



(12) 发明专利

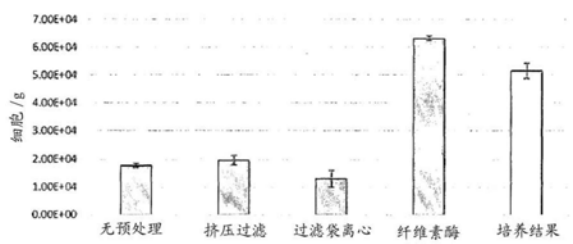
(10) 授权公告号 CN 107027314 B

(45) 授权公告日 2021. 02. 19

(21) 申请号 201580063755.9	(51) Int.Cl.
(22) 申请日 2015.11.30	C12Q 1/6851 (2018.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 107027314 A	C12Q 1/6806 (2018.01)
(43) 申请公布日 2017.08.08	C12Q 1/06 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2017.05.24	G01N 33/34 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/IB2015/058278 2015.10.27	D21C 5/00 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02016/071805 EN 2016.05.12	D21H 17/00 (2006.01)
(73) 专利权人 斯道拉恩索公司 地址 芬兰赫尔辛基	(56) 对比文件
(72) 发明人 K.帕蒂-佩利宁 J.拉萨宁 K.海尔梅莱 A.凯图宁 K-J.里海宁	WO 9747764 A1,1997.12.18
(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105	JP 2006217869 A,2006.08.24
代理人 宋莉 詹承斌	CN 101460617 A,2009.06.17
	Kirsi Partti-Pellinen等.Validation of qPCR-method for quantification of viable bacteria in packaging boards.《Recent Advances in Microbial Control》.2014,第1-2 页.
	审查员 刘慧
	权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称
测定微生物的改进的方法

(57) 摘要
本发明涉及纸浆和造纸工业中包含纤维素的材料中微生物含量的测定。酶法预处理包含纤维素的材料和使用基于PCR的技术测定微生物。



1. 测定纸浆和造纸工业中的包含纤维素的材料中的微生物含量的方法,包括步骤:
 - (a) 提供包含纤维素的材料的样品的悬浮液;和
 - (b) 用一种或多种具有纤维素酶活性的酶制剂处理所述悬浮液;和
 - (c) 从经酶处理的悬浮液分离微生物;和
 - (d) 从分离出的微生物分离核酸;和
 - (e) 对分离出的核酸进行PCR分析,其中PCR结果指示微生物含量。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中通过将样品悬浮在溶液中提供悬浮液。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中纤维素酶活性是纤维素酶活性的混合。
4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中纤维素酶活性为至少一种内切葡聚糖酶活性。
5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中酶制剂进一步包含一种或多种半纤维素酶活性。
6. 根据权利要求1或2所述的方法,其中使用过滤袋离心将微生物从悬浮液分离。
7. 根据权利要求1或2所述的方法,其中包含纤维素的材料是消费者板。
8. 根据权利要求1或2所述的方法,其中包含纤维素的材料是用于食品工业的板。
9. 根据权利要求1或2所述的方法,其中微生物为细菌。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述细菌代表芽孢杆菌种。
11. 根据权利要求1或2所述的方法,其中微生物为真菌或霉菌。
12. 根据权利要求1或2所述的方法,其中使用叠氮溴化丙啶处理细胞。

测定微生物的改进的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及测定纸浆和造纸工业中包含纤维素的材料中微生物含量的方法。

背景技术

[0002] 纸和板 (board) 是在许多工业领域中使用的重要包装材料。包装纸或板可向包入 (enclosed) 的物体提供物理或化学保护; 它们还可以例如提供信息和强化营销和物体的份量控制 (portion control)。纸和板在食品工业中包括包装的众多应用中具有较长的历史。作为包装材料, 纸经常与食物直接接触。纸和板的容器用于干燥的食物、液体和冷冻产品。纸包装材料 (paper wrapping) 常用于快餐和糖果、药品包装、香烟包装、奢侈品包装和高档图形产品。包装保护内容物 (content) 免受环境的有害因素的作用因此延长了被包装的内容物的有效寿命。对于消费者包装板产品的卫生要求是极其高的。

[0003] 纸和板一般主要由纤维素纤维、碳酸钙、淀粉和半纤维素构成。所有这些都是天然组分且可充当造成污染的微生物的生长介质。具有高营养物和淀粉含量的水的循环是微生物感染的常见源头。

[0004] 传统上, 已经通过使用微生物学的方法评估物质的微生物纯度, 所述方法需要培养 (cultivation) 待分析的表面或材料的样品。组成和培养条件 (温度、时间、介质) 对方法的准确性有影响。用于定量分析的样品必须被稀释到这样的程度, 可以对由细胞形成的单个菌落 (colony) 计数 (count)。在被研究样品中可存在几十个 (dozens) 或至多几百个细胞。在平行样品中的菌落计数可变化很大并且, 因此, 再现性是差的。因此, 准确性和可靠性是差的。此外, 微生物方法典型地是劳动密集型 (labor intensive) 且耗费时间的并且因此对于纸和纸板的纯度的跟踪 (follow up) (监控) 不是最优的 (optimal)。

[0005] 在包括纸张的造纸方法中识别微生物的基于聚合酶链反应 (PCR) 的方法是已知的, 例如US8613837和US2013189152。

[0006] 由于现在的方法是劳动密集型的、耗费时间的且它们的准确性和灵敏度都不令人满意, 需要测定纸和板材料的微生物纯度的改进的方法。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供测定纸浆和造纸工业中包含纤维素的材料中的造成污染的微生物的改进的方法。该目的通过将要被描述的本发明和权利要求而实现。

[0008] 本发明的第一目的是测定纸浆和造纸工业中包含纤维素的材料中的微生物含量的方法。所述方法的特性特征在权利要求1的特征部分给出。

[0009] 本发明的第二目标是在使用定量PCR测定微生物之前, 纤维素酶在纸浆和造纸工业中预处理包含纤维素的材料的用途。

[0010] 所述方法允许对纸浆和造纸工业中包含纤维素的材料以及所得纸和板材料 (例如消费者 (consumer) 包装材料、特别是食物包装材料) 的微生物纯度的简单且准确的跟踪。由此因为可以在较早阶段探测到可能的污染物, 包装材料的卫生得到了强化。

附图说明

[0011] 图1示出用于悬浮在缓冲溶液中并且经历挤压过滤(compression filtration)的经接种(inoculated)的板中的细菌的qPCR分析与用于测定微生物的传统培养的对比。

[0012] 图2示出用于悬浮在缓冲溶液中并且经历袋离心过滤的经接种的板中的细菌的qPCR分析与用于测定微生物的传统培养的对比。

[0013] 图3a和3b示出在两个不同的纸或板中测定微生物的根据本发明的方法和基于传统培养的方法的对比。

[0014] 图4示出如下的用于在板中测定微生物的方法对比:第一使用qPCR而没有酶法预处理;第二根据根据本发明;和第三使用基于传统的培养的方法。

[0015] 图5示出使用如下的微生物测定的对比:传统培养;没有酶法预处理的qPCR;挤压过滤作为预处理;过滤袋离心作为预处理;和使用两种不同的混合的市购纤维素酶制剂(cellulase preparation)的根据本发明的方法。

具体实施方式

[0016] 发明人令人惊奇的发现基于PCR的纸浆和造纸工业中包含纤维素的材料的微生物纯度的测定可以通过样品的酶法预处理(enzymatic pretreatment)而得到显著的强化。而且当造成污染的微生物的水平非常低时,酶法预处理允许使用PCR定量检测。

[0017] 根据发明,纸浆和造纸工业中包含纤维素的材料中的微生物含量的测定包括如下步骤:

[0018] (a) 提供包含纤维素的材料的样品的悬浮液(suspension);和

[0019] (b) 用一种或多种具有纤维素酶活性的酶制剂处理步骤(a)的悬浮液;和

[0020] (c) 从步骤(b)的经酶处理的悬浮液中分离微生物;和

[0021] (d) 从步骤(c)的经分离的微生物中分离核酸;和

[0022] (e) 对步骤(d)的经分离的核酸进行PCR分析,

[0023] 其中PCR结果指示(indicate)样品的微生物含量。

[0024] 如本领域已知的,阳性PCR结果指示存在某种核酸且因此存在某种微生物,而qPCR用来测定微生物水平。

[0025] 在这方面,应将“微生物含量”理解为涵盖定性(例如识别微生物品系(strain))和定量(例如形成细菌单元的菌落的量)的样品的微生物含量这两者。在样品材料中测定定量和定性的微生物含量可独立地或一起完成。定性含量可以使用对于某些属(genera)或种(species)的特定的引物(primer)进行测量。PCR产物的存在表明存在微生物且可以使用凝胶电泳或优选使用qPCR设备分析测定。必要时,定量测定使用qPCR设备和已知的对照(control)实施。可使用宽范围(broad range)的引物或特定引物。

[0026] 根据本发明,术语“纸浆和造纸工业中包含纤维素的材料”是指纸浆中和造纸工业中含有纤维素的材料,包括原材料、生产工艺期间的纤维素材料和最终产品。包括纤维素(纤维素材料)的该材料的实例为,不限于,木屑、机械浆和各种纸和板。纸浆,各种纸和板都是优选材料。消费者板是特别优选的且食物和液体的包装板是最优选的包括纤维素的材料。

[0027] 在这方面,术语“消费者板”包括一般包装板、食物和非食物包装板、液体包装板、

药品包装板、香烟板和图形版 (graphical board)。待测试微生物纯度的纸或板可以是单层或多层以及是经涂覆的或未涂覆的。纸或板包含纤维素纤维和任选地可变量的半纤维素和任选地其他组分和/或涂层 (coating)。半纤维素含量或涂层可对酶制剂的最优组成有影响。优选的纸和板的材料是消费者包装板、特别是液体和食物材料的包装板。

[0028] 可直接从制造工艺的含水相 (aqueous phase) 提取悬浮液。然而,当悬浮液来自工艺或含水产物时,必须确保溶液适合后续步骤中的酶制剂的活性。如果必要,必须改变缓冲溶液。

[0029] 可将潜在地受到污染的包含纤维素的材料的样品悬浮在溶液 (典型地为适合待使用的酶制剂的活性的缓冲溶液)。在悬浮步骤前可将纸或板材料拼接 (splice), 例如使用剪刀。通常通过机械研磨和/或例如涡流强化纸或板的材料的悬浮步骤。可在 Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th edition, APHA publications 中找到悬浮样品的优选的方法的一个实例。来自制浆 (pulp) 工艺样品可在没有机械研磨的情况下经历酶处理。然而。在一些情况中, 悬浮液缓冲溶液必须改变以便满足后续步骤中酶活性的要求。

[0030] 然后, 使测定重量的 (优选均质化的) 悬浮液与含有一种或多种纤维素酶且优选半纤维素酶活性的酶制剂接触。典型地向悬浮液添加酶制剂。

[0031] 用纤维素降解酶 (cellulolytic enzyme) 处理悬浮液以便强化微生物和纤维质 (fibrous) 材料的分离。根据本发明的酶制剂含有至少一种具有纤维素酶活性的酶。任选地, 酶制剂进一步含有半纤维素酶活性。所述酶制剂还可为具有纤维素酶活性和任选的一种或多种半纤维素酶活性的酶的混合物。含有若干纤维素酶活性的酶制剂优选富含一种或多种内切葡聚糖酶 (endoglucanase) 活性。纤维素酶可以是内切纤维素酶 (endocellulase) 如内切葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4) 或外活性 (exoactive) 的纤维二糖水解酶 (cellobiohydrolases, EC 3.2.1.91), 不限于这些, 并且它们还可具有其他纤维素降解和/或半纤维素降解活性或这些任意的混合物。优选内切葡聚糖酶。cel5 族 (family) 的内切葡聚糖酶活性是特别有用的。半纤维素酶可以是例如木聚糖酶 (xylanases, EC 3.2.1.8) 或甘露聚糖酶或它们任意的混合物。在本发明中有用的可商购的酶混合物的实例为 Ecostone L900 (AB Enzymes, Finland), 其是 cel5 富集の木霉属 (Trichoderma) 纤维素酶混合物。

[0032] 酶处理对活微生物是温和的且减少了大量的机械研磨的需要。它强化了微生物和纸或板基底 (substrate) 中的纤维的分离, 据此强化了测定的灵敏度和准确性。

[0033] 优选地, 以轻微过量给料酶制剂以便确保微生物和包含纤维素的材料中的纤维的适当分离。包括例如 pH、温度和酶法处理的培育 (incubation) 时间 (如上述步骤 (b) 所定义) 的条件应当合适酶制剂的活性。酶法处理还表现出比机械离析 (浸渍, maceration) 方法更好的重复性。在酶法处理之后, 悬浮液允许使用例如过滤袋离心将微生物从含纤维素的材料分离。

[0034] 来自适当运行的制造工艺, 或来自使用适当运行的制造工艺获得的纸或板的纸浆中造成污染的微生物杂质的量 (微生物的量) 典型地非常低。因此有必要将微生物从余下的纤维分离。原则上可使用任何已知的回收微生物的方法但过滤袋离心是最优选的。离心过滤袋会回收活 (living) 微生物而余下的残留纤维将被排出。所属领域技术人员可选择合适的过滤袋的孔径, 且该孔径可为例如 50 微米。

[0035] 然后可通过叠氮溴化丙啶(propidium monoazide,PMA)处理经分离的细胞。PMA穿过死细胞的膜且与核酸反应,产生不能被PCR扩增(amplify)的DNA。因此只能测定来自能活的(viable)细胞的DNA。

[0036] 分离(isolate)经分离的微生物的核酸。此外,可使用任何已知的方法。合适的方案的一个实例描述在Rinttilä等中。

[0037] 最后,对经分离的核酸材料实施PCR分析,一般实施定量PCR(qPCR)。qPCR允许造成污染的微生物的定量和定性测定。所属领域技术人员能够选择合适的PCR引物用于例如全部细菌测定;例如用于扩增16S rDNA区域的引物可在全部细菌含量的测定中使用。还可使用特定用于某些属或种的微生物的引物(定性分析,任选地还带有定量结果)。在非模板对照和有效的融合(melting)曲线之前的具有超过阈值循环的扩增曲线的样品表明存在微生物。使用已知的微生物量/浓度的标准物计算定量PCR结果。

[0038] 当与传统使用的培养方法比较时,qPCR显著地更快且不像培养那样劳动密集。本发明的方法还是非常灵敏的且可检测材料的微生物纯度的小的变化。例如当每克液体包装板的总细菌计数小于250菌落形成单位(cfu/g)(Standard Methods for the Examination of Dairy Products,17th edition,APHA publications)时,认为液体包装材料是微生物纯的。因此灵敏度和低检测限对于方法的使用性是重要的(essential)。

[0039] 测定方法的改进的准确性、特异性和可用性允许连续地跟踪在制造地点生产的材料且容易在使用包装材料前跟踪或随机测试。因此,根据发明的方法改进了消费者包装的安全性和卫生。此外,制造工艺中的微生物杂质对工艺和所得产品是有害的。微生物计数的可能的升高的早期监测是更容易例如防止微生物沉积物的形成。

[0040] 本文描述的方法适合测定任何类型的微生物。该方法特别适合测定细菌,特别是芽孢杆菌(Bacillus)种和芽孢杆菌D组中的种。还可测定造成污染的真菌和霉菌(mold)。

[0041] 纤维素酶在使用定量PCR测定微生物之前在纸浆和造纸工业中包含纤维素的材料预处理中的用途也在本发明的范围之内。纤维素酶可单独或与其他纤维素酶和/或一种或多种半纤维素酶组合使用。具有若干水解活性的混合型纤维素酶制剂和所谓的全(whole)纤维素酶制剂、以及具有一种或两种主要活性的纤维素酶在本发明的范围内是可使用的。如本领域中已知的,纤维素酶的类型取决于纤维质材料的类型。在最优选的用途中,纸或板的材料在微生物的定量测定之前使用内切葡聚糖酶预处理。

[0042] 通过下面非限制性实施例说明本发明。应理解上面说明书中给出的实施方式和实施例仅用于说明目的,且在本发明的范围内多种变化和改变是可能的。

[0043] 实施例

[0044] 实施例1:包装板的接种

[0045] 使属于芽孢杆菌D组的细菌菌株在在TSB(胰酶大豆肉汤(tryptic soy broth))中在+37℃生长过夜。为确保能活,在指数生长阶段采集细菌。从主生长肉汤(培养基,broth),将5ml的体积转移至新鲜的肉汤且在+37℃培育6小时。将细菌细胞分入10X50ml离心管(falcon tube)并且通过离心采集细菌。将所有10个细菌丸状物(pellet)在5ml无菌柠檬酸缓冲溶液(0.05M,pH5.0)中再悬浮并且组合到一起并且装填至200ml(“细菌储备(stock)”)。将细菌储备对于低接种物(inoculum)在20μl下且对于中低接种物在200μl下添加到板-缓冲液混合物。

[0046] 以两种水平的属于芽孢杆菌D组的芽孢杆菌菌株对包装板接种(低和中低)。根据FDA标准方案进行培养(Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th edition, APHA publications)。将如上述生长的芽孢杆菌的连续稀释物用至接种菌(inoculant);高水平为1:10稀释,且接着分别稀释中高、中低、和低使得低水平接种菌被稀释至1:10000。

[0047] 实施例2:叠氮溴化丙啶(Propidium monoazide)处理

[0048] 对于叠氮溴化丙啶处理,将含有细菌细胞的丸状物以手动涡流(hand vortex)溶解到1980 μ l 0.9%的NaCl。将所得液体转移到2ml的Eppendorf管并且添加20 μ l PMA(叠氮溴化丙啶)反应溶液。手动摇动(shaking)管以将样品混合然后在黑暗中在RT下在物摇动的情况下培育5min。培育后,将管倒置以使样品均质化,在500W的灯下侧向(sideways)放在冷元件(cold element)上且照射5min。然后,试样品在+4 $^{\circ}$ C在20000x g下离心10min(Eppendorf Centrifuge 5804R)并将上清液倒掉。离心后,使丸状物在真空干燥器中在+45 $^{\circ}$ C干燥20分钟并且在+55 $^{\circ}$ C溶解在45 μ l Tris-EDTA缓冲液中1.5-2小时。

[0049] 实施例3:DNA提取和qPCR

[0050] 基本上如Rinttilä等(2004)所述那样进行从纤维质材料分离出的细胞的DNA提取。简而言之,向具有玻璃珠管添加细胞溶解试剂(lysis reagents)并且在6.5m/s的速度使用FastPrep珠式组织研磨器(bead beater)三次达1分钟。使管在65 $^{\circ}$ C培育20分钟,用Thermomixer每2分钟产生涡流。添加800 μ l的苯酚-氯仿-异戊醇(24:23:1)、混合并且在10000g离心5min。将600 μ l液相转移到新的管中且用氯仿-异戊醇(24:1)萃取。使用100%异丙醇沉淀DNA并且在+4 $^{\circ}$ C在20000g离心15min后移除液体。使用1ml (-20 $^{\circ}$ C) 70%乙醇清洗丸状物两次并且在+4 $^{\circ}$ C在20000g离心5分钟。离心后,在真空干燥器中将丸状物在+45 $^{\circ}$ C干燥20分钟并且在+55 $^{\circ}$ C溶解在45 μ l的Tris-EDTA缓冲溶液中1.5-2小时。

[0051] 将DNA样品稀释1:2、1:4和1:8用于qPCR分析。将如Nadkarni等2002中描述的宽范围引物以60 $^{\circ}$ C的退火温度使用40个循环。根据基于10倍稀释的标准物的标准曲线计算样品的结果。

[0052] 实施例4:挤压过滤

[0053] 将如实施例1中描述的以芽孢杆菌D组的菌株的两种水平(低和中低)接种的包装板用Waring共混机均质化进入缓冲液中并且用挤压过滤挤压以分离固相和液相。得自从挤压过滤获得的滤液的qPCR结果分别仅占低和中低接种水平的培养结果的21和11%,见图1。来自挤压滤液比培养结果低很多表明挤压过滤不是从包装板分离微生物的适当方法。

[0054] 实施例5:过滤袋离心是用于微生物的不合适分离方法

[0055] 用无菌剪刀将包装板(10g)切成小块除去板样品的边缘。将所得的块与300ml柠檬酸缓冲液(0.05M, pH 5)混合并且在Waring共混机中均质化。将已知测定重量的均质化的、浸湿的包装板(35 $\pm$ 0.1g)转移到含有过滤袋(F57用于纤维和体外研究的过滤袋, Ankom Technology)的50ml离心管中并且离心过滤。理想地,不溶解的基体应被困在过滤袋中而细菌应沉积成丸状物。尽管如此,qPCR结果占培养结果的27%,表明对于从悬浮成溶液的包装板中分离微生物,单独的过滤袋离心不是合适的分离方法。使用qPCR和培养的结果示于图2。

[0056] 实施例6:酶处理

[0057] 测试含有纤维素水解活性的四种酶制剂(所谓“全纤维素酶”或“混合型纤维素酶”)有关它们降解悬浮在缓冲液中的板样品的能力。经测试的酶为Ecostone L900 (AB Enzymes)、Optimase™CX40L、Optimase™CX60L和Multifect (Genencor)。根据制造商声称的主要活性和其他公众可获得的信息如下:Ecostone L900是cel5富集的本霉菌属(Trichoderma)纤维素酶制剂。OPTIMASE™CX 40L酶制剂含有纤维素酶和半纤维素酶作为主要酶活性。Optimase CX60L含有多种酶活性,但基于其对于羧甲基纤维素的活性而被标准化。木聚糖酶是对于Multifect的主要活性。

[0058] 为了确保酶活性不限制板基底的分解(break-down),进行了下面系列的测试组(见表1),其中酶体积对板质量的范围为5至15x10⁻⁵得到实施。即使每个板提供了更多的酶,效率也没有改变,表明最小的体积已经含有如此多的酶使得酶活性不限制板的分解(break-down)。

[0059] 表1

[0060]	测试组	板(g)	缓 冲 液 (ml)	酶体积 (μl)
	1	10	300	500
	2	10	300	700
[0061]	3	10	250	850
	4	10	150	1500
	5	15	150	2200
	6	20	250	1700
	7	15	250	1300
	8	10	250	800

[0062] 以最大体积施加所有的酶使得酶活性不会限制板基体的分解。根据制造商的推荐对每种酶调节培育温度、pH和其他条件至最佳范围。通过视觉估计酶分解板基体的能力并且具有纤维素作为主活性的两种酶优于其他两种,表明纤维素比半纤维素酶是优选的。

[0063] 实施例7:用qPCR分析经激发的(spiked)包装板

[0064] 如实施例1所描述的那样用的芽孢杆菌D组的菌株的四种水平(低、中低、中高和高)接种两个不同的包装板。根据FDA标准方案进行培养(Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th edition, APHA publications)。对于qPCR分析,用无菌剪刀将包装板(10g)切成小块,除去板样品的边缘。将所得的块与300ml柠檬酸缓冲液(0.05M, pH 5)混合并且在Waring共混机中均质化。将已知测定重量的均质化的、浸湿的包装板(35±0.1g)转移到储存瓶中并在40℃以纤维素酶(AB Enzymes, Ecostone L900)在振荡培育箱中培育。将样品转移到含有过滤袋的50ml的离心管中并且离心过滤。不溶解的基体被困在过滤袋中而细菌沉积成丸状物。添加细胞溶解试剂之前在丸状物阶段用叠氮溴化丙啶处理待测量的能存活的细胞的样品。qPCR结果示于图3a和3b中,表现出优异的线性和

重复样品之间低的标准偏差。它们还符合培养结果,即表现出良好的回收和准确性(分别是90和97%)。使用不同的板在没有接种的情况下重复试验若干次。使用酶处理和qPCR获得的结果与相应的培养结果相符。由于非常低水平的内生微生物水平,无法观察到统计学上有意义的差别。数据未示出。

[0065] 实施例8:对比通过使用和不使用纤维素酶预处理的培养和qPCR的测定

[0066] 当在DNA提取和qPCR分析之前没有施加酶预处理时,在悬浮板样品之后的培养表现出比定量聚合酶链反应更高的微生物水平。然而,在DNA提取和qPCR分析之前用酶预处理表现出与培养结果良好的相符性。在qPCR之前将过滤袋离心用于分离微生物。结果示于图4。

[0067] 实施例9:与其他预处理比较的酶预处理

[0068] 根据FDA标准方案(Standard Methods for the Examination of Dairy Products,17th edition,APHA publications)进行包装板样品的培养。如实施例1所述那样进行挤压过滤且如实施例5所述那样进行过滤袋离心。如实施例7所述那样进行使用市购Ecostone L900的酶处理。

[0069] 经纤维素酶预处理的样品表现出与培养相对应的水平(类似或稍高)而其他预处理(挤压过滤和过滤袋离心)和没有与处理的样品与培养相比表现出较低的水平。结果示于图5。

[0070] 参考文献

[0071] Nadkarni,M.A.,F.E.Martin,N.A.Jacques,and N.Hunter.2002.Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range(universal)probe and primers set.Microbiology 148:257-266.

[0072] Rinttilä T,Kassinen A,Malinen E,Krogus L,Palva A.Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR.J.Appl.Microbiol.2004;97(6):1166-1177.

[0073] Standard Methods for the Examination of Dairy Products,17th edition, APHA publications.2004

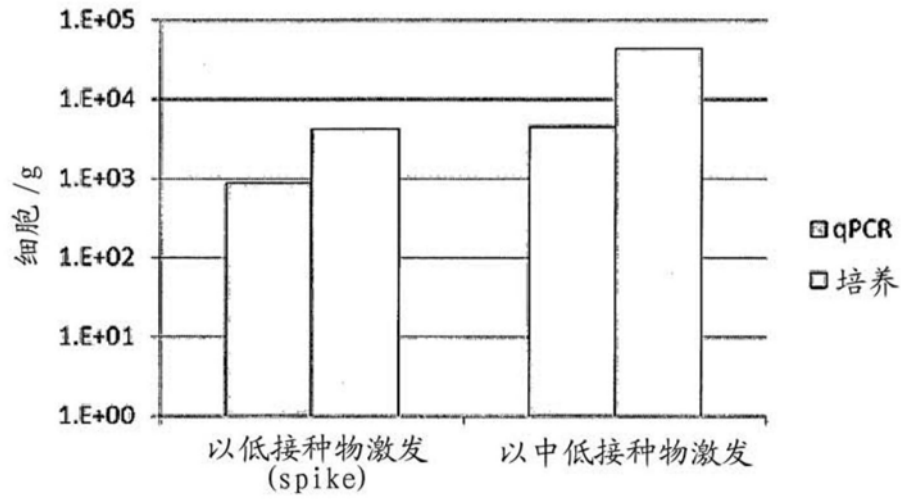


图1

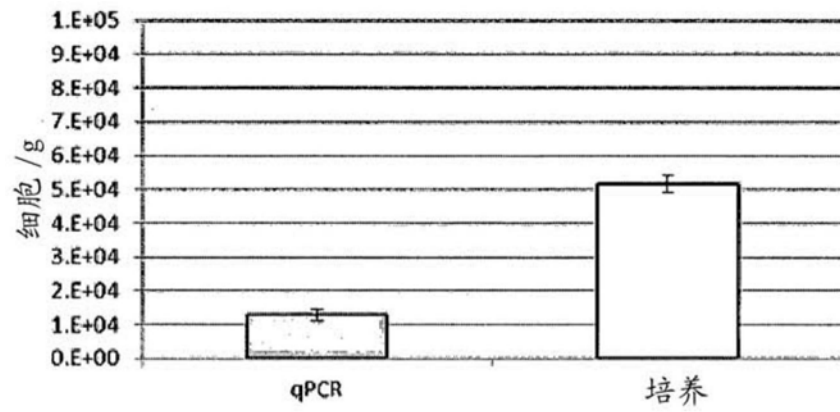


图2

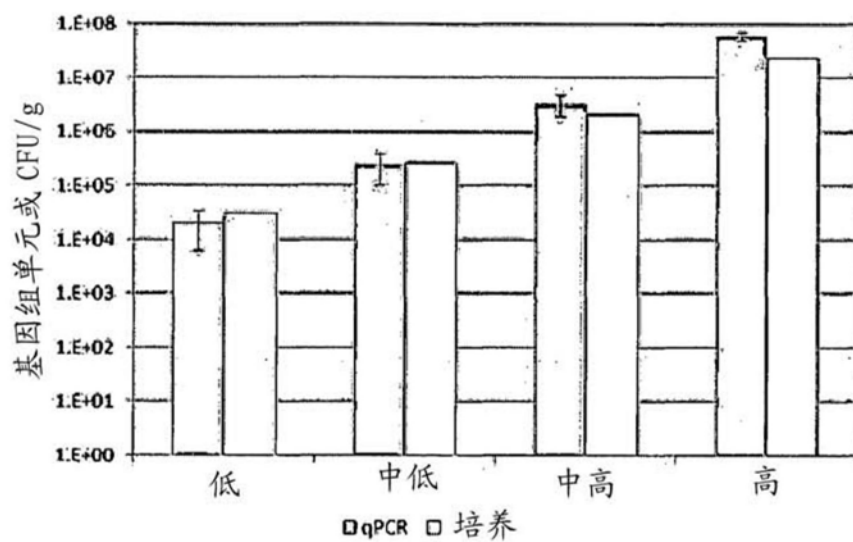


图3a

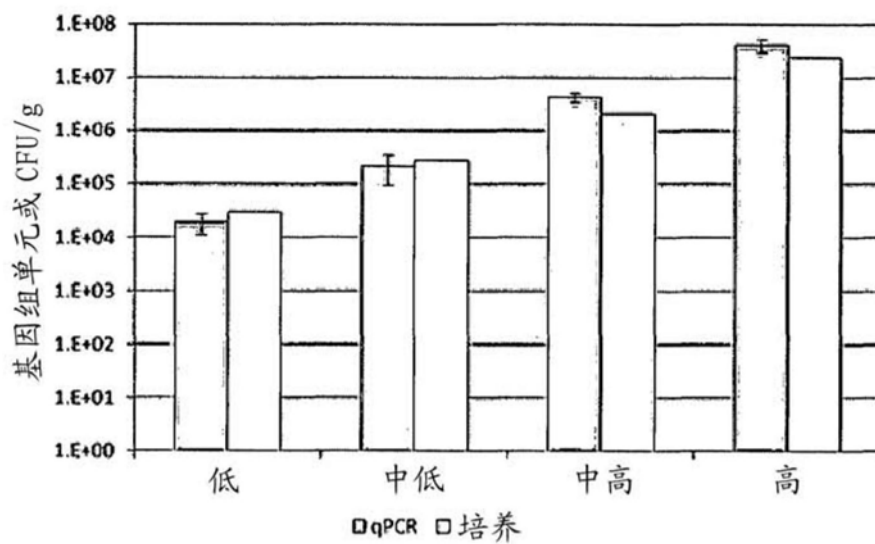


图3b

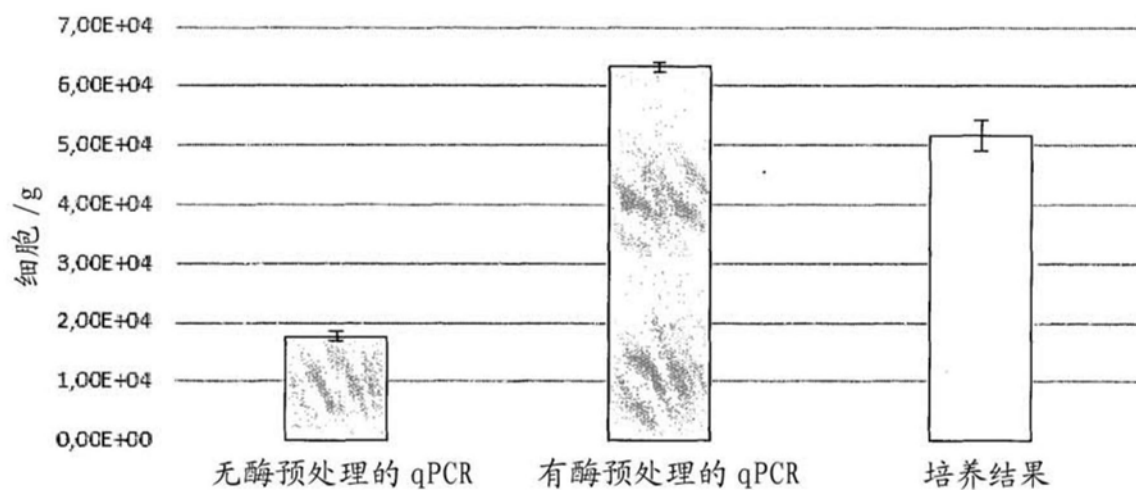


图4

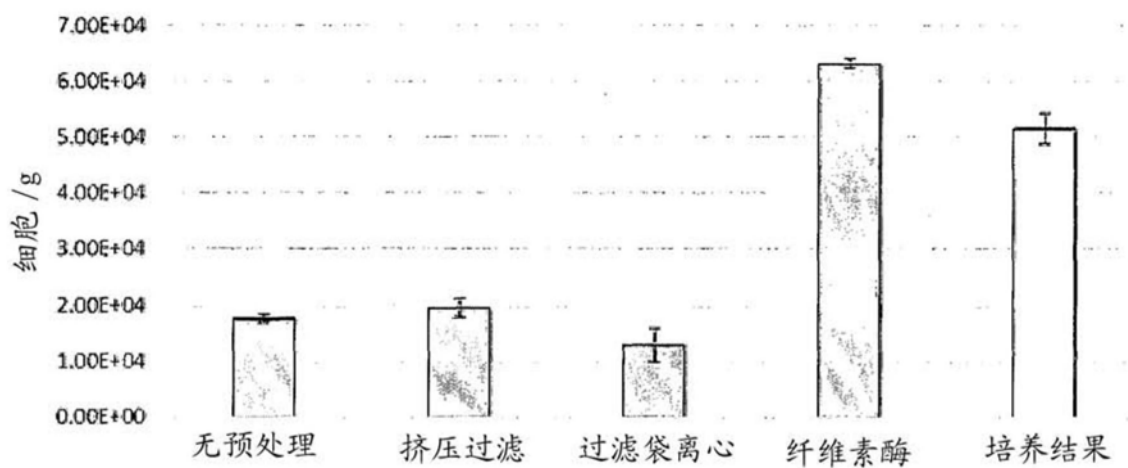


图5