

地衣芽孢杆菌在营养肉汤中生长模型的建立

刘 岩¹, 仪淑敏¹, 励建荣^{*1}, 李学鹏¹, 马永钧²

(1. 渤海大学 食品科学研究院/化学化工与食品安全学院, 辽宁 锦州 121013; 2. 浙江兴业集团有限公司, 浙江 舟山 316101)

摘要: 考察了温度、NaCl 质量分数及 pH 值对地衣芽孢杆菌在营养肉汤中生长特性的影响, 建立了 15~45 °C 下地衣芽孢杆菌的生长模型。结果表明: 地衣芽孢杆菌的最适的生长温度范围为 30~37 °C, NaCl 质量分数范围为 0~3%, pH 值范围为 5.0~8.0。在 15、20、25 °C 时其生长曲线用 MMF 模型拟合较好, 在 30、37 °C 用 Richards 模型拟合较好, 其相关系数较高, 均大于 0.998。相反, 在 45 °C 其生长曲线只能用 Logistic 方程拟合, 且相关系数较低, 仅为 0.907。

关键词: 地衣芽孢杆菌; 营养肉汤; 生长模型

中图分类号: TS 254.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)10—1025—06

Growth Model of *Bacillus licheniformis* in Nutritional Broth

LIU Yan¹, YI Shumin¹, LI Jianrong^{*1}, LI Xuepeng¹, MA Yongjun²

(1. Food Science Research Institute / College of Chemistry, Chemical Engineering and Food Safety, Bohai University, Jinzhou 121013, China; 2. Zhejiang Industrial Group Co., LTD, Zhoushan 316101, China)

Abstract: In this paper, the effects of different temperature and concentration of NaCl and pH value on the growth characteristics of *Bacillus licheniformis* in the nutritional broth were investigated. Meanwhile, mathematical models for the growth of *B. licheniformis* were established from 15 to 45 °C. Results indicated that the optimum growth temperature range of *B. licheniformis* were from 30 to 37 °C, and the NaCl concentration were in the range of 0~3% and pH value were in the range of 5~8. At 15 °C and 20 °C and 25 °C, the growth curves of *B. Licheniformis* could be better fitted out by MMF model. However, they could be better fitted out by Richards model at 30 and 37 °C. The correlation coefficients were quite high and all above 0.998. On the contrary, the growth curve of *B. Licheniformis* at 45 °C could only be fitted out by Logistic model, and the correlation coefficient was quit low, and was only 0.907.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, nutritional broth, growth model

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)属厚壁菌门(Firmicutes)芽孢杆菌科(Bacillaceae), 是一种常

收稿日期: 2014-03-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301418, 31071514); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD29B06)。

* 通信作者: 励建荣(1964—), 男, 浙江慈溪人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事水产品、果蔬贮藏加工及安全控制研究。

E-mail: lijr6491@163.com

见的革兰氏阳性细菌,广泛分布在土壤、空气和腐败有机物中^[1]。地衣芽孢杆菌能够产生多种生物活性物质,包括多糖、蛋白质、非肽类物质,同时还能产生多种酶促因子,能增强动物消化酶的活性,促进养殖动物的生长,提高饲料的利用率^[2-3]。此外地衣芽孢杆菌还能产生胞外酶类,如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等,而鱼糜制品产生的胞外蛋白酶是导致产品腐败变质的主要原因^[4-7]。

鱼糜制品中存在多种腐败菌,其中包括芽孢杆菌,如地衣芽孢杆菌,且已有研究显示,海水鱼的鱼糜制品中存在大量的地衣芽孢杆菌^[8-10]。作者对分离自金线鱼鱼糜制品(鱼丸)中的地衣芽孢杆菌进行了研究,主要研究了其在营养肉汤中的生物学特性并建立了一定温度下的生长模型^[11],从而为研究鱼糜制品贮藏过程中微生物的变化规律提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

地衣芽孢杆菌:分离自金线鱼鱼糜制品(已通过 16S rRNA 技术鉴定,并提交至 GenBank 数据库,序列号为:KC447353.1);营养肉汤、平板计数琼脂、营养琼脂、牛肉膏、胰蛋白胨:北京奥博星生物技术有限责任公司产品。

洁净工作台:苏净集团苏州安泰空气技术有限公司产品;立式压力蒸汽灭菌锅:上海申安医疗器械厂产品;LRH 系列生化培养箱:上海一恒科技有限公司产品;电子天平、酸度计:梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司产品;SZ-1 型快速混匀器:江苏金坛市金城国胜实验仪器厂产品;移液器:eppendorf 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂的配制 营养肉汤、平板计数琼脂、营养琼脂培养基按照其说明书配制。

质量分数 0.85% 的生理盐水的配制:取 8.5 g 的 NaCl 溶解到 1 000 mL 的蒸馏水中。分装 9 mL/管,121 °C 灭菌 15 min 后备用。

1.2.2 接种 以无菌操作,取 30 °C 下培养 24 h 的地衣芽孢杆菌培养物,在无菌生理盐水中制成一定浓度的菌悬液并进行适当稀释,使其浓度达 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL,取 1 mL 进行接种。

1.2.3 平板菌落计数法测菌数 以无菌操作,分别

吸取 1 mL 不同稀释梯度的培养液置于培养皿中,每个梯度做 2 个平行,然后倒入 20 mL 左右 46 °C 的平板计数琼脂培养基,待培养基凝固后,将其于 30 °C 培养箱中倒置培养 48 h 后计数,同时做空白对照。

1.2.4 地衣芽孢杆菌生长特性的研究 NaCl 质量分数对地衣芽孢杆菌生长情况的影响实验:分别配制 NaCl 质量分数为 0、0.5、1、3、5、7、9、12% 的营养肉汤,加热溶解后分装 9 mL/管,每个质量分数分装 2 管,121 °C 灭菌 15 min,冷却后接种。置于 37 °C 培养箱中培养 7.5 h。取 1 mL 培养液,梯度稀释后倒平板计数琼脂,30 °C 培养 48 h 后,用平板菌落计数法计数。

pH 值对地衣芽孢杆菌生长情况的影响实验:配制 100 mL/瓶的营养肉汤,用 0.15 mol/L 的盐酸和 0.15 mol/L 的 NaOH 调 pH 值分别为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 的营养肉汤,分别取 9 mL 分装于试管中,每个梯度做两个平行,121 °C 灭菌 15 min。冷却后,接种、培养及计数,操作同上。

温度对地衣芽孢杆菌生长情况的影响实验:配制 9 mL/管的营养肉汤若干管,121 °C 灭菌 15 min,冷却后接种,然后放置到 0、4、10、15、20、25、30、37、45 °C 培养箱中培养,每个温度做两个平行,培养 10 h。取 1 mL 培养液,梯度稀释后用平板菌落计数法计数。

1.2.5 地衣芽孢杆菌生长模型的研究方法 以无菌操作,取 37 °C 下培养 24 h 的地衣芽孢杆菌培养物,在无菌生理盐水中制成一定浓度菌悬液,并进行适当梯度稀释后取 1 mL 接入已灭菌的 9 mL 营养肉汤中,放入培养箱中培养,培养温度分别为 15、20、25、30、37 和 45 °C。每隔一定时间,取 1 mL 菌液,梯度稀释后用平板菌落计数法计数,每个温度做两个平行。

1.2.6 数据处理 利用 Origin75 做出不同温度、pH 值、NaCl 质量分数下地衣芽孢杆菌的生长曲线,用 curxpt 软件建立不同温度下营养肉汤中地衣芽孢杆菌的生长模型,回归得出数学模型。

2 结果与讨论

2.1 地衣芽孢杆菌生长特性的研究结果

2.1.1 NaCl 质量分数对地衣芽孢杆菌生长的影响 由图 1 得知,地衣芽孢杆菌在 NaCl 质量分数为 0~

1%之间可以较好地生长,随着 NaCl 质量分数的升高对地衣芽孢杆菌的生长有一定的促进作用。但是,NaCl 质量分数在 1%~12%之间,随着浓度的升高地衣芽孢杆菌的生长明显受到抑制。总体看来,NaCl 质量分数在 0~3%时生长良好,7%~12%之间生长情况变化不大,即菌体不生长或生长缓慢,但没有死亡,最适生长 NaCl 质量分数为 1%。

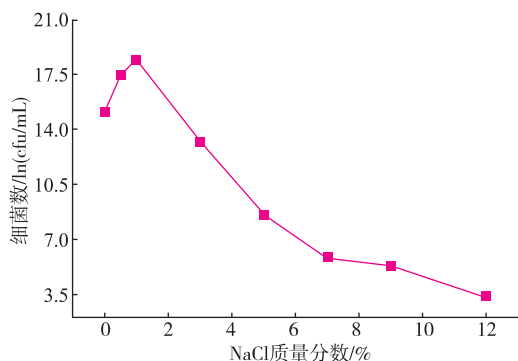


图 1 NaCl 质量分数对营养肉汤中地衣芽孢杆菌生长的影响
Fig. 1 Influence of NaCl concentration to the growth of *Bacillus licheniformis*

2.1.2 pH 值对地衣芽孢杆菌生长的影响 由图 2 得知,地衣芽孢杆菌在 pH 值为 2~3 之间基本不生长,pH 值在 4~5 之间生长缓慢,pH 值在 5~8 之间生长良好,pH 值在 9 以上生长受到抑制,甚至死亡。最适生长 pH 值为 8。

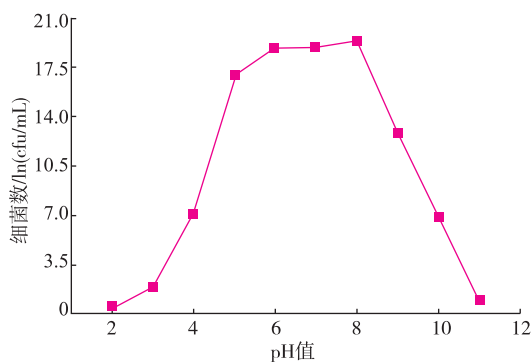


图 2 pH 值对营养肉汤中地衣芽孢杆菌生长的影响
Fig. 2 Influence of pH to the growth of *Bacillus licheniformis*

2.1.3 温度对地衣芽孢杆菌生长的影响 由图 3 得知,地衣芽孢杆菌在 15℃以下生长非常缓慢,在 25~30℃生长良好,最佳生长温度范围为 30~37℃之间,45℃左右菌体已经接近死亡。最适生长温度为 37℃。

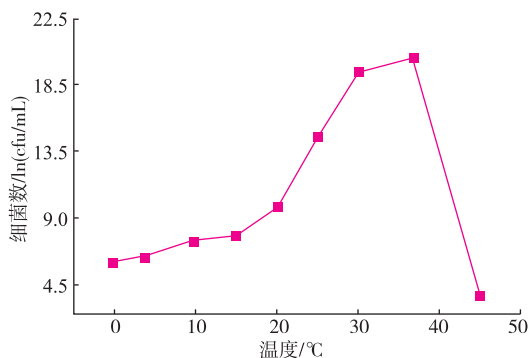


图 3 温度对营养肉汤中地衣芽孢杆菌生长的影响
Fig. 3 Influence of temperature to the growth of *Bacillus licheniformis*

2.2 地衣芽孢杆菌生长模型研究的结果

目前已有不少关于水产品中优势菌的生长动力学模型的报道,如磷发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)假单胞菌(*Pseudomonas spp.*)和腐败希瓦氏菌(*shewanella putrefaciens*)等,并已证实可以成功用于预测有氧和真空气调冷链水产鲜品的剩余货架期^[12]。许钟等成功地构建了罗非鱼及大黄鱼特定腐败菌假单胞菌的生长动力模型并依此确定了它们在加工过程中的关键控制点^[13-14],王力卫等人也建立了冷冻鱼糜制品中沙门氏菌的一级生长预测模型^[11],但对冷藏鱼糜制品在贮藏中优势腐败菌的生长模型的研究至今鲜见报道。以下是对冷藏鱼糜制品(鱼丸)中优势腐败菌(地衣芽孢杆菌)在不同温度下建立的一级生长模型。

根据上述结果,应用 curxpt 软件分析可得出地衣芽孢杆菌在不同温度下生长模型的方程,见表 1。

表 1 地衣芽孢杆菌生长模型

Table 1 *Bacillus licheniformis* growth model

温度/°C	模型名称	营养肉汤中回归模型
15	MMF	$\ln N_t = (5.825\ 566\ 9 \times 5\ 392.577\ 8 + 24.683\ 28 t^{2.425\ 219\ 3}) / (5\ 392.577\ 8 + t^{2.425\ 219\ 3})$
20	MMF	$\ln N_t = (6.032\ 129\ 4 \times 7\ 212.201 + 20.360\ 694 t^{3.233\ 307\ 6}) / (7\ 212.201 + t^{3.233\ 307\ 6})$
25	MMF	$\ln N_t = (6.423\ 570\ 6 \times 2\ 606.131\ 9 + 20.747\ 547 t^{3.533\ 269}) / (2\ 606.131\ 9 + t^{3.533\ 269})$
30	Richards	$\ln N_t = 19.672\ 257 / (1 + \exp(7.733\ 931\ 8 - 0.869\ 574\ 8 t)^{1/6.810\ 333\ 3})$
37	Richards	$\ln N_t = 19.764\ 9 / (1 + \exp(18.418\ 205 - 2.488\ 476\ 6 t)^{1/16.028\ 664})$
45	Logistic	$\ln N_t = 1.277\ 208 e^{-0.823\ 507\ 1 - 0.025\ 317\ 8 t}$

以上是利用 curxpt 软件对不同温度下地衣芽孢杆菌生长曲线的拟和。其中包括 4 种 S 形曲线模

型, Gompertz 模型、Logistic 模型、Richards 模型、MMF 模型, 根据拟合的标准差 S 和相关系数 R , 选出的相关性最好的拟合模型。图 4~10 结果显示, 营养肉汤中地衣芽孢杆菌在 15、20、25 °C 生长时, 用 MMF 模型拟合较好; 在 30 和 37 °C 生长时, 用 Richards 模型拟合较好, 其相关指数均在 0.998 以上, 标准差均在 0.52 以下。说明所建立的预测模型具有较好的适用性。而在 45 °C 时, 地衣芽孢杆菌的生长呈现负生长的状态, 因此生长曲线不具有 S 形曲线的特点, 只能用 Logistic 模型拟合出来, 但由于其相关性较低, 所以为了更直观的表现出其生长趋势, 又用 Excel 作了一条趋势线, 其相关系数在 0.98 以上。王力卫等人在鱼糜制品沙门氏菌生长模型的建立的研究中也发现在适合的温度下细菌可以用 S 形曲线拟合的较好, 但在较高温度下细菌的生长曲线不具有 S 形曲线的特点^[1]。在所有的拟合曲线中, 一般在对数期前期, 预测值比实测值要偏低, 而到对数期后期, 预测值要偏高一些。

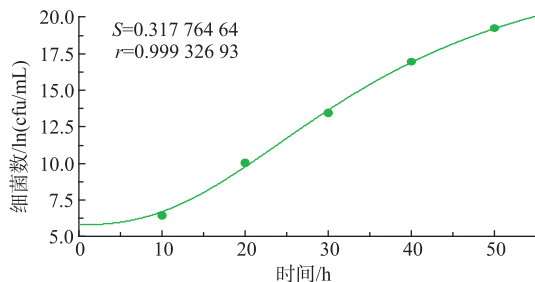


图 4 MMF 方程拟合的 15 °C 营养肉汤中地衣芽孢杆菌的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of *Bacillus licheniformis* fitted by MMF model in nutritional broth at 15 °C

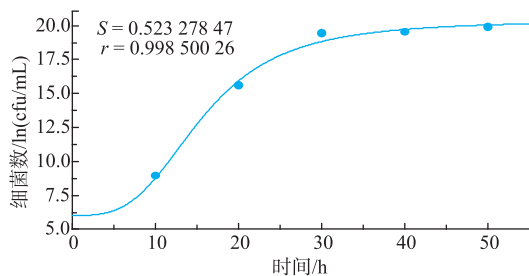


图 5 MMF 方程拟合的 20 °C 营养肉汤中地衣芽孢杆菌的生长曲线

Fig. 5 Growth curve of *Bacillus licheniformis* fitted by MMF model in nutritional broth at 20 °C

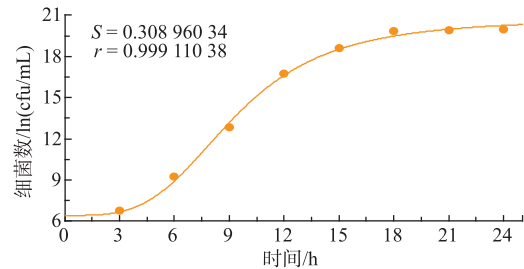


图 6 MMF 方程拟合的 25 °C 营养肉汤中地衣芽孢杆菌的生长曲线

Fig. 6 Growth curve of *Bacillus licheniformis* fitted by MMF model in nutritional broth at 25 °C

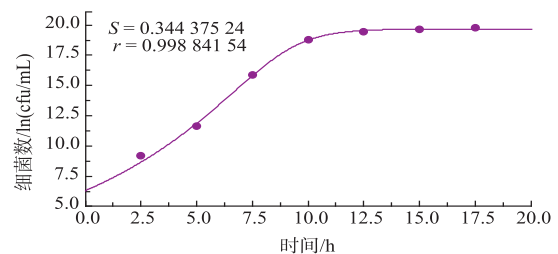


图 7 Richards 方程拟合的 30 °C 营养肉汤中地衣芽孢杆菌的生长曲线

Fig. 7 Growth curve of *Bacillus licheniformis* fitted by Richards model in nutritional broth at 30 °C

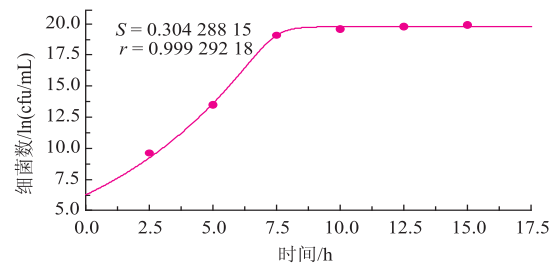


图 8 Richards 方程拟合的 37 °C 营养肉汤中地衣芽孢杆菌的生长曲线

Fig. 8 Growth curve of *Bacillus licheniformis* fitted by Richards model in nutritional broth at 37 °C

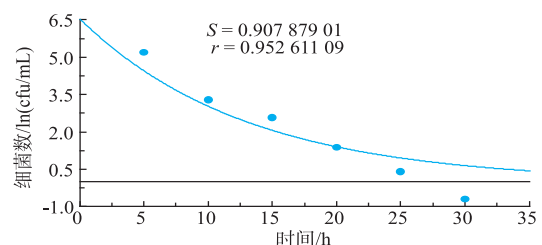


图 9 Logistic 方程拟合的 45 °C 营养肉汤中地衣芽孢杆菌的生长曲线

Fig. 9 Growth curve of *Bacillus licheniformis* fitted by Logistic model in nutritional broth at 45 °C

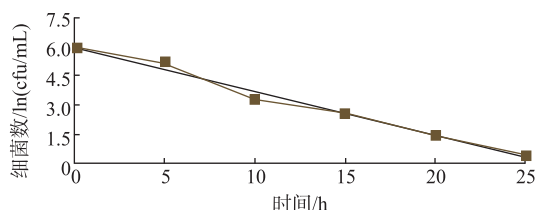


图 10 45 °C 肉汤中地衣芽孢杆菌的生长曲线

Fig. 10 Growth curve of *Bacillus licheniformis* in nutritional broth at 45 °C

地衣芽孢杆菌在营养肉汤中有一个初始的延滞期,然后才进入对数生长期。在不同温度下该菌进入对数生长期的时间不同,在最适温度下地衣芽孢杆菌延滞期较短,进入对数生长期的时间较快。因此,温度的高低影响其生长曲线的形状。

2.3 讨论

通过研究地衣芽孢杆菌在营养肉汤中的最适生长条件可以为其在鱼糜制品生产过程中的控制措施提出一定的建议。首先 NaCl 质量分数的控制:地衣芽孢杆菌在 NaCl 质量分数为 0~3% 之间时适宜生长,随着 NaCl 质量分数的升高对其生长有一定的抑制作用。可以在人们口感可以接受的范围内,适当增加鱼糜制品中食盐的添加量,有利于抑制地衣芽孢杆菌的生长。但是在实际生产过程中,食盐质量分数一般都控制在 1.5%~3.0% 之间,变化不大。对于温度的控制:在鱼糜制品加工过程中,应该尽量降低加工环境的温度,以减缓微生物的生长繁殖。如鱼丸加工时,经过高温蒸煮可以杀灭其中大部分的微生物包括芽孢菌的营养体,但是不能将已形成的芽孢杀死,如果预冷时处理措施不当,很容易繁殖微生物,也有可能引起芽孢萌发。如果加工时间过长且温度较高时,地衣芽孢杆菌的芽孢有可能萌发,所以应该快速使鱼糜制品降温,缩短加工时间,降低加工环境温度。

为确保冷藏鱼糜制品质量在销售过程中的安全与稳定,延长货架期,控制冷藏鱼糜制品中优势腐败菌的生长是关键。近年来,微生物预警技术在国内外已有广泛研究,利用数学模型定量描述食品特

性(如 pH 值、水分活度等)和加工流通环境因子(如温度、氛围气体等)对食品中微生物生长、残存、死亡动态的影响,用来预测食品的货架期和微生物学安全性^[15]。Bunchana 等在建立金黄色葡萄球菌温度、pH 值、NaCl 质量分数、NO₂ 浓度的单因素模型基础上得到了多因素响应面模型,T.P.Oscar 等研究了低初始菌数和高初始菌数对模型的影响^[16],在增加参数同时也增加建模难度及模型的复杂度,在实际应用中较困难^[17]。由于温度是影响微生物生长的主导因素^[18],在鱼糜制品贮藏过程中,温度是最容易进行实时监督和给予及时调控的重要参数,通过建立地衣芽孢杆菌在营养肉汤中的一级模型,可为预测鱼糜制品在贮藏过程中微生物的变化规律和建立安全预警机制、风险评估体系提供理论依据。

3 结 语

地衣芽孢杆菌生长的最适 NaCl 质量分数范围为 0~3%;最适 pH 值范围为 5.0~8.0;最适温度范围为 30~37 °C。在 15、20、25 °C 时其生长曲线用 MMF 模型拟合的较好;在 30 和 37 °C 用 Richards 模型拟合的较好,其相关系数较高,都在 0.998 以上。相反,在 45 °C 时其生长曲线只能用 Logistic 方程拟合,且相关系数较低,仅为 0.907。从所建立的模型也证明了适宜的温度条件下,细菌的生长繁殖速度越快。所以为了避免细菌的大量繁殖,鱼糜制品应该在低温下贮藏,以延长其货架期并保证销售过程中的品质。作者选用的是商品化的培养基(LB 液体培养基),其化学组成与实际鱼糜制品有一定差距。此外,作者是在恒定温度条件下进行的,如果冷藏鱼糜制品在实际生产流通过程中出现温度控制不当的情况,则现有模型就不能准确预测微生物的生长变化。因此,在以后的实验中将进一步研究根据鱼糜制品营养成分制作的培养基及温度波动条件下地衣芽孢杆菌的生长动力学模型,以便更准确地预测细菌的生长繁殖情况。

参考文献:

- [1] 杨阳,张付云,苍桂璐,等. 地衣芽孢杆菌生物活性物质应用研究进展[J]. 生物技术进展,2013,3(1):22-26.
YANG Yang,ZHANG Fuyun,CANG Guilu,et al. Research progress of *Bacillus licheniformis* in application of bioactive substances[J]. *Biotechnology Progress*,2013,3(1):22-26.(in Chinese)
- [2] Sharma S,Singh R L,Kakkar P. *Bacillus licheniformis* IITRHR2:a novel source of antimicrobial proteinaceous food substance[J].

- Journal of Microbiology and Antimicrobials**, 2010, 2(9):127–133.
- [3] 曹煜成, 李卓佳, 冯娟, 等. 地衣芽孢杆菌胞外产物消化活性的研究[J]. 热带海洋学报, 2005, 24(6):6–11.
CAO Yucheng, LI Zuoji, FENG Juan, et al. A study on digestive activities of extracellular products of *Bacillus licheniformis* [J]. **Journal of Tropical Oceanography**, 2005, 24(6):6–11. (in Chinese)
- [4] Ben E K. Microbiological safety and spoilage of sous vide fish products [D]. Frederiksberg: Royal Veterinary and Agricultural University, 1994.
- [5] Venugopal V, Alur M, Lewis N. Extracellular protease from *Pseudomonas marinoglutinosa*: Some properties and its action on fish actomyosin [J]. **Journal of Food Science**, 2006, 48(3):671–674.
- [6] He H, Wang Q, Sheng L, et al. Functional characterization of *Vibrio alginolyticus* twin-arginine translocation system: Its roles in biofilm formation, extracellular protease activity, and virulence towards fish [J]. **Current Microbiology**, 2011, 62(4):1193–1199.
- [7] 张书文, 刘鹭, 李红娟, 等. 荧光假单胞菌胞外蛋白酶的纯化及特性研究[J]. 食品科学, 2012, 33(9):206–210.
ZHANG Shuwen, LIU Lu, LI Hongjuan, et al. Purification and properties of extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* [J]. **Food Science**, 2012, 33(9):206–210. (in Chinese)
- [8] Coton M, Denis C, Cadot P, et al. Biodiversity and characterization of aerobic spore-forming bacteria in surimi seafood products [J]. **Food Microbiology**, 2011, 28(2):252–260.
- [9] 郭全友, 杨宪时, 许钟. 冷藏罗非鱼优势腐败菌的鉴定及其特征[J]. 食品与机械, 2009, 25(3):87–91.
GUO Quanyou, YANG Xianshi, XU Zhong. Characterization and identification of dominated spoilage organism of chilled tilapia [J]. **Food and Machinery**, 2009, 25(3):87–91. (in Chinese)
- [10] 李琳, 潘子强. 水产品特定腐败菌的确定及生长模型建立研究进展[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(6):152–156.
LI Lin, PAN Ziqiang. Advance on confirmation and modeling of SSO in aquatic product [J]. **Food Research and Development**, 2011, 32(6):152–156. (in Chinese)
- [11] 王力卫, 雷晓凌, 彭镜林, 等. 鱼糜制品沙门氏菌生长模型的建立[J]. 食品工业, 2012, 10(33):113–116.
WANG Liwei, LEI Xixoling, PENG Jinglin, et al. Construction of growth prediction model of salmonella in surimi product [J]. **Journal of Food Industry**, 2012, 10(33):113–116. (in Chinese)
- [12] Pantazi D, Papavergou A, Pournis N, et al. Shelf-life of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored under various packaging conditions: Microbiological, biochemical and sensory attributes [J]. **Food microbiology**, 2008, 25(1):136–143.
- [13] 许钟, 杨宪时, 郭全友, 等. 冷藏大黄鱼货架期预测模型的建立和评价[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6):83–88.
XU Zhong, Yang Xianshi, GUO Quanyou, et al. Assessment and development of shelf life prediction model for *Pseudosciaena crocea* [J]. **Journal of Fishery Sciences of China**, 2005, 12(6):83–88. (in Chinese)
- [14] 许钟, 肖琳琳, 杨宪时. 罗非鱼特定腐败菌生长动力学模型和货架期预测[J]. 水产学报, 2005, 29(4):541–547.
XU Zhong, XIAO Linlin, YANG Xianshi. Microbial growth kinetics model of specific spoilage organisms and shelf life prediction for tilapia [J]. **Journal of fishery of China**, 2005, 29(4):541–547. (in Chinese)
- [15] 胡洁云, 欧杰, 李柏林, 等. 预报微生物学在食品安全风险评估中的作用[J]. 微生物学通报, 2009, 36(9):1–7.
HU Jieyun, OU Jie, LI Bolin, et al. The role of predictive microbiology in food safety risk assessment [J]. **Microbiology**, 2009, 36(9):1–7. (in Chinese)
- [16] 李柏林, 郭剑飞, 欧杰. 预测微生物学数学建模的方法构建[J]. 食品科学, 2004, 25(11):52–57.
LI Bolin, GUO Jianfei, OU Jie. Research approach of microbial modeling on predictive microbiology [J]. **Food Science**, 2004, 25(11):52–57. (in Chinese)
- [17] Fujikawa H, Kai A, Morozumi S. A New Logistic Model for *Escherichia coli* Growth at Constant and Dynamic Temperatures [J]. **Food Microbiology**, 2004, 21(5):501–509.
- [18] Oscar T P. Predictive models for growth of *Salmonella typhimurium* DT104 from low and high initial density on ground chicken with a natural microflora [J]. **Food Microbiology**, 2007, 24(6):640–651.