

微生物源蛋白酶对杀菌乳品质的影响 及监控研究进展

包雨飞¹, 杜新慧², 贺凯茹¹, 崔国庆³, 岳国婷³, 乌日娜¹, 张德喜^{2*}, 武俊瑞^{1*}

(1. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁省食品发酵技术工程研究中心, 沈阳市微生物发酵技术创新重点实验室, 辽宁沈阳 110866) (2. 蒙牛乳业(沈阳)有限责任公司, 辽宁沈阳 100122) (3. 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 内蒙古呼和浩特 010010)

摘要: 微生物源蛋白酶是一种常见的酶类物质, 即使在经过热处理或其他杀菌方法处理后, 仍有可能在杀菌乳中残留并继续发挥作用, 包括但不限于导致乳制品腐败变质、引发异常风味以及诱发凝胶化等质量问题。然而, 由于微生物源蛋白酶具有较高的稳定性, 在杀菌乳生产过程中, 如何有效地控制和消除微生物源蛋白酶的影响, 至今仍是引起乳制品质量与安全问题的重大威胁。该文着重探讨了影响杀菌乳品质的微生物源蛋白酶的种类和特性、对杀菌乳品质的具体影响, 以及对微生物源蛋白酶在杀菌乳生产加工过程中的监控技术方法进行归纳总结, 以期今后进一步对杀菌乳中微生物源蛋白酶及其监控技术方法进行深入研究提供参考。

关键词: 微生物源蛋白酶; 杀菌乳; 品质影响

文章编号: 1673-9078(2025)06-337-345

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.6.0383

Effect of Microbial Protease on the Quality of Sterilized Milk and Its Monitoring Progress

BAO Yufei¹, DU Xinhui², HE Kairu¹, CUI Guoqing³, YUE Guoting³, WU Rina¹, ZHANG Dexi^{2*}, WU Junrui^{1*}

(1. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Liaoning Provincial Food Fermentation Technology Engineering Research Center, Shenyang Key Laboratory of Microbial Fermentation Technology Innovation, Shenyang 110866, China) (2. Mengniu Dairy (Shenyang) Co. Ltd., Shenyang 100122, China) (3. Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Co. Ltd., Hohhot 010010, China)

Abstract: Microbial proteases are common enzymes. Even after heat treatment or treatment(s) with other sterilization methods, these proteases may still remain in the sterilized milk and continue to function, including but not limited to quality and safety problems such as causing spoilage of dairy products, abnormal flavors, and gelation. However, due to the high

引文格式:

包雨飞, 杜新慧, 贺凯茹, 等. 微生物源蛋白酶对杀菌乳品质的影响及监控研究进展[J]. 现代食品科技, 2025, 41(6): 337-345.

BAO Yufei, DU Xinhui, HE Kairu, et al. Effect of microbial protease on the quality of sterilized milk and its monitoring progress [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(6): 337-345.

收稿日期: 2024-03-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172279); 蒙牛乳业横向合作项目(202309186027032916); 沈阳市科技创新平台项目(项目批准号: 21-104-0-14; 21-104-0-28)

作者简介: 包雨飞(2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物发酵, E-mail: 1922963248@qq.com

通讯作者: 张德喜(1979-), 学士, 工程师, 研究方向: 食品加工与检验, E-mail: zhangshuli@mengniu.cn; 共同通讯作者: 武俊瑞(1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: junruiwu@126.com

stability of microbial proteases, how to effectively control and eliminate the influence of microbial proteases in the production process of sterilized milk, is still a major threat to the quality and safety of dairy products. In this paper, a focus is placed on the types and characteristics of microbial proteases that affect the quality of sterilized milk, as well as the specific effects on the quality of sterilized milk. The monitoring techniques and methods of microbial proteases in the production and processing of sterilized milk are summarized, in order to provide a reference for further research on microbial proteases in sterilized milk and their monitoring technologies and methods in the future.

Key words: microbial-derived proteases; sterilized milk; quality influence

杀菌乳不仅满足了消费者对乳制品营养与安全的追求,同时也为企业在生产加工和贮藏运输方面提供了便利,因此在我国广受消费者的青睐^[1]。杀菌乳至今在我国的乳品消费市场中占据主导地位。然而,在杀菌乳加工过程中,微生物源蛋白酶的残留,可引起产品出现苦味、老化凝胶、脂肪上浮、风味劣化等质量与安全问题,还会对消费者的健康和安全造成威胁^[2]。

杀菌乳中常见的耐热蛋白酶主要是由微生物产生的,虽然嗜冷菌本身对杀菌乳的热处理没有抵抗力,但这些微生物可以产生耐热的蛋白酶,这些酶可以抵抗超高温等其他灭菌手段而残留在乳中,并在贮藏过程中发挥作用,使产品产生腐败变质。牛奶中的蛋白水解^[3]会导致其黏度增加、凝胶老化和产生苦味。在其他乳产品中^[4],微生物酶的残留活性会导致产品在到达保质期之前出现异味和其他质量缺陷。Machado 等^[5]研究结果表明,沙雷氏菌种因其产生热稳定蛋白酶和脂肪酶的能力而被定性为主要的牛奶破坏者,液化链球菌可能产生类似于荧光假单胞菌的耐热蛋白水解活性,这可能导致热处理牛奶的保质期缩短。目前对于杀菌乳稳定性的研究中表明,假单胞菌属是最常见也是研究最广泛的^[6]。其他菌属如芽孢杆菌、大肠杆菌等也可产生耐热酶。有研究发现当牛奶在超高温灭菌处理后接种不同菌株的荧光假单胞菌并在 20℃ 下储存 90 d 时,测试的九种菌株中有五株产生了热稳定的蛋白水解酶,最终导致超高温灭菌奶不稳定,而其他四种菌株没有产生热稳定的蛋白水解酶,超高温灭菌奶稳定。这表明耐热蛋白酶的残余活性会导致杀菌乳在储存过程中不稳定^[7,8]。

本文分别从微生物源蛋白酶的種類以及产酶微生物、不同耐热酶对乳品品质的影响、微生物源蛋白酶的监控技术方法等方面进行了较为详尽的归纳总结,以期为进一步研究和监控微生物源蛋白酶,提供参考。

1 乳品微生物源蛋白酶种类及特性

1.1 乳品微生物源蛋白酶种类

微生物源蛋白酶种类广泛,因此分类方式也有多种。但根据酶的最适 pH 值及温度进行分类是比较常见的。根据微生物源蛋白酶的最适 pH 值,可分为酸性、中性或碱性蛋白酶^[9]。酸性蛋白酶在 pH 值为 2.5~5.0 范围内具有活性,根据其产生菌的不同,微生物酸性蛋白酶可以分为霉菌酸性蛋白酶、酵母酸性蛋白酶。由于酸性蛋白酶具有较强的耐酸能力,也广泛应用于食品、医药及饲料等加工工业中^[10]。中性蛋白酶是在中性条件下作用于蛋白质肽键的一类蛋白酶。中性蛋白酶在 pH 值 5.0~8.0 范围内具有活性,与动物源中性蛋白酶相比,其产生的酶水解能力强而且水解产物苦味少等特点。

碱性蛋白酶的来源主要为细菌,其在自然界和人为环境中普遍存在^[12]。碱性蛋白酶产生细菌在自然界和人为环境中普遍存在。芽孢杆菌是用于碱性蛋白酶生产的最重要菌属之一,因为它们具有化学有机营养特性、迅速的生长速度、将细胞外酶分泌到培养基中并且可以安全处理。产碱性蛋白酶的菌种主要是黄曲霉、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌等^[13]。以上三类的产酶菌株如表 1 所示。

微生物蛋白酶也可根据微生物来源不同,可分为细菌蛋白酶及真菌蛋白酶^[20]。产细菌源蛋白酶主要为假单胞菌属、气单胞菌属、沙雷氏菌和芽孢杆菌属、大肠杆菌等。

根据近年来对杀菌乳质量缺陷问题的研究,目前研究较多导致杀菌乳产生质量缺陷的产酶菌株如表 2 所示。

1.2 乳品微生物蛋白酶的特性

近年来,有研究者对微生物蛋白酶的理化性质及作用机制进行重点研究,均有重大突破^[30]。微生物源蛋白酶有一系列的优点,但对于灭菌乳等产品,其弊大于利。

表 1 乳品常见微生物源蛋白酶种类及产酶微生物

Table 1 Common microbial protease species and enzyme-producing strains		
微生物源蛋白酶类型	产酶菌株	参考
酸性蛋白酶	米曲霉、黑曲霉	[10,12]
	泡盛酒曲霉	
中性蛋白酶	宇佐美曲霉	[11-13,24]
	青霉、根霉	
碱性蛋白酶	芽孢杆菌属微生物	[10,14-19]
	(如枯草芽孢杆菌、耐热解蛋白芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌)	
	米曲霉、不动杆菌	
	芽孢杆菌属微生物	
	(如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜碱性芽孢杆菌属、解淀粉芽孢杆菌属、短小芽孢杆菌属)	
	假单胞菌属、盐球菌属、盐杆菌属、纳特罗诺球菌属、克雷莫里斯链球菌	

表 2 影响杀菌乳品质的微生物及其蛋白酶种类及特性

Table 2 Types and characteristics of microorganisms and proteases that affect the quality of sterilized milk			
群	属 / 种的例子	液态奶变质的关键表型特征概述	参考
假单胞菌属	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	许多菌株可产生细胞外酶（如耐热蛋白酶） 假单胞菌产生一种金属蛋白酶，能够耐超高温残存在乳中	[21,22]
	<i>Pseudomonas fragi</i>		
	<i>Pseudomonas lundensis</i>		
	<i>Pseudomonas put</i> a		
大肠菌群	<i>Bacillus</i>	许多菌株可以产生细胞外酶（如耐热蛋白酶） 沙雷氏菌产生两种耐热的锯齿蛋白酶；液化链球菌被证明分泌一种由 ser2 基因编码的的耐热腐败金属蛋白酶	[23-27]
	<i>Klebsiella</i>		
	<i>Citrobacterium</i>		
	<i>Hafnia</i>		
	<i>Serratia</i>		
非大肠菌群、非革兰氏假单胞菌阴性菌	<i>Aeromonas 2</i>	许多菌株可以产生细胞外酶（如耐热蛋白酶）	[28]
	<i>Flavobacterium</i>		
	<i>Acinetobacter</i>		
	<i>Non-coliform Enterobacteriaceae (Eeb)</i>		
革兰氏阳性孢子成形剂	<i>Member of the Bacillus cereus group</i>	一些菌株产生细胞外酶（例如蛋白酶和脂肪酶）	[29]
	<i>Paenibacillus</i>		

1.2.1 微生物源蛋白酶的稳定性

微生物源蛋白酶相对于其他来源蛋白酶具有优势，Banerjee 等^[31]报道了细胞外酶的几种来源，由于成本低，一般来说，细胞外蛋白酶可用性方面比细胞内蛋白酶具有优势。Zhang 等^[32]研究分析了沉积物中可产蛋白酶细菌的多样性以及这些菌株分泌的细胞外蛋白酶类型，揭示了产蛋白酶细菌及其胞外蛋白酶的微生物种类多样性。有研究报道细胞外碱性金属蛋白酶 *AprX* 作为嗜冷微生物乳汁污染的标志物^[33]，其也是超高温灭菌奶变质的潜在风险。这种微生物群能够在低温下生长，并可以产生细胞外蛋白酶。在生牛奶中发现的大多数嗜冷细菌都可以通过巴氏杀菌和超高温（UHT）灭活。然而，尽

管微生物源蛋白酶具有稳定性，但它们仍然是影响产品质量的因素。

1.2.2 难分离且纯度不高

现有的纯化方法大多采用阴离子交换层析、分子筛层析、阳离子交换层析和染料亲和层析组合的多步层析法来保证蛋白酶的纯度，然而此法步骤繁杂，耗时长且回收率低。Yang 等^[34]对 55 株蜡样芽孢杆菌进行了评价，其中 25 株具有蛋白酶生成能力的菌株用于研究蛋白水解活性和蛋白酶耐热性，并采用硫酸铵沉淀、离子交换色谱、凝胶过滤层析纯化蜡样芽孢杆菌蛋白酶，进行储存试验。Barzkar 等^[35]使用硫酸铵来沉淀蛋白质，通过单一技术或组合多种方法进行进一步纯化，并且该研究

表示纯化程序通常依赖于非特异性色谱技术,例如凝胶过滤、离子交换色谱和疏水作用色谱。结果表明,通过多种方法结合分离纯化,才可获得较高纯度的蛋白酶。付欧等^[36]将前期筛选获得的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. BBE201108 发酵培养后,以其发酵上清液作为蛋白酶的粗酶液,经过硫酸铵分级沉淀、QFF 阴离子交换层析和 Superdex75 凝胶过滤层析这 3 个阶段的纯化,才得到较纯的蛋白酶。

1.2.3 易受培养环境影响

细菌酶的产生率取决于几个培养参数,如温度、pH 值、维生素、水分、接种物大小、碳和氮源,并可以通过优化参数提高;Zhai 等^[25]研究,开发了一种用于猪胴体堆肥的微生物源蛋白酶,该酶是从猪胴体合成分离出一种产蛋白酶的菌株,被鉴定为粘质沙雷氏菌,其最佳发酵条件温和,在相似的环境中具有较高的活性和稳定性。

1.2.4 微生物源蛋白酶的作用机制

外源性酶并非天然存在于牛奶中,而是在加工前或加工过程中由牛奶中的细菌产生。在这些外源酶中,来自嗜冷细菌的耐热蛋白酶在凝胶老化中是最重要的^[37]。通常发现由外源性酶诱导的凝胶老化涉及 κ -酪蛋白(κ -CN)的裂解,产生胶束和副产物。这导致酪蛋白胶束非常不稳定,类似于奶酪制造过程中凝乳酶作用于酪蛋白形成的酪蛋白胶束^[38,39]。Li 等^[40]提出了一种具有有限蛋白水解的超高温灭菌奶凝胶老化的物理化学机制。凝胶化过程被描述为由储存过程中部分 κ -CN 耗尽的酪蛋白胶束的逐渐沉降引发。这导致容器底部的胶束浓度更高,在适当的物理化学条件下,在长时间储存期间,胶束可能会从底部发展成凝胶。Baglinière 等^[41]对具有不同蛋白水解活性的液化链球菌菌株分泌的耐热蛋白酶污染的原料奶制成的超高温灭菌奶的稳定性进行测定,为了表明蛋白酶 *Ser2* 是不稳定的原因,在 UHT 处理之前将这种纯化形式的蛋白酶添加到原料奶中。在 90 d 的储存过程中,评估了 UHT 乳的不稳定性,发现随着储存过程的进行, κ -CN 的数量显著下降并沉积,导致原本用以维持乳稳定的 β -乳球蛋白和 κ -CN 的共价结合产物遭到破坏,进而引起乳凝胶老化现象的发生。

2 微生物源蛋白酶对杀菌乳品质的影响

杀菌乳是一种受欢迎的乳制品,以其长保质期和便利性而广受消费者的喜爱,其经净化、均

质、灭菌和无菌包装或包装后再进行灭菌,从而具有较长保质期的可直接饮用的商品乳。杀菌乳常分为巴氏杀菌牛奶、延长保质期(ESL)牛奶、超高温(UHT)牛奶。这些牛奶的加热过程消除了病原体并延长了未开封包装的保质期。在预测的保质期内,仍然可能发生变质,使食品无法供人类消费。除了对牛奶包装的物理损坏外,它还表现为微生物的生长或酶促反应导致酸味、质地变化或异味的产生^[2]。目前在货架期内常出现的质量缺陷如风味劣变、乳清析出以及陈化凝胶等现象。然而,巴氏杀菌后的污染在牛奶行业仍然是一个很大的问题,50% 的液态奶在巴氏杀菌后可能会被热不稳定的细菌污染^[42]。这些不良现象与液态乳中残留的蛋白酶活性以及储存条件有关,当液态乳杀菌不彻底或者仍有部分蛋白酶残留时,残留的耐热酶活性会导致杀菌乳出现质量缺陷,包括粘度增加、沉淀、凝胶老化、脂肪分离和苦味^[21]。

2.1 微生物源蛋白酶引起杀菌乳风味劣化

正常杀菌乳应呈现乳白色或稍带黄色。当乳色泽较深时,则可能发生了不同程度地褐变。杀菌乳的感官性状,包括味道和颜色这几个重要因素会直接影响消费者接受度。邓应旺^[43]研究表明当已添加荧光假单胞菌 W3 胞外蛋白酶的 UHT 直接和间接超高温灭菌处理之间的加热曲线差异会影响牛奶中的沉淀物水平;特别是与直接超高温灭菌乳与对照组相比,添加蛋白酶的 UHT 乳的白度值均减小,而未添加蛋白酶的对照组在贮藏期间的色泽改变程度低于前者。

目前国内外关于微生物酶的相关报道已有很多,其中一些是能够承受巴氏杀菌甚至超高温灭菌处理并在杀菌乳中,其残留活性会导致产品在产品到达保质期之前出现异味和其他质量缺陷。这个问题对于超高温灭菌奶等保质期长的乳制品来说更为重要^[4]。研究表明超高温灭菌奶的质量在储存过程中会受到嗜冷菌的影响,导致风味变差^[44]。超高温灭菌奶中的苦味主要是由蛋白酶水解产生的特定分子量的肽引起的,通过热处理后的牛奶中残存的 *AprX* 仍会导致产品后期缺陷,如产生凝胶化或者在产品或货架期内形成苦味。Valentin 等^[45]研究了在 20 °C 下储存 14 周期间直接加热的 UHT 牛奶中蛋白酶的特异性和蛋白水解途径与凝胶老化和苦肽的关系。来自 α 的 66 种肽 S - β 酪蛋白可归因于贮藏期间的纤溶酶活性,其中 23 种可能是苦味的。

Karlsson 等^[46]通过同时对进行储藏实验的 UHT 乳的风味、酶活性进行分析,发现随着储存实验的进行,UHT 乳整体酶活性在逐步上升;在 30 °C 和 37 °C 下储存的 UHT 乳出现明显的风味偏差,其甜味水平略低于正常值,而酸味水平则远高于正常值。该作者推测,用于工厂 UHT 生产的原料奶中的酶活性可能是造成其货架期内风味异常的原因之一。

2.2 微生物源蛋白酶引起杀菌乳蛋白质沉淀

沉淀是牛奶在储存过程中发生的一个变化,其中在包装底部形成一层物质,一般来说,沉淀物由牛奶蛋白组成,特别是酪蛋白^[47]。其原因是牛奶的不稳定性导致超高温灭菌处理后产生沉淀。研究发现,直接超高温灭菌处理的牛奶比间接超高温灭菌处理的牛奶更容易形成沉淀物,直接和间接超高温灭菌处理之间的加热曲线差异会影响牛奶中的沉淀物水平;特别是与直接超高温灭菌处理中采用的快速加热相比,间接加热的较慢加热步骤降低了沉积物水平。Anema 等^[39]提出了一种在超高温灭菌奶样品中形成沉淀物的机制:造成沉淀物的倾向取决于生产超高温灭菌奶时的 pH 值 / 离子钙水平。牛奶的超高温处理导致 κ -CN 与酪蛋白胶束解离,剩余 κ -CN 耗尽胶束本身不稳定,在某些环境条件下容易聚集。当离子钙水平高于临界水平和 / 或牛奶的 pH 值低于临界水平时,在储存的最初几周内,通过钙诱导的桥接, κ -CN 耗尽的酪蛋白胶束的一些聚集,这些聚集体相对较快地沉降到底部并融合在一起形成高水平的致密沉淀物。

2.3 微生物源蛋白酶引起杀菌乳凝胶老化

灭菌牛奶在储存期间的凝胶化,也称为凝胶老化,是指在超高温灭菌奶中形成奶油冻状或凝乳状稠度,这种稠度从底部开始,在延伸到整个包装之前逐渐向上发展。凝胶老化是一个不可逆的过程,会严重改变牛奶的流动性,限制 UHT 牛奶的保质期。目前有相关报道,灭菌乳的凝胶老化的形成机理主要与灭菌后残留的蛋白酶活性相关,这些蛋白酶在超高温处理过程中残留,并在储存过程中水解牛奶蛋白质形成肽,从而破坏蛋白质系统的稳定性并导致异味和凝胶化。这种情况给乳制品安全带来了隐患^[34]。

有相关研究者根据现有信息提出了微生物源蛋白酶破坏牛奶稳定性的可能机制途径。 κ -CN 的这种水解可能伴随着其他酪蛋白的一些水解,特别

是 β -酪蛋白,通常细菌蛋白酶首先水解位于外层的 κ -CN^[48],从而降低了酪蛋白胶束和乳脂球的稳定性。因此,它们相互混合形成沉淀物。因此,UHT 乳的蛋白酶稳定性也可通过乳中酪蛋白胶束的大小分布来体现,其对于乳制品的结构和口感具有重要意义。有相关研究表明,对于含有 *AprX* 的超高温灭菌奶,与正常奶对照而言,其粒径增大,使乳更易产生凝块^[49]。王辉等^[50]研究表明残留的耐热酶在产品货架期内会缓慢分解蛋白、脂肪等成分而导致多种质量缺陷,包括黏度增加。还有研究通过测定 zeta 电位,发现不同样品中被荧光假单胞菌污染的样品稳定性变化最快,凝胶化程度越大,这表明其直接影响了分散体系的稳定性^[51]。分散系统的稳定性受所用菌株、接种浓度和储存时间的影响。

3 乳中微生物源蛋白酶的检测技术及控制措施

3.1 乳中微生物源蛋白酶检测方法及存在问题

蛋白酶的存在,是液态乳凝胶老化、蛋白沉淀、产生苦味等品质缺陷的重要因素之一。为了控制蛋白酶引起的质量问题,需要对牛奶中蛋白酶活力进行测定。因此,对杀菌乳中微生物源蛋白酶的检测方法进行比较如表 3 所示,为乳品企业提供方便快捷的检测方法。

3.2 杀菌乳微生物源蛋白酶的控制措施

若要提高杀菌乳的质量,要考虑微生物源蛋白酶所带来的影响,主要是对杀菌乳工艺流程中可能造成产品质量缺陷的问题进行控制以及控制微生物源蛋白酶的新型有效策略。

目前,大多数杀菌乳的工艺流程为原料乳→预处理→预热→杀菌→冷却→灌装→检测→成品。因此对其可能造成污染的工艺过程进行分析。原料奶在加工前会变质,这可能是由于卫生条件差和储存温度不足造成的^[57]。Karlsson 等^[46]通过巴氏杀菌乳的工厂和使用原料奶生产杀菌乳的工厂进行比较,结果发现在储藏过程中的稳定性变化相似,但是使用原料奶生产杀菌乳产品产生了更多的沉淀物。使用高质量的原料奶对于实现超高温灭菌奶的长保质期至关重要。因此对生产优质杀菌乳的生乳有较高的要求。相关设备也被证明是原料奶污染的重要来源^[58]。

表 3 乳中微生物源蛋白酶检测方法及存在问题

检测方法	原理	存在问题
福林酚试剂法 ^[52]	蛋白酶在一定的温度和 pH 值下能够水解酪素底物，产生含有酚基的氨基酸如酪氨酸，在碱性条件下与福林试剂反应，生成钼蓝与钨蓝，通过紫外分光测定方法光度计测定，从而计算出蛋白酶的活力。	其测定结果能够直接客观地反应出牛奶中蛋白酶活力，精确度、准确度和灵敏度高，重复实验结果的重现性好，适合于牛奶中蛋白酶活力的精密测定；但是福林法虽然操作复杂，费时。
邻苯二甲醛衍生比色法 ^[53]	邻苯二甲醛衍生试剂在碱性介质中与游离氨基酸反应生成异吲哚衍生物，在 340 nm 下有特征吸收，通过测定吸光度计算出牛奶中游离氨基氮的浓度，以此反映出蛋白酶的活力。	邻苯二甲醛衍生比色法精确度和准确度高，灵敏度高，反应时间短，但测定过程中由温度引起的 SDS 溶解性问题对测定结果影响较大，适合于不同样品间蛋白酶活力的精确比较。
甲醛法 ^[54]	通过测定牛奶中氨基酸态氮的质量浓度来反映蛋白酶的活力。其原理是利用了氨基酸的两性作用，甲醛能够固定氨基的碱性，使氨基酸的羧基显示出酸性，通过氢氧化钠标准溶液进行滴定，分别测定原样品和加入甲醛后的样品消耗氢氧化钠的量，以此计算出牛奶中蛋白酶的活力。	甲醛法是以 100 mL 牛奶中氨基酸态氮的质量来表征蛋白酶活力的，操作简单，但是准确性和精确度都较低，重复实验时结果的重现性不好，适合于粗略性和比较性测定。
酶联免疫分析法 ^[55]	将抗原或抗体结合在固相载体表面，利用抗原抗体的特异性结合以及抗体或者抗原上标记的酶催化特定底物发生显色反应，实现目标物检测的免疫分析方法，可测至皮摩尔（pmol）级别。	检测精度不高，检测结果受很多因素的影响，可能会出现假阳性或假阴性结果；ELISA 技术只能检测特定抗原或抗体，无法检测复杂的抗原抗体复合物。
电化学方法 ^[56]	该方法利用了包含蛋白酶特定底物结构域的未标记肽，该肽可以轻松操作并通用化用于分析各种蛋白酶。具体而言，通过 C 末端半胱氨酸残基的化学吸附将肽固定在金电极表面上，形成衍生自 N 末端阳离子残基的带正电的界面。	该方法费时费力、需要复杂的肽标记。

此外，也有相关研究提出新型有效策略，供进一步研究。李欣霏等^[59]对相关控制耐热酶的进展进行研究及总结，提出了一种控制乳品中污染菌体数量的新型杀菌方法，结合超声波和热可灭活乳中耐热芽孢杆菌，不但能避免传统高温处理的缺陷，而且具有高效安全等优点。Wang 等^[60]成功地开发了一种新的光子 - 声子耦合（PPC）冷杀菌技术，与传统的热处理相比，该方法对牛奶中的营养成分以及牛奶的颜色等指标影响都很小。Lott 等^[61]的研究结果证实微滤是一种可行的加工工具，可以通过其去除原料奶中的细菌污染物来大大延长液态奶的保质期。艾正文等^[62,63]提出一种较为新颖的加工技术手段称超高压均质，研究表明超高压均质不仅可以灭活假单胞菌，并且对假单胞菌蛋白酶同样具有一定的灭活作用。150 MPa 压力下生乳样品（脂肪含量 3 g/100 g）中的假单胞菌蛋白酶可减少 51%。Guglielmotti 等^[64]评估了传统热处理和高压均质化对变质奶酪中菌株的灭活，结果表明，在经过单次的均质化处理和单独的热处理对灭活菌株并不会显著的效果，但在高压均质化和热处理相结合，不仅可以有效的使微生物灭活，还可以最大限度地保留产品的理化性质。D’Incecco 等^[65]的研究结果也发现双重均质化相较于单次均质化的预处理对延长杀菌乳的效果更好，也表明将微滤和超高温高压与传

统超高温杀菌乳相结合是一种有效的策略。

4 未来展望

目前，消费者更加追求营养成分更高的产品，而杀菌乳等产品能够满足消费者所需要的安全且营养成分高的产品，如超高温灭菌奶等灭菌乳，但研究发现在其货架期内常出现质量缺陷，如凝块、苦包、胀包等品质劣变现象，严重威胁企业的效益以及消费者安全。

为了提高杀菌乳品质，应建立新型快速、精确度高的检测方法，如：生物传感器技术的应用可以实现对微生物活性或其代谢产物的实时监测；利用人工智能和机器学习技术分析大量的乳制品样品数据，可以建立起模型来预测和识别微生物源蛋白酶的存在和水平，这种方法可以结合各种检测技术获取的数据，提高检测的准确性和效率；微流控芯片技术结合了微流体学和生物检测技术，可以在微小尺度上实现对微生物的检测和分析，未来可以开发针对微生物源蛋白酶的微流控芯片，实现对乳制品中微生物源蛋白酶的高通量检测和管理。此外，乳品行业也面临着工艺方面的控制手段，应将多种方式结合，开发一种新型杀菌方法，有效的降低杀菌乳中耐热酶的存活率，从而生产出安全的产品。

参考文献

- [1] 张文书.原料乳中耐热蛋白酶对UHT乳品质的影响研究[D].北京:中国农业科学院,2012.
- [2] MACHDO S G, BAGLINIÈRE F, MARCHAND S, et al. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 228133.
- [3] ZHANG D, JON P, KOON H T, et al. Identification and selection of heat-stable protease and lipase-producing psychrotrophic bacteria from fresh and chilled raw milk during up to five days storage [J]. *LWT*, 2020(134-): 134.
- [4] Von N M, BAUE C, KREWINKEL M, et al. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015(211-): 57-65.
- [5] MACHADO S G, HEYNDRIKX M, DE Block J, et al. Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk [J]. *Food Microbiol*, 2016: 65-71.
- [6] AGUILERA-TORO M, KRAGH M L, THOMASEN A V, et al. Proteolytic activity and heat resistance of the protease *AprX* from *Pseudomonas* in relation to genotypic characteristics [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2023, 391: 110147.
- [7] AURÉLIE M, MURIEL G, FRANOIS B, et al. Proteolysis of milk proteins by *AprX*, an extracellular protease identified in [i]*Pseudomonas*[i] LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk [J]. *International Dairy Journal*, 2015, 49: 78-88.
- [8] GLÜCK C, RENTSCHLER E, KREWINKEL M, et al. Thermostability of peptidases secreted by microorganisms associated with raw milk [J]. *International Dairy Journal*, 2016, 56: 186-197.
- [9] 关猛猛,韩玉婷,鱼红闪.微生物源蛋白酶筛选及调控技术研究进展[J].*饲料研究*,2022(22):153-156.
- [10] 张美香,刘娜,蔡静平,等.微生物源酸性蛋白酶的研究进展[J].*河南工业大学学报(自然科学版)*,2009,30(6):88-92.
- [11] DU L Y, WANG J, CHEN W Z, et al. Isolation and purification of *Bacillus amyloliquefaciens* D1 Protease and its application in the fermentation of soybean milk to produce large amounts of free amino acids [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2023, 195(1): 451-466.
- [12] GURUNATHAN R, HUANG B, PONNUSAMY V K, et al. Novel recombinant keratin degrading subtilisin like serine alkaline protease from *Bacillus cereus* isolated from marine hydrothermal vent crabs [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 12007.
- [13] 黄子凌,莫港澳,李文,等.高产中性蛋白酶菌株的诱变选育及益生特性[J].*食品与发酵工业*,2021,47(17):84-90.
- [14] 万明铤. 高产碱性蛋白酶菌株的筛选及酶学性质的研究[D]. 甘肃:兰州理工大学,2023.
- [15] 魏桐.产蛋白酶海洋微生物的筛选、鉴定及酶的应用研究[D]. 江苏:江苏海洋大学,2022.
- [16] 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.
- [17] ACCUMANNO G M, RICHARDS V A, GUNTHER N W, et al. Purification and characterization of the thermostable protease produced by *Serratia grimesii* isolated from channel catfish [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(5): 2428-2437.
- [18] DUTT K, MEGHWANSHIG K, GUPTA P, et al. Role of casein on induction and enhancement of production of a bacterial milk clotting protease from an indigenously isolated *Bacillus subtilis* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 46(5): 513-518.
- [19] KESHAPAGA U R, JATHOTH K, Singh S S, et al. Characterization of high-yield *Bacillus subtilis* cysteine protease for diverse industrial applications [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2023, 54(2): 739-752.
- [20] 李雪,蔡丹,沈月,等.微生物来源蛋白酶的研究进展[J].*食品科技*,2019,44(01):32-36.
- [21] ZHANG C, BIJLE, SVENSSON B, et al. The Extracellular Protease *AprX* from *Pseudomonas* and its Spoilage Potential for UHT Milk: A Review [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(4): 834-852.
- [22] DU B Y, MENG L, LIU H M, et al. Diversity and proteolytic activity of *Pseudomonas* species isolated from raw cow milk samples across China [J]. *Science of The Total Environment*, 2022, 838: 156382.
- [23] JÚNIOR J C R, DEOLIVEIRA A M, SILVAF G, et al. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(1): 75-83.
- [24] YUAN L, SADIQ F A, LIU T J, et al. Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermostability of their enzymes [J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2018, 19(8): 630-642.
- [25] ZHAI W, LI X T, DUAN X R, et al. Development of a microbial protease for composting swine carcasses, optimization of its production and elucidation of its catalytic hydrolysis mechanism [J]. *BMC Biotechnology*, 2022, 22(1): 1-15.
- [26] STOECKEL M, LIDOLT M, ACHBERGER V, et al. Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life [J]. *International Dairy Journal*, 2016, 59: 20-28.
- [27] MASIELLO S, MARTIN N, Trmčić A, et al. Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016,

- 99(1): 130-140.
- [28] SINGH, SANTOSH K, VINAYAK R T, et al. Downstream processing, characterization, and structure-function relationship of solvent-, detergent-, psychro-, thermo-, alkalistable metalloprotease from metal-, solvent-tolerant psychrotrophic *Pseudomonas putida* SKG-1 isolate [J]. *Biotechnology Progress*, 2013, 29(1): 99-108.
- [29] YANG X Y, WANG Z H, ZHANG C X, et al. Assessment of the production of *Bacillus cereus* protease and its effect on the quality of ultra-high temperature-sterilized whole milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(6).
- [30] 韩爽, 张健, 井月欣, 等. 微生物源蛋白酶研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(13): 321-327.
- [31] BANERJEE G R A K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries [J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2017, 33: 119-143.
- [32] ZHANG X Y, HAN X X, CHEN X L, et al. Diversity of cultivable protease-producing bacteria in sediments of Jiaozhou Bay, China [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1021.
- [33] MORANDI S, PICA V, MASOTTI F, et al. Proteolytic traits of psychrotrophic bacteria potentially causative of sterilized milk instability: Genotypic, phenotypic and peptidomic insight [J]. *Foods*, 2021, 10(5): 934.
- [34] YANG X Y, WANG Z H, ZHANG C X, et al. Assessment of the production of *Bacillus cereus* protease and its effect on the quality of ultra-high temperature-sterilized whole milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(6): 6577-6587.
- [35] BARZKAR N. Marine microbial alkaline protease: An efficient and essential tool for various industrial applications [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 161(15): 1216-1229.
- [36] 付欧, 张娟, 堵国成, 等. 可降解大豆过敏原蛋白酶的纯化与酶学性质[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(4): 350-356.
- [37] 胡少震, 代良超, 张书文, 等. 原料乳和牧场环境中嗜冷菌多样性及蛋白酶水解特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(8): 24-30.
- [38] ANEMA S. Storage stability and age gelation of reconstituted ultra-high temperature skim milk [J]. *International Dairy Journal*, 2017, 75: 56-67.
- [39] ANEMA S G. Age gelation, sedimentation, and creaming in UHT milk: A review [J]. *John Wiley & Sons, Ltd*, 2019, 18(1): 140-166.
- [40] LI S Q, YE A Q, SINGH H. Physicochemical changes and age gelation in stored UHT milk: Seasonal variations [J]. *International Dairy Journal*, 2021, 118: 105028.
- [41] BAGLINÈRE F, JARDIN J, GAUCHERON F, et al. Proteolysis of casein micelles by heat-stable protease secreted by *Serratia liquefaciens* leads to the destabilisation of UHT milk during its storage [J]. *International Dairy Journal*, 2017, 68: 38-45.
- [42] MARTIN N H, BOOR K J, WIEDMANN M. Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality [J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(1): 861-870.
- [43] 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.
- [44] LOTT T T, WIEDMANN M, MARTIN N H. Shelf-life storage temperature has a considerably larger effect than high-temperature, short-time pasteurization temperature on the growth of spore-forming bacteria in fluid milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2023, 106(6): 3838-3855.
- [45] VALENTIN M R, LENE B J, RICHARD Ipsen, et al. Plasmin activity in UHT milk: Relationship between proteolysis, age gelation, and bitterness [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(28): 6852-6860.
- [46] KARLSSON M A, LANGTON M, INNINGS F, et al. Changes in stability and shelf-life of ultra-high temperature treated milk during long term storage at different temperatures [J]. *Heliyon*, 2019, 5(9).
- [47] GAUR V, SCHALK J, ANEMA S G. Sedimentation in UHT milk [J]. *International Dairy Journal*, 2018, 78: 92-102.
- [48] ZHANG C Y, BIJL E, MUIS K E, et al. Stability of fat globules in UHT milk during proteolysis by the AprX protease from *Pseudomonas fluorescens* and by plasmin [J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(1): 179-190.
- [49] ZHANG C Y, BILE E, HETTINGA K. Destabilization of UHT milk by protease *AprX* from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin [J]. *Food Chemistry*, 2018, 263: 127-134.
- [50] 王辉, 孙琦, 刘鹭, 等. UHT 乳货架期预测模型的建立及检验[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(3): 586-594.
- [51] QIN X, CHENG J, QI X H, et al. Effect of thermostable enzymes produced by psychrotrophic bacteria in raw milk on the quality of ultra-high temperature sterilized milk [J]. *Foods*, 2023, 12(20): 3752.
- [52] 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.
- [53] 张艳, 郭利春, 郭奇慧, 等. UHT 乳结块原因分析[J]. *食品研究与开发*, 2007(12): 84-86.
- [54] 康小红, 孙国庆, 付治军, 等. UHT 牛奶蛋白凝块产生原因及控制措施的研究[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(5): 165-167.
- [55] SEIA M A, STEGE P W, PEREIRA S V, et al. Silica nanoparticle-based microfluidic immunosensor with laser-induced fluorescence detection for the quantification of immunoreactive trypsin [J]. *Analytical Biochemistry*, 2014, 463: 31-37.
- [56] CAO Y, YU J C, BO B, et al. A simple and general approach

- to assay protease activity with electrochemical technique [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 45: 1-5.
- [57] CHAVAN R S, CHAVAN S R, KHEDKAR C D, et al. UHT milk processing and effect of plasmin activity on shelf life: A review [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2011, 10(5): 251-268.
- [58] MACHADO S G , BAGLINIÈRE F, SOPHIE M ,et al. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 228133.
- [59] 李欣霏,杨姗姗,贺凯茹,等.声热耦合杀菌对乳中耐热枯草芽孢杆菌抑制作用研究进展[J/OL].食品科学,1-12.
- [60] WANG X, YU J, WU H, et al. Photon-phonon coupling cold sterilization technology for milk preservation [J]. Food Control, 2024, 157: 110169.
- [61] LOTT T T, MARTIN NH, DUMPLER J, et al. Microbacterium represents an emerging microorganism of concern in microfiltered extended shelf-life milk products [J]. Journal of Dairy Science, 2023, 106(12): 8434-8448.
- [62] 艾正文,徐致远,叶景锦.动态高压处理对牛乳中生物活性物质的影响[J].食品与机械,2023,39(7):210-214.
- [63] 艾正文.超高压均质对牛乳中微生物和酶的影响研究进展[J].乳业科学与技术,2022,45(2):42-46
- [64] GUGLIELMOTTI D M, PATRIGNANI F, LANCIOTTI R, et al. High pressure homogenization versus heat treatment: effect on survival, growth, and metabolism of dairy leuconostoc Strains [J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(9): 1634-1641.
- [65] D'INCECCO P, ROSI V, CABASSI G, et al. Microfiltration and ultra-high-pressure homogenization for extending the shelf-storage stability of UHT milk [J]. Food Research International, 2018, 107: 477-485.