

## 乳粉中嗜热菌污染研究进展

李妍<sup>1,3\*</sup> 张梦娇<sup>1</sup> 刘冠辰<sup>2</sup> 曹佳璐<sup>2</sup> 张列兵<sup>2,3</sup>

(1. 北京工商大学 北京市食品添加剂工程技术研究中心 食品质量与安全北京实验室 北京 100048)

(2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

(3. 食品安全与营养协同创新中心 东北农业大学 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**嗜热菌是乳粉中的常见污染菌,是影响乳粉品质的一个重要因素。本文综述乳粉中嗜热菌的种类、污染源对乳品工业的危害及其控制手段的研究进展,为国内相关领域研究提供参考。

**关键词:**嗜热菌,乳粉,污染,危害,控制

## Research progress on the thermophilic bacteria contamination of milk powder

LI Yan<sup>1,3\*</sup> ZHANG Meng-Jiao<sup>1</sup> LIU Guan-Chen<sup>2</sup> CAO Jia-Lu<sup>2</sup>  
ZHANG Lie-Bing<sup>2,3</sup>

(1. *Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Laboratory for Food Quality and Safety, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China*)

(2. *College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China*)

(3. *Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China*)

**Abstract:** The thermophilic bacilli are an important group of contaminants in milk powder, which are an important factor that influences the quality of milk powder. This review discusses the research progress of the varieties and source of thermophilic bacilli of milk powder, their hazard to dairy manufacture and its control, so as to provide reference for domestic research.

**Keywords:** Thermophilic bacteria, Milk powder, Contamination, Hazard, Control

嗜热菌是乳制品的常见污染菌。他们能够经受巴氏杀菌而存活下来,有些嗜热菌的芽孢甚至可以耐受超高温(Ultra high temperature, UHT)和高压灭菌而存活<sup>[1]</sup>,对乳制品品质存在威胁。不同乳制品因加工工艺差异,终产品中污染的嗜热菌种类和程

度不同。乳粉产品尤其容易被嗜热细菌污染,影响产品品质,并可能危及应用该乳粉加工的其它食品品质。

嗜热菌数量通常被作为乳粉加工过程中卫生控制的一个指标<sup>[2]</sup>。商业乳粉中嗜热菌的数量变化

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31401517); 现代农业(奶牛)产业体系建设专项项目(No. CARS-37); 北京市属高等学校创新团队建设与教师职业发展计划项目(No. IDHT20130506)

\*通讯作者: Tel: 86-10-68984547; 信箱: liyan@th.btbu.edu.cn

收稿日期: 2015-04-24; 接受日期: 2015-06-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-12

很大,主要取决于加工处理条件。有报道分析了新西兰乳业超过 10 年的数据,证实乳粉中嗜热芽孢的数量有时 $<10$  个/g,有时可达到 $>10^5$  个/g。荷兰乳业研究所的两个乳粉研究中也得到过类似的数据<sup>[1]</sup>。国内对乳粉嗜热菌方面的研究很少,袁栋栋等曾对我国不同地区具有代表性的全脂乳粉和婴幼儿配方乳粉样品的嗜热菌污染情况进行了分析,结果证实国产乳粉嗜热菌污染问题普遍存在,几乎所有样本嗜热菌数都超过  $10^2$  CFU/g,部分样本高达  $10^4$  CFU/g,而且婴幼儿配方乳粉的污染更严重<sup>[3]</sup>。

我国作为乳粉生产和消费大国<sup>[4]</sup>,嗜热菌污染问题还未引起足够重视。本文综述国内外对乳粉中嗜热菌方面的研究进展,包括嗜热菌类型、污染源、潜在危害及控制措施等方面,为我国乳粉加工领域嗜热菌污染的控制提供探索的方向。

## 1 嗜热菌检测及乳粉相关的嗜热菌类型

### 1.1 嗜热菌的检测

嗜热菌(Thermophilic bacteria)是指在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  以上能正常发育的菌群<sup>[5]</sup>,其最适生长温度一般在  $50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,最高可在  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  或以上温度生长。嗜热菌种(株)可存在于蓝绿藻、原始细菌、放线菌、厌氧光合细菌、硫细菌、海藻、真菌、芽孢菌、梭状芽孢菌、乳酸菌和其它属中。食品中最重要的嗜热菌存在于芽孢杆菌、梭状芽孢杆菌和嗜热厌氧菌属中<sup>[6]</sup>。

在乳品工业中,嗜热菌及其芽孢是根据所采用的检测手段定义的。大多数分析一致认为:嗜热菌是指其营养体细胞能够在非选择性培养基中,在  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养条件下,48 h 内生长并产生可见菌落的一类细菌<sup>[1,7]</sup>。嗜热芽孢则定义为样品热处理以杀死所有营养体细胞后能够在同样的培养条件下生长并可见菌落的细菌休眠体。但对于检测芽孢时样品的适宜热处理温度和处理时间问题目前仍有争议。在不同的标准和商业方法中,热处理的温度从  $80\text{--}106\text{ }^{\circ}\text{C}$  不等,时间在  $10\text{--}30\text{ min}$  不等。有研究证实,随着热处理强度的增加,复活的芽孢数量会

降低<sup>[1,7]</sup>。

传统方法分离和鉴定嗜热菌主要依据其在较高温度下的生长能力、菌落形态及生理生化试验,发现污染乳粉的主要嗜热菌为嗜热芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) [后被归为嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)]和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)<sup>[8]</sup>。采用分子生物学技术进行鉴定和分型使得乳粉中的嗜热菌分类更精确。Flint 等采用 16S-23S rRNA 基因扩增鉴定了 141 个新西兰乳品中分离的嗜热菌(之前一直被描述为嗜热芽孢杆菌),发现它们分属嗜热烷烃地芽孢杆菌(*Geobacillus thermoleovorans*)和黄热芽孢杆菌(*Bacillus flavithermus*)<sup>[9]</sup>(后被重新分类为 *Anoxybacillus flavithermus*)两个不同的属。

### 1.2 乳粉相关的嗜热菌类型

目前乳粉中可检出的嗜热菌主要包括:嗜热脂肪地芽孢杆菌、*A. flavithermus*、地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),不同地区、不同季节及不同生产条件会影响这些菌的种类和分布。对于新西兰乳粉,Hill 等<sup>[1]</sup>研究来自 11 个不同工厂一个泌乳季的 244 个新西兰市售乳粉样本中的芽孢污染,发现 *A. flavithermus* 和地芽孢杆菌属的菌株占优势;另有研究发现 6 个不同工厂的乳粉中芽孢菌均为 *A. flavithermus* 菌株或其与地芽孢杆菌(*Geobacillus*)混合,并且芽孢菌群或者保持稳定,或者很快地变换<sup>[1]</sup>;然而,Ronimus 等<sup>[10]</sup>采用 RAPD 指纹图谱对来自新西兰 10 个不同工厂的乳粉和生产过程中的浓缩乳样本中分离的 1 470 株嗜热菌进行聚类,并采用部分 16S rRNA 基因序列分析和 API 50CHB 进行鉴定,发现优势嗜热菌除嗜热脂肪地芽孢杆菌和 *A. flavithermus* 外,还有地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌。Rückert 等<sup>[11]</sup>分析了来自 18 个不同国家的乳粉产品的嗜热杆菌污染情况,结果表明 *A. flavithermus*、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪地芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*) 等均有检出。其中,几乎所有的样品(27/28)均有地

衣芽孢杆菌, 占总污染芽孢杆菌数量的 39.2%, 而枯草芽孢杆菌则相对较少, 占 2.9%, 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 发生率最小仅有 0.1%<sup>[11]</sup>。Ronimus 等在南极洲贮存超过 90 年的滚筒干燥乳粉中也检出了低含量的嗜热芽孢菌污染 (<500 CFU/mL), 并且其中的两株优势菌株(地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌)也是现代喷雾干燥乳粉中典型的污染菌<sup>[12]</sup>。Yuan 等分析中国市售 22 个代表性乳粉样品的微生物污染情况发现, 地衣芽孢杆菌、*A. flavithermus*、嗜热脂肪地芽孢杆菌占优势, 其中地衣芽孢杆菌占总污染芽孢杆菌的 36.8%, 分布于 20 个样品中, 具有数量和分布的双重优势, 污染严重的菌数高达  $10^4$  CFU/g<sup>[13]</sup>。

## 2 乳粉中嗜热菌的来源

原料乳并非乳粉中嗜热菌污染的主要来源。就数量而言, 原料乳中的嗜热芽孢杆菌与最终产品的嗜热芽孢杆菌污染状况没有直接的关系<sup>[14]</sup>。大多数情况下原料乳中嗜热菌及芽孢的水平都很低<sup>[15]</sup>。对来自新西兰 47 个牧场的原料乳为期 4 个月的调查显示, 71.9% 的样品中嗜热芽孢数量 <10 个/mL, 仅有 9.4% 的样品 >100 个/mL<sup>[11]</sup>。而且有研究证实, 使用高品质的原料乳, 经过长时间的连续生产, 同样会得到嗜热菌污染严重的乳粉<sup>[16]</sup>。从菌的类型来看, 原料乳中占优势的芽孢杆菌通常为兼性嗜热菌, 例如: 地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌或高温放线菌 (*Thermoactinomyces*)。而乳粉中占优势的除兼性嗜热菌外, 很大一部分为专性嗜热的 *A. flavithermus* 和嗜热脂肪地芽孢杆菌。

乳粉中嗜热菌污染与加工过程本身有直接关系。对乳粉工厂的调查发现, 在一些操作温度处于嗜热菌生长范围内的设备中, 包括巴氏杀菌器的热回收段、奶油分离机、蒸发器预热段以及蒸发器, 很容易分离到嗜热菌<sup>[8,16-17]</sup>。这些菌的一些特性使其非常易于在乳粉工厂中生长和繁殖。包括: (1) 嗜热菌可以在不锈钢表面黏附、生长并形成生物膜<sup>[2,18-20]</sup>, 在不锈钢表面, 衬垫和垫圈部分形成污

垢<sup>[21]</sup>。污垢似乎可以在清洗过程中对芽孢和营养体形成保护, 因此导致下次生产时产品受到污染<sup>[2]</sup>。

(2) 一些设备操作温度处于嗜热菌生长最佳温度范围内(如 45–65 °C), 在此温度嗜热菌可以迅速生长。Flint 利用实验室中模拟乳粉加工设备的不锈钢表面研究了地芽孢杆菌生长情况, 发现其在不锈钢表面的生物膜中的世代时间是 19–32 min<sup>[22]</sup>。(3) 在乳粉加工设备中温度适宜的某些区域, 如预热器的冷却段、蒸发器中嗜热菌会形成芽孢<sup>[16]</sup>。Scott 等跟踪全脂乳粉的整个生产过程中嗜热菌及其芽孢的变化, 证实嗜热菌增殖和芽孢形成的位置是在蒸发浓缩器的预热阶段<sup>[16]</sup>。这些芽孢能够经受剧烈的热处理而存活, 并可在整个乳粉货架期内保持活性(超过 1 年)<sup>[1]</sup>。

正是表面黏附和生物膜的形成, 伴随长期的生产运行过程, 为嗜热菌提供生长时间, 形成足够多的细胞和芽孢, 并随着表面脱落释放到加工的料液中<sup>[23]</sup>。Langeveld 等研究表明预热器管壁上生物膜的脱落能够造成乳中细菌总数成百万倍地增长<sup>[24]</sup>。

虽然整个蒸发过程中的温度都适合嗜热菌生长, 但 Lane 的研究发现随着蒸发过程中物料固形物(TS)浓度增加, 嗜热芽孢杆菌生长逐渐被抑制, 当 TS 达到 45% 时, 几乎不能生长<sup>[25]</sup>。这种情况很可能是因为水分活度降低造成的。对 *A. flavithermus* 菌株的研究也证实 Lane 的结果不仅适用于一种嗜热菌<sup>[26]</sup>。因此, 嗜热菌的数量在蒸发器的后段和喷雾干燥入口处之间应该不会有明显增加(此时浓缩物料 TS 已经增加到 45%–50%)<sup>[1]</sup>。

## 3 嗜热菌可能造成的危害

### 3.1 引起腐败

乳的腐败来自各种污染细菌的代谢活动, 改变了乳的蛋白质、脂肪和碳水化合物的构成, 从而使产品发生功能和感官方面的缺陷。嗜热菌产酸不产气, 一直被认为是造成低酸食品平酸腐败(Flat-sour spoilage)的主要原因<sup>[27]</sup>。虽然嗜热菌对乳成分的实际影响目前还不完全了解, 但 Chen 等对从乳粉生

产线分离到得的 7 株芽孢杆菌研究发现:所有的菌株都产生胞内和胞外蛋白酶及脂酶,并且这些酶都可以在经历乳粉加工过程的热处理后保持活性<sup>[28]</sup>。因此,如果嗜热菌在乳中生长并达到一定的阈值水平(目前还未知),所产生的这些酶可能对所生产的乳粉造成感官或功能上的缺陷,并且也有可能对应用此乳粉加工的产品造成影响<sup>[29]</sup>。

### 3.2 产生毒素

一般来说,除蜡样芽孢杆菌群(*Bacillus cereus*)外,大多数芽孢杆菌都被认为不具有致病性或毒性较低<sup>[30]</sup>,但最近枯草芽孢杆菌群引发食物中毒事件及产毒菌株的报道正在引起人们的重视<sup>[31-32]</sup>。Sinisa 等报道在一起幼儿园食物中毒事件中,从涉及的乳粉中检测到产毒素的地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌,并且证实该乳粉复原乳在室温下存放 2 h 时,这两种芽孢杆菌即可进入对数生长期<sup>[33]</sup>。Salkinoja-Salonen 等也从与婴儿食物中毒死亡事件相关的乳粉中分离到产毒素地衣芽孢杆菌,并发现原料乳及婴儿配方食品中的地衣芽孢杆菌都存在产毒菌株,而且来自婴儿中毒事件的婴儿乳粉中的产毒菌株与来自同品牌的未开封婴儿乳粉产品及原料乳中的产毒菌株的核糖体分型(Ribotype)一致<sup>[34]</sup>。de Jonghe、Lindsay 及 Nieminen 等也先后证实分离自乳品产业链条中的枯草芽孢杆菌菌株适宜条件下能够产生毒素<sup>[35-37]</sup>。说明乳粉中的芽孢杆菌污染确实会带来严重风险。

### 3.3 形成生物膜和产生耐热芽孢

生物膜是微生物细胞与其产生的胞外多糖(EPS)缔结,黏附并在无活性或活体表面生长,形成的具有一定结构的微生物聚集体<sup>[14]</sup>。营养体细胞和芽孢的黏附都可能促使嗜热杆菌生物膜的形成。Parkar 等证实一系列嗜热杆菌,包括地芽孢杆菌、*Anoxybacillus*、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌和短小芽孢杆菌能够以相同数量附着在不锈钢表面和乳垢上,并且芽孢比营养体更容易黏附<sup>[19]</sup>。黏附过程和 EPS 的产生使生物膜内的菌体细胞对不良环境的抵抗力更强<sup>[24]</sup>,为嗜热菌的生存提供了良好的

生长环境<sup>[38-39]</sup>。这类生物膜不仅会给设备的清理造成极大困难,并且在生产过程中也会因为生物膜中菌体易发生脱落直接污染产品。

在乳品环境下,嗜热菌很容易产生芽孢,有些芽孢具有极高的耐热性,可经受高压灭菌及 UHT 灭菌而存活。有研究表明,利用本身污染地芽孢杆菌芽孢的乳粉制备复原乳,采用 UHT (0.4 MPa, 4 s) 和高压灭菌(0.15 MPa, 10 min)处理后不能达到完全灭菌,两种处理后地芽孢杆菌菌数分别降低  $10^{6.4}$ - $10^{7.5}$  和  $10^{5[1]}$ 。Yuan 等的研究也发现,一株分离自国产乳粉中的地芽孢杆菌菌株能耐受 0.15 MPa、15 s 的高温处理而存活<sup>[13]</sup>。这些芽孢可以在乳粉中休眠数十年,等待条件适合时发芽,具有潜在的危害性<sup>[12]</sup>。

## 4 乳粉中嗜热菌污染的控制

乳粉生产商都会采取一系列控制措施,以降低乳粉中嗜热菌及其芽孢污染。例如:

(1) 缩短生产时间(增加清洗频率)。奶油分离机、热交换器、蒸发器预热段和蒸发器的运行持续时间必需受到限制,牛奶处理时间限制在 6-8 h,防止嗜热芽孢杆菌的滋生<sup>[21]</sup>。实际生产中,这种方法必须增加 CIP (Cleaning in place 原地清洗)清洗频率,而一般 CIP 清洗时间在 3 h 左右,频繁 CIP 造成生产时间和水资源的浪费,增加生产成本。

(2) 优化 CIP 清洗系统,使用消毒剂。经过 CIP 清洗后,虽然肉眼观察清洁,但微生物仍可能存在于表面。消毒剂的作用就是清除和杀死表面的微生物细胞,但其安全性依然有待研究<sup>[40]</sup>。

(3) 改变操作温度。由于嗜热芽孢杆菌生物被膜的形成有一定的最适温度区间,选择低于或高于其最适温度区间的温度进行加工处理,例如将奶油分离从  $>50^{\circ}\text{C}$  降低到  $<45^{\circ}\text{C}$ ,可在一定程度上抑制生物膜的形成,减少污染<sup>[41]</sup>。

(4) 采用直接加热式热处理系统。通过直接注入蒸汽,使牛奶的温度迅速升高,避开了嗜热芽孢杆菌最佳生长温度。但与间接加热系统相比,其成

本更高,而且牛奶被蒸汽稀释,需在之后加闪蒸罐进行浓缩<sup>[2]</sup>。

(5) 高风险加工段(如蒸发器和预热器)采用双通道系统。每生产 8–12 h 为一个周期,交替变换产品通道,对停止使用的系统进行中间 CIP,不需要中断整个生产<sup>[2]</sup>。

## 5 建议与展望

近年来,随着乳粉市场规模的成熟及人们对产品品质要求的不断提高<sup>[42]</sup>,嗜热菌污染已成为乳粉加工领域突出的质量问题之一。国际市场普遍认为用于 UHT 和灭菌乳产品用的乳粉中嗜热芽孢数量应该限制在 $<10^3$  CFU/g,甚至应低于 $10^2$  CFU/g,从而确保其不会在商业灭菌处理过程中残存,用于婴儿配方的原料乳粉中嗜热芽孢数则应 $<500$  CFU/g<sup>[1,43]</sup>。尽管各国乳粉生产商不断采取措施防控乳粉中嗜热菌污染,但持续达到这一质量要求仍然是一个挑战<sup>[7]</sup>。我国虽没有明确乳粉中嗜热菌标准,但 2010 年修订的婴幼儿配方乳粉标准提高了微生物指标要求,5 个抽样中有 2 个或以上细菌总数超过 1 000 CFU/g,则该批次产品判定为不合格<sup>[44]</sup>。乳粉嗜热菌污染情况分析表明国产乳粉及婴幼儿配方粉嗜热芽孢杆菌污染严重,其中兼性嗜热的芽孢杆菌可能引起乳粉细菌总数超标<sup>[3]</sup>。对于国内乳粉生产商而言,控制嗜热杆菌污染的问题亟待解决。有必要结合国内乳粉生产加工现状,加强对乳粉中嗜热芽孢杆菌污染来源、生物学特性及安全性方面的研究工作,为提高国产乳粉品质保障安全提供必要的研究基础。

## 参考文献

- [1] Hill BM, Smythe BW. Endospores of thermophilic bacteria in ingredient milk powders and their significance to the manufacture of sterilized milk products: an industrial perspective[J]. Food Reviews International, 2012, 28(3): 299-312
- [2] Burgess SA, Lindsay D, Flint SH. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(2): 215-225
- [3] Yuan DD, Liu GC, Zhang D. A survey of the bacterial quality of the commercial milk powders in China[J]. China Dairy Industry, 2012, 40(7): 37-40 (in Chinese)

- 袁栋栋, 刘冠辰, 张冬, 等. 我国市售奶粉细菌污染情况调查分析[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(7): 37-40
- [4] International Dairy Federation. The World Dairy Situation 2013[J]. Bulletin of the International Dairy Federation, 2013, 470: 13-30
  - [5] Guo BH. Dairy Microbiology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2001: 135 (in Chinese)  
郭本恒. 乳品微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 135
  - [6] Jay JM. Modern Food Microbiology[M]. 7th Edition. Translated by He GQ et al. Beijing: China Agricultural University Press, 2008: 330 (in Chinese)  
杰伊. 现代食品微生物学[M]. 第7版. 何国庆, 等译. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 330
  - [7] Refstrup E. Evaporation and drying technology developments[J]. International Journal of Dairy Technology, 2000, 53(4): 163-167
  - [8] Murphy PM, Lynch D, Kelly PM. Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders[J]. International Journal of Dairy Technology, 1999, 52(2): 45-50
  - [9] Flint SH, Ward LJ, Walker KM. Functional grouping of thermophilic *Bacillus* strains using amplification profiles of the 16S–23S internal spacer region[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2001, 24(4): 539-548
  - [10] Ronimus RS, Parker LE, Turner N, et al. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 85(1/2): 45-61
  - [11] Rückert A, Ronimus RS, Morgan HW. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 96(3): 263-272
  - [12] Ronimus RS, Rueckert A, Morgan HW. Survival of thermophilic spore-forming bacteria in a 90+ year old milk powder from Ernest Shackleton's Cape Royds Hut in Antarctica[J]. Journal of Dairy Research, 2006, 73(2): 235-243
  - [13] Yuan D, Liu G, Ren D, et al. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China[J]. Food Control, 2012, 25(2): 752-757
  - [14] Muir DD, Griffiths MW, Phillips JD, et al. Effect of the bacterial quality of raw milk on the bacterial quality and some other properties of low-heat and high-heat dried milk[J]. International Journal of Dairy Technology, 1986, 39(4): 115-118
  - [15] McGuiggan JTM, McCleery DR, Hannan A, et al. Aerobic spore-forming bacteria in bulk raw milk: factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spores[J]. International Journal of Dairy Technology, 2002, 55(2): 100-107
  - [16] Scott SA, Brooks JD, Rakonjac J, et al. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder[J]. International Journal of Dairy Technology, 2007, 60(2): 109-117
  - [17] Langeveld LPM. Adherence, growth and release of bacteria in a tube heat exchanger for milk[J]. Netherlands Milk and Dairy Journal, 1995, 49: 207-220
  - [18] Flint S, Palmer J, Bloemen K, et al. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel[J]. Journal of Applied

- Microbiology, 2001, 90(2): 151-157
- [19] Parkar SG, Flint SH, Brooks JD. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli—potential consequences for cleaning[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2003, 30(9): 553-560
- [20] Marchand S, de Block J, de Jonghe V, et al. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2012, 11(2): 133-147
- [21] Austin JW, Bergeron G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines[J]. Journal of Dairy Research, 1995, 62(3): 509-519
- [22] Flint S, Palmer J, Bloemen K, et al. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(2): 151-157
- [23] Brooks JD, Flint SH. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2008, 43(12): 2163-2176
- [24] Langeveld L, van Montfort-Quasig R, Waalewijn R, et al. Adherence, Growth and Release of Bacteria in a Tube Heat Exchanger for Milk[M]. Luxembourg: Commission of the European Communities, 1996: 60-70
- [25] Lane AN. Thermophiles in Milk Powder[D]. Palmerston North: Post-Graduate Diploma Dissertation of Massey University, 1982
- [26] Hinton AR. Thermophiles and fouling deposits in milk powder plants[D]. Palmerston North: Doctoral Dissertation of Massey University, 2003
- [27] Ito KA. Thermophilic Organisms in Food Spoilage: Flat-Sour Aerobes[J]. Journal of Food Protection, 1981, 44: 157-163
- [28] Chen L, Coolbear T, Daniel RM. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines[J]. International Dairy Journal, 2004, 14(6): 495-504
- [29] Chen L, Daniel RM, Coolbear T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders[J]. International Dairy Journal, 2003, 13(4): 255-275
- [30] Drobniowski FA. *Bacillus cereus* and related species[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1993, 6(4): 324-338
- [31] Oh M, Cox JM. Toxigenic bacilli associated with food poisoning[J]. Food Science and Biotechnology, 2009, 18(3): 594-603
- [32] Logan NA. *Bacillus* and relatives in foodborne illness[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(3): 417-429
- [33] Sinisa P, Moira B, Ivo P, et al. An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*[J]. Archiv für Lebensmittelhygiene, 2005, 56(1): 20-22
- [34] Salkinoja-Salonen MS, Vuorio R, Andersson MA, et al. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4637-4645
- [35] de Jonghe V, Coorevits A, de Block J, et al. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 136(3): 318-325
- [36] Lindsay D, Mosupye FM, Brozel VS, et al. Cytotoxicity of alkaline-tolerant dairy-associated *Bacillus* spp.[J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 30(5): 364-369
- [37] Nieminen T, Rintaluoma N, Andersson M, et al. Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 124(3/4): 329-339
- [38] Rönner U, Husmark U, Henriksson A. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity[J]. Journal of Applied Microbiology, 1990, 69(4): 550-556
- [39] Flint S, Palmer J, Bloemen K, et al. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(2): 151-157
- [40] Tamime AY. Cleaning-in-Place: Dairy, Food and Beverage Operations[M]. UK: Wiley-Blackwell, 2008: 158
- [41] Burgess SA, Brooks JD, Rakonjac J, et al. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(3): 1012-1018
- [42] Sun BG, Cao YP, Li J et al. Frontier dynamic of food science research[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 32(2): 1-11 (in Chinese)  
孙宝国, 曹雁平, 李健, 等. 食品科学研究前沿动态[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(2): 1-11
- [43] Watterson MJ, Kent DJ, Boor KJ, et al. Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest[J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(4): 2487-2497
- [44] The ministry of health of the People's Republic of China. GB 10765-2010 National Food Safety Standard Infant Formula[S]. Beijing: Standards Press of China, 2010  
国家卫生部. GB 10765-2010. 食品安全国家标准婴儿配方食品[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010