检测技术开展了广泛的研究,主要包括针对沙门氏菌^[6]、蜡样芽孢杆菌^[7]、阪崎肠杆菌^[8]、李斯特菌^[9]和志贺氏菌^[10]等病原菌,同时对其检测技术进行了很好的归纳和分析^[11-12]。针对乳及乳制品中常见真菌检测技术方面研究概述则相对较少,而真菌对乳及乳制品的污染问题依然不能忽视,对其快速检测技术开发一直以来也是相关研究人员关注的问题。因此,文章从乳及乳制品中常见的真菌类型、真菌污染概况、真菌检测技术及污染的质量控制等方面进行概述。

1 乳品中真菌污染概况

全球乳产量持续增长,2016年估计为 $4.988\ 2\times 10^8$ t,消费群体分布在不同年龄段^[13]。然而乳制品易受多种因素影响而引起污染,比如金属、农药和微生物等。在乳品终端销售环节,因发现菌丝体污染引起的产品召回事件频发^[14]。从李雨哲等^[15]对中国东北地区市售干酪中霉菌、酵母的情况调查中也可以发现,大约有20%的干酪存在霉菌或酵母超

基金项目:河南省科技厅科技攻关项目(编号:182102110258);河南省高等学校重点科研项目(编号:18A55004,18B180018);河南科技大学博士科研启动基金项目(编号:09001785)

作者简介:杨同香,河南科技大学讲师,博士。

通信作者:刘丽莉(1974—),河南科技大学教授,硕士生导师,博士。
E-mail: yangliuyilang@126.com

收稿日期:2018-02-20

过现行标准(GB 5420—2010)要求的现象。Shokri 等^[16]通过对伊朗亚兹德省 7 个农场的 70 份骆驼奶样进行分析,发现存在酵母、霉菌及黄曲霉毒素污染。其中鉴定的酵母主要包括假丝酵母属(占比 48.2%)、红酵母属(占比 22.3%)、丝孢酵母属(占比 13.4%),鉴定的霉菌主要是丝菌属(占比 16.1%)。另外对奶样黄曲霉毒素检验分析,发现其中 20 份奶样存在污染,黄曲霉毒素的平均含量达到 45.95 ng/L,最低和最高含量分别为 5.19,150.17 ng/L。

通过传统平板分离培养和现代分子生物学技术的研究,发现受污染的乳及其制品中多源于酵母菌和丝状真菌存在而引起产品变质^[17-19]。Kalamaki 等^[20]通过分子鉴定研究发现开菲尔粒中酵母菌包括 10 个属(*Candida* spp.、*Debaryomyces* spp.、*Galactomyces* spp.、*Issatchenkia* spp.、*Kazachstania* spp.、*Kluyveromyces* spp.、*Pichia* spp.、*Saccharomyces* spp.、*Wickerhamomyces* spp.、*Yarrowia* spp.),酵母菌种类达 14 种。通过对各种动物乳、酸乳及奶酪中真菌的分离和鉴定,不难看出在乳品生产加工过程中,受酵母污染的乳品优势酵母种主要包括:*Debaryomyces hansenii*、*Kluyveromyces marxianus*、*Rhodotorula mucilaginosa*、*Saccharomyces cerevisiae* 等。尽管有些乳制品中酵母数量适度增加,通常不会引起食品安全问题,但是普遍认为其是引起食物腐败的重要因素^[21]。对于丝状真菌污染情况的研究也发现众多不同种属真菌的存在。Lopandic 等^[22]通过随机扩增多态性 DNA-PCR 技术(RAPD-PCR)对奶酪、黄油、酸奶、酸奶油等进行酵母菌的分离和鉴定研究,发现获得的 513 个菌株中,460 个属于子囊菌酵母,53 个属于担子菌酵母类。此外 Buehler 等^[23]从原料奶、奶酪、酸奶等样品中分离得到 361 株真菌,进而对其 ITS 进行 DNA 测序,并经 BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)搜索和 UNITE 数据库(<https://unite.ut.ee/analysis.php>)比对分析,可将这些真菌划分为 3 门 19 属,占比最多的 3 个属分别是青霉属(25%)、德巴利酵母属(18%)和念珠菌属(9%)。Banjara 等^[24-25]研究同样发现,在奶酪中德巴利酵母属真菌所占比例最高,青霉属真菌也普遍存在。

实际上,原料乳及其制品在奶样采集、生产加工、贮藏、运输和销售等环节均可能出现真菌污染问题,比如在产品生产过程中,可能由于空气、包装材料、发酵剂、稳定剂等污染而引入真菌孢子进入酸奶中^[14]。Kure 等^[26]为了找出引起挪威亚尔斯堡奶酪生产过程中霉菌污染的关键点,从不同的生产车间采集空气、牛奶、盐水、机器设备表面、塑料薄膜等样品,通常引起奶酪污染的 *P. commune*、*P. palitans*、*P. solitum* 以及 *P. roqueforti* ss. *Roqueforti* 等霉菌,可以在采集的空气和机器设备表面样品中发现。研究人员^[26]认为通过控制并提高车间空气质量,尤其是包装车间,对于降低霉菌污染事件的发生非常重要。在埃及乳制品市场,奶酪占比最大,对于奶酪生产商来讲,在奶酪贮藏期面临最大的威胁是霉菌污染^[27]。由于生产工艺差别,有些类型的酸奶更容易引起微生物污染,像希腊风味酸奶,以其高蛋白(蛋白含量达 9%~10%)、低脂等著称,通常比其他酸奶生产更复杂,因

此在生产中也增加了微生物污染的风险^[28]。当然还有研究人员^[29]发现在温度较高的季节,加之缺乏有效的冷藏手段,乳品发生污染的可能性通常会更大些。

2 真菌的快速检测技术

通常情况下,由酵母菌污染引起的酸奶产品变质,主要可以通过产品外观、滋味、气味等进行初步判断,比如出现胀袋、酒香味,严重时在产品表面可看到酵母的菌落^[30]。目前对于乳品中真菌的检测,传统检测手段是利用平板培养分离和鉴定的方法,检测时间通常为 5~7 d,具有滞后性,一般很难满足实际生产的需要,且已有众多相关研究^[31-33],本文不再赘述,着重就微生物快速检测技术和分子生物学检测技术进行介绍。

2.1 流式细胞仪快速分析法

在水果制品行业,对于酵母和霉菌污染的评测是一项关键的指标,由 Chemunex 开发的一款 ChemFlow 细胞仪计数系统可以快速对水果制品中的微生物污染情况进行评测^[34]。利用该系统可以在 24~48 h 内实现对 10 g 水果制品中含有 1 个及以上酵母细胞的检出水平,这也很适合用于水果风味酸奶样品中酵母的检测^[35]。

2.2 微生物快速检测系统

随着微生物快速检测系统的完善和发展,乳及其制品中酵母菌和霉菌的检测手段也变得更加快捷。郑东辉^[36]利用 WKJ-II 微生物快速检测仪,该系统是基于计算机视觉技术检测乳制品中的细菌总数、酵母菌和霉菌。在上机测试过程中,通过比色法和微滤富集快速检测酸奶中酵母菌,通过微滤富集、涂片染色快速检测酸奶中霉菌。原铨^[37]利用美国 BioLumix 微生物荧光光电检测系统对酸奶样品检测,可以将原先 5~7 d 的检测时间缩短至 48 h,该检测系统通过染色技术监测霉菌和酵母菌代谢过程,将染色、新光源、光传感器结合在一起的光电检测系统。

2.3 分子生物学快速检测技术

通过分子生物学技术检测食品中的真菌,已经取得显著成效,并广泛应用于实际生产。目前主要有聚合酶链式反应技术(PCR),并在此基础上开发了不同的 PCR 技术,比如反转录 PCR(RT-PCR)、荧光定量 PCR、单链构象多态性-PCR 以及环介导等温扩增技术(LAMP)等^[38-40]。这些技术都体现出对特定基因以及特异性引物的选择和设计,通过合理的试验设计,可以很好地扩增出所需要的目标 DNA,从而利用相关分析方法,判断乳品中微生物菌群的数量和种类。

Vaitilingom 等^[38]利用 RT-PCR 扩增延伸因子(EF-Tu 或者 EF-1 α),实现了对巴氏杀菌奶中细菌、霉菌和酵母的检测。在 4 h 内,轻易检测出的细胞在 10 个/mL,另外还证实该方法可以用在酸奶、啤酒等产品中。Mayoral 等^[41]同样利用 RT-PCR 技术成功地检测出酸奶样品中有活性的马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*),利用该方法可以检出酵母的下限为 10² CFU/mL。Mayoral 等^[30]还开发了一种利用 PCR-培养技术检测酸奶样品活性的马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)方法,通过对污染酵母的

酸奶样品(不少于10 CFU/g)恒温振荡培养24 h,然后进行DNA提取,扩增18S rRNA,可以得到一个251 bp的特异性条带,而未培养的对照酸奶样品则检测不到目标条带。针对马克思克鲁维酵母, Kim等^[39]报道了一种新颖的基于Taqman探针的荧光定量PCR技术,用于快速灵敏地检测开菲尔酸奶发酵过程中该酵母的污染情况,通过试验研究发现,利用该方法可以在2 h内检测出开菲尔酸奶中的马克思克鲁维酵母。相比之下,根据美国FDA细菌学分析手册所提供的标准培养方法用于检测乳制品中酵母的污染,至少需要5~7 d的分离培养时间以及另外2~3 d的时间用于基于基因测序和生化分析鉴定酵母, Kim等^[42]所做的工作在乳品工业上具有更好的应用价值。另外通过叠氮溴化丙锭(PMA)结合qPCR对乳制品样品中活菌DNA进行定量也能快速检测发酵乳中酵母菌。盖冬雪^[43]通过建立的PMA-qPCR方法与标准法(GB 19302—2010)检测酵母菌比较发现,发酵乳中酵母菌PMA-qPCR活菌检测结果与国标法符合率大于86.6%,检测时间约为4 h,该方法作为检测发酵乳中是否存在酵母菌的有力工具,适合乳品加工企业生产线的现场评价。

除此之外, Kasahara等^[44]建立了一种LAMP技术用于快速检测乳品中致病酵母菌(*C. albicans*、*C. glabrata*、*C. tropicalis*、*T. asahii*、*T. mucoides*、*C. parapsilosis*),结果表明该方法灵敏、省时、高效,可以作为一种监测食品质量的简便快速方法。另外利用PCR技术还可以用于快速评估奶酪成熟过程中菌群的动态特征及比例,例如Callon等^[45]借助单链构象多态性-PCR(SSCP-PCR)指纹图谱分析奶酪中酵母菌群情况,主要是通过设计酵母特异性引物,扩增18S rRNA的V4区达到SSCP分析的目的。

3 乳及乳制品中微生物污染的质量控制

随着中国食品安全市场准入制度的建立,食品生产企业面临着严峻考验。对于很多生产企业来说,由于工艺装备简单,技术力量薄弱,控制微生物的污染成为工作的难点,其中温度控制是非常重要的^[46]。Omarak等^[27]研究发现可以通过那他霉素和山梨酸钾的协同作用抑制霉菌的生长,从而延长奶酪的贮藏期。Ollé Resa等^[47]研究则发现那他霉素对酵母菌也有很好的抑菌效果。此外,水活度是影响食品中真菌发育的非生物因素之一, Nguyen Van Long等^[48]建立了基于氯化钠或甘油减少水活度的模型,阐述其在奶酪中对丝状真菌分生孢子萌发和径向生长的影响效果,结果表明通过氯化钠降低水活度能够显著起到抑制真菌效果。

4 展望

开发具有抗真菌活性的优良乳酸菌辅助发酵剂,不仅可以解决酸奶中霉菌和酵母菌污染的问题,还可以适当延长发酵乳制品货架期,有望成为提高酸乳产品稳定性及品质的一把利剑^[49-51]。而作为监测乳品生产过程中是否存在真菌污染的检测技术,今后仍然有很多值得研究和探讨的地方。由于各个乳品生产企业规模、效益、技术水平有较大差异。经济实力雄厚的企业可以通过购置先进的微生物快速检测系

统用于真菌风险评估,而对于中小型乳企业而言,受资金、技术及人才等因素影响,更希望获得简单、快速、低廉的检测方法。随着分子生物学技术的不断发展,利用荧光定量PCR可以很好地解决这一问题。今后可以进一步完善荧光定量PCR体系,比如筛选DNA结合试剂、开发其他引物用于检测更多潜在的微生物^[52]。

随着新科学技术和工具的发展,比如全基因组测序技术将会给尚未认知的乳品微生物研究提供全新的视角,可以用来研究分析那些对产品质量或公众健康有风险的微生物^[53]。本课题组已着手开展乳品中真菌分子标记的开发,借助新的测序技术,探索一种快速检测乳品真菌的方法,以期对乳品真菌污染检测提供新的思路。

参考文献

- [1] HO P H, LUO J B, ADAMS M C. Lactobacilli and dairy probiotics with potential as biopreservatives against food fungi and yeast contamination[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2009, 45(4): 414-418.
- [2] SUN Xiong-dong, SU Ping, SHAN Hong. Mycotoxin contamination of maize in China[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017, 16(5): 835-849.
- [3] AUNSBJERG S D, ANDERSEN K R, KNOCHEL S. Real-time monitoring of fungal inhibition and morphological changes[J]. J Microbiol Methods, 2015, 119: 196-202.
- [4] GARNIER L, VALENCE F, MOUNIER J. Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: an update[J]. Microorganisms, 2017, 5(3): 1-33.
- [5] JAKOBSEN M, NARVHUS J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products[J]. International Dairy Journal, 1996, 6(8/9): 755-768.
- [6] 鄢雷娜, 罗跃华, 刘绪平, 等. 乳制品中常见食源性致病菌检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 137-141.
- [7] CHAVES J Q, DE PAPA E P, RABINOVITCH L, et al. Molecular characterization and risk assessment of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from ultrahigh-temperature and pasteurized milk marketed in Rio de Janeiro, Brazil[J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(7): 1 060-1 065.
- [8] 宋春美, 朱政辉, 李建武, 等. 乳粉中阪崎肠杆菌污染检测试剂盒的研制[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 233-238.
- [9] LAHOU E, UYTENDAELE M. Growth potential of *Listeria monocytogenes* in soft, semi-soft and semi-hard artisanal cheeses after post-processing contamination in deli retail establishments[J]. Food Control, 2017, 76: 13-23.
- [10] 郭瑜, 姚笛, 侯婷婷, 等. 乳中志贺氏菌的荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(10): 127-130.
- [11] 张于, 江涛, 冉健, 等. 牛、羊乳及其乳制品中幽门螺杆菌污染及检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(1): 268-272.
- [12] JANS C, MEILE L, KAINDI D W M, et al. African fermented dairy products-Overview of predominant technologically important microorganisms focusing on African *Streptococcus infantarius* variants and potential future applications for enhanced

- food safety and security[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 250: 27-36.
- [13] WOCHNER K F, BECKER-ALGERI T A, COLLA E, et al. The action of probiotic microorganisms on chemical contaminants in milk[J]. Crit Rev Microbiol, 2017, 44(1): 1-12.
- [14] GOUGOULI M, KOUTSOUMANIS K P. Risk assessment of fungal spoilage: A case study of *Aspergillus niger* on yogurt[J]. Food Microbiol, 2017, 65: 264-273.
- [15] 李雨哲, 王君. 东北地区市售干酪中霉菌、酵母情况调查及标准探讨[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(9): 45-49.
- [16] SHOKRI H, TORABI S. The effect of milk composition, yeast-mould numbers and seasons on aflatoxin M1 amounts in camel milk[J]. Journal of Food Safety, 2017, 37(2): 1-6.
- [17] HAMEED K. Fungal diversity in different types of cheese and the effect of natamycin on their survival during Feta cheese manufacture and storage[J]. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 2016, 3(3): 214-220.
- [18] MBUK E U, KWAGA J K P, BALE J O O, et al. Molecular identification of yeasts associated with raw cow milk from peri-urban farms in Kaduna State, Nigeria[J]. Journal of Yeast and Fungal Research, 2016, 7(5): 39-46.
- [19] LIU Wen-jun, ZHENG Yi, KWOK L Y, et al. High-throughput sequencing for the detection of the bacterial and fungal diversity in Mongolian naturally fermented cow's milk in Russia[J]. BMC Microbiol, 2015, 15: 1-12.
- [20] KALAMAKI M S, ANGELIDIS A S. Isolation and molecular identification of yeasts in Greek kefir[J]. International Journal of Dairy Technology, 2017, 70(2): 261-268.
- [21] BENKERROUM N, BOUGHDADI A, BENNANI N, et al. Microbiological quality assessment of Moroccan camel's milk and identification of predominating lactic acid bacteria[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19(6): 645-648.
- [22] LOPANDIC K, ZELGER S, BANSZKY L K, et al. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques[J]. Food Microbiol, 2006, 23(4): 341-350.
- [23] BUEHLER A J, EVANOWSKI R L, MARTIN N H, et al. Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products[J]. J Dairy Sci, 2017, 100(11): 8 814-8 825.
- [24] BANJARA N, SUHR M J, HALLEN-ADAMS H E. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types[J]. Current Microbiology, 2015, 70(6): 792-800.
- [25] KURE C F, SKAAR I. Mould growth on the Norwegian semi-hard cheeses Norvegia and Jarlsberg[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 62(1/2): 133-137.
- [26] KURE C F, SKAAR I, BRENDHAUG J. Mould contamination in production of semi-hard cheese [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 93(1): 41-49.
- [27] OMBARAK R, SHELABY H. The inhibitory effect of natamycin and potassium sorbate on mold growth in Egyptian fresh soft cheese (Tallaga Cheese)[J]. Alexandria Journal of Veterinary Sciences, 2017, 53(2): 33-37.
- [28] MOINEAU-JEAN A, GUÉVREMONT E, CHAMPAGNE C P, et al. Fate of *Escherichia coli* and *Kluyveromyces marxianus* contaminants during storage of Greek-style yogurt produced by centrifugation or ultrafiltration[J]. International Dairy Journal, 2017, 72: 36-43.
- [29] MOREIRA S R, SCHWAN R F, DE CARVALHO E P, et al. Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2001, 32(2): 117-122.
- [30] MAYORAL M B, MARTIN R, SANZ A, et al. Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique[J]. Int J Food Microbiol, 2005, 105(1): 27-34.
- [31] 周哲本, 李小春, 陈秀英, 等. 乳制品生产中的真菌污染及其消除的研究 I: 乳制品生产中真菌污染的初步调查[J]. 中国乳品工业, 1991, 19(6): 247-252.
- [32] ROHM H, ELISKASES-LECHNER F, BRAUER M. Diversity of yeasts in selected dairy products[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1992, 72(5): 370-376.
- [33] VALDERRAMA M, SILÓNIZ M D, GONZALO P, et al. A differential medium for the isolation of *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis* from dairy products[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(2): 189-193.
- [34] PINDER A C, GODFREY G. Food process monitoring systems[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1993: 231-234.
- [35] GOHNDRONE J, OLSEN C, BACKMAN A, et al. ChemFlow system: rapid detection and prediction of yeast contamination in fruit yoghurt[J]. Voedingsmiddelentechnologie, 1995, 7(2): 95-108.
- [36] 郑东辉. 乳制品中细菌总数、酵母菌和霉菌快速检测方法的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013: 62-65.
- [37] 原铨. 酸奶制品中的霉菌酵母菌快速自动化检测应用[C] // 2012 第五届中国北京国际食品安全高峰论坛. 北京: 北京食品学会, 2012: 189-191.
- [38] VAITILINGOM M, GENDRE F B P. Direct detection of viable bacteria, molds, and yeasts by reverse transcriptase PCR in contaminated milk samples after heat treatment[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(3): 1 157-1 160.
- [39] KIM D H, JEONG D, KANG I B, et al. Development of a rapid and reliable TaqMan probe-based real-time PCR assay for the detection and enumeration of the multifaceted yeast *Kluyveromyces marxianus* in dairy products[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 87: 163-168.
- [40] BLEVE G, RIZZOTTI L, DELLAGLIO F, et al. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4 116-4 122.
- [41] MAYORAL M B, MARTIN R, HERNÁNDEZ P E, et al. A reverse transcriptase PCR technique for the detection and viability assessment of *Kluyveromyces marxianus* in yoghurt[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(9): 2 210-2 216.

(下转第 182 页)

0.58), (1.08±0.01), (0.64±0.01), (4.16±0.01) mg/mL, 表明 EPS 粗品在经过酶解后的综合抗氧化性增强。因此, EPS 酶解产物具有潜在的作为抗氧化产品的应用前景。但本试验未对酶解产物进行进一步分离纯化和表征, 且蜗牛消化酶的分离纯化及其对 EPS 粗品的作用机制尚不明确。后续将针对上述存在问题开展研究。

参考文献

- [1] GERESH S, ADIN I, YARMOLINSKY E, et al. Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp. Molecular weight determination and rheological properties[J]. Carbohydrate Polymers, 2002(50): 183-189.
- [2] 顾宁琰, 刘宇峰. 紫球藻生物活性物质及其应用[J]. 中国海洋药物, 2001, 84(6): 43-81.
- [3] GINZBERG A, COHEN M, SOD-MORIAH U A, et al. Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. Have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk[J]. J Appl Phycol, 2000, 12(35): 325-330.
- [4] HUHEIHEL M, ISHANU V, TAL J, et al. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo* [J]. J Biochem Biophysical Methods, 2002 (50): 189-200.
- [5] IRIT D, RENVEN C, URIELSOD M, et al. Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *P. sp* alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats[J]. British Journal of Nutrition, 2000, 184(4): 469-472.
- [6] MATSUI M M, MUIZZUDDIN N, ARAD S, et al. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties *in vitro* and *in vivo* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2003(104): 13.
- [7] SUN Li-qin, WANG Chang-hai, SHI Quan-jian, et al. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities[J]. International Journal of Biological Macro-molecules, 2009(45): 42-47.
- [8] SUN Li-qin, WANG Ling, ZHOU Yan. Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2012 (87): 1 206-1 210.
- [9] 刘红辉, 李敏. 紫球藻胞外多糖抗氧化和保湿性能的研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(5): 4-6.
- [10] 王文平, 郭祀远. 生物活性多糖的结构及构效关系研究进展[J]. 中华实用中西医杂志, 2006, 9(16): 63-67.
- [11] 刘梅, 陈必链, 陈伟平. 超声波降解紫球藻胞外多糖研究[J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(1): 48-50.
- [12] 刘梅. 超声波降解对紫球藻胞外多糖生理活性的影响[D]. 福州: 福建师范大学, 2008: 6.
- [13] 孙利芹, 王长海, 石全见. 紫球藻多糖的降解及其体外抗氧化活性[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2010, 36(2): 211-215.
- [14] 刘海英, 山成龙. 药用植物大黄对·OH的清除作用的研究[J]. 光谱实验室, 2008, 5(4): 614-617.
- [15] 鲁晶晶, 王远亮, 谢梦琴. 植物乳杆菌 LJ-3 产细菌素的响应面优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 242-246.
- [16] 朱晓阳, 钟海雁, 周波, 等. 油茶籽多酚超声辅助提取的响应面优化[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 166-170.
- [17] 闫巧娟, 韩鲁佳. 酶法脱除黄芪多糖中的蛋白质[J]. 食品科技, 2004(6): 23-26.
- [18] 石恩慧, 李红. 响应面法优化超声提取板栗总苞多酚工艺条件[J]. 中国食品学报, 2013, 13(5): 69-76.
- [19] 王玉丽, 任海伟, 李志忠, 等. 用清除 DPPH 自由基法评价药黑豆色素的抗氧化能力[J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 102-105.
- [20] 倪慧艳, 陈伟, 宋文静, 等. 黄芪多糖抗氧化作用研究[J]. 中医学报, 2017, 32(9): 1 705-1 707.
- [21] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [22] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [23] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [24] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [25] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [26] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [27] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [28] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [29] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [30] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [31] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [32] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [33] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [34] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [35] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [36] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [37] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [38] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [39] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [40] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [41] 王丽华, 段玉峰, 马艳丽, 等. 槐花多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学, 2008, 36(8): 213-217, 228.
- [42] US Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual online: yeasts, molds, and mycotoxins[J/OL][2017-10-31]. <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071435.htm>.
- [43] 盖冬雪. 乳品中细菌与酵母菌 PMA-qPCR 活菌检测方法的建立[D]. 吉林: 吉林大学, 2016: 46-48.
- [44] KASAHARA K, ISHIKAWA H, SATO S, et al. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification assays to detect medically important yeasts in dairy products[J]. FEMS Microbiol Lett, 2014, 357(2): 208-216.
- [45] CALLON C, DELBES C, DUTHOIT F, et al. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses[J]. Syst Appl Microbiol, 2006, 29(2): 172-180.
- [46] VILJOEN B, LOURENSHATTINGH A, IKALAFENG B, et al. Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt[J]. Food Research International, 2003, 36(2): 193-197.
- [47] OLLÉ RESA C P, JAGUS R J, GERSCHENSON L N. Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces [J]. Food Control, 2014, 35 (1): 101-108.
- [48] NGUYEN VAN LONG N, RIGALMA K, COROLLER L, et al. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods [J]. Food Microbiol, 2017, 68: 7-15.
- [49] 孙婷, 张兴昌, 司徒文佑, 等. 乳酸菌对酸奶保鲜作用的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 601-608.
- [50] 李晓婷, 陈忠军. 抑制真菌乳杆菌发酵培养基的优化[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(8): 22-25.
- [51] 李晶, 王鑫, 高鹏飞, 等. 益生菌在酸奶生产过程中对酵母和霉菌污染的控制[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(9): 21-24.
- [52] NGUYEN B H. Development of a rapid detection and quantification method for yeasts and molds in dairy products[D]. Nebraska: University of Nebraska, 2017: 72-74.
- [53] BOOR K J, WIEDMANN M, MURPHY S, et al. A 100-year review: microbiology and safety of milk handling[J]. J Dairy Sci, 2017, 100(12): 9 933-9 951.

(上接第 172 页)