

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241031005

引用格式: 张钰欣, 赵凯, 闵捷, 等. 超高温乳加工过程中纤溶酶活性变化规律的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(2): 63-71.

ZHANG YX, ZHAO K, MIN J, *et al.* Study on the changing rule of plasmin activity in processing of ultra high temperature milk [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(2): 63-71. (in Chinese with English abstract).

超高温乳加工过程中纤溶酶活性变化规律的研究

张钰欣^{1#}, 赵凯^{2#}, 闵捷¹, 贺凯茹¹, 李云江², 王敏², 乌日娜¹,
安飞宇¹, 赵三军^{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, 沈阳 110866; 2. 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 010010]

摘要: 目的 探究超高温(ultra high temperature, UHT)乳生产过程中可能影响纤溶酶活性的关键因素。

方法 采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 测定并分析从原料乳到 UHT 成品乳生产过程中多种因素对纤溶酶活性造成的影响。具体研究的影响因素包括牛患乳房炎程度、乳中体细胞数、接种疫苗、改变饲喂条件、离心处理、巴氏杀菌预热条件、微滤处理及 UHT 预热条件。**结果** 在原料乳阶段, 牛乳中纤溶酶活性高低与牛乳房炎的严重程度及乳中体细胞数呈现显著正相关, 而与牛是否接种疫苗或是否改变饲料种类无显著相关性。在生产加工阶段, 离心除菌会使得乳中纤溶酶活性略有上升; 55 °C 相比于其他温度的巴氏杀菌预热处理能最有效地抑制纤溶酶活性上升; 微滤可降低约 10% 的纤溶酶活性; 不同 UHT 预热处理均会导致酶活性上升, 其中 90 °C 处理 5 s 的条件下, 酶活性上升幅度较小, 仅为 1.52%。**结论** 牧场端需对患乳房炎的奶牛进行重点控制, 并关注体细胞数异常的牛乳。工艺端可采用合适的巴氏杀菌预热条件及 UHT 预热条件以抑制乳中纤溶酶活性上升, 可引入微滤工艺以降低纤溶酶活性。本研究为抑制 UHT 乳中纤溶酶活性及该酶对成品乳造成不良影响的相关研究提供科学依据。

关键词: 超高温乳; 纤溶酶; 酶联免疫吸附法

Study on the changing rule of plasmin activity in processing of ultra high temperature milk

ZHANG Yu-Xin^{1#}, ZHAO Kai^{2#}, MIN Jie¹, HE Kai-Ru¹, LI Yun-Jiang², WANG Min²,
WU Ri-Na¹, AN Fei-Yu¹, ZHAO San-Jun^{2*}, WU Jun-Rui^{1*}

收稿日期: 2024-10-31

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(21-104-0-14, 21-104-0-28)

#张钰欣和赵凯为共同第一作者

第一作者: 张钰欣(2001—), 女, 硕士, 主要研究方向为乳制品加工。E-mail: Beatrice010720@163.com

赵凯(1987—), 男, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为食品质量管理及乳品加工。E-mail: zhaokai@mengniu.cn

*通信作者: 赵三军(1983—), 男, 中级工程师, 主要研究方向为质量全面追溯及乳品加工。E-mail: zhaosanjun@mengniu.cn

武俊瑞(1977—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为食品科学。E-mail: junruiwu@126.com

[1. Shenyang Agricultural University, School of Food Science, Liaoning Food Fermentation Technology Engineering Research Center, Shenyang Key Laboratory of Microbial Fermentation Technology Innovation, Shenyang 110866, China; 2. Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Co., Ltd., Huhhot 010010, China]

ABSTRACT: Objective To investigate the key factors that may influence plasmin activity during the production of ultra high temperature (UHT) milk. **Methods** An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to assess and analyze the effects of various factors on plasmin activity throughout the UHT milk production process. The specific factors examined included the degree of mastitis in cows, somatic cell count in milk, vaccination status, changes in feeding conditions, centrifugation processes, pasteurization preheating conditions, microfiltration techniques, and UHT preheating conditions. **Results** At the raw milk stage, a significant positive correlation was observed between plasmin activity levels in bovine milk and both the severity of bovine mastitis and somatic cell counts. However, no significant correlation was found regarding vaccination status or changes in feed type. During UHT milk production, centrifugal sterilization resulted in a slight increase in plasmin activity; pasteurization preheating at 55 °C proved most effective at inhibiting this increase. Microfiltration reduced plasmin activity by approximately 10%. Additionally, varying UHT preheating conditions led to an overall increase in enzyme activity; however, under treatment at 90 °C for 5 seconds, a condition yielding only a minimal increase of 1.52%, the rise remained relatively low. **Conclusion** For pasture, it is essential to focus on managing cows with mastitis and monitoring those milk with abnormal somatic cell counts. At the processing stage, implementing appropriate preheating conditions for pasteurization and UHT can effectively inhibit increases in plasmin activity within milk. Furthermore, incorporating microfiltration can serve as an additional strategy to reduce such enzymatic activities. This study provides a scientific foundation for further research aimed at controlling elevations of plasmin activity in UHT milk.

KEY WORDS: ultra high temperature milk; plasmin; enzyme-linked immunosorbent assay

0 引言

超高温(ultra high temperature, UHT)乳为原料乳经超高温瞬时杀菌(135~150 °C加热 3~5 s)后无菌包装于微量透气的容器中所得到的产品^[1]。该处理可延长产品货架期,但所得产品中仍残存少量的耐热芽孢菌,且乳中的耐热酶仍可保留部分活性,在货架期内,二者共同作用于牛乳,导致产品品质降低。根据来源牛乳中的酶不同可分为内源酶和外源酶两种,内源酶来源于动物的血浆、体细胞和分泌细胞的顶膜或细胞质^[2],外源酶主要是乳中的微生物所产生的胞外酶。其中,纤溶酶是乳中主要的内源性耐热蛋白酶,占总蛋白酶活性的 60%左右^[3]。属于纤溶酶系统,该系统通过牛血液转运至乳腺细胞并分泌进入乳中,由纤溶酶、纤溶酶原(plasminogen, PG)、纤溶酶原激活剂(plasminogen activators, PA)、纤溶酶原激活剂抑制剂(plasminogen activator inhibitors, PAI)和纤溶酶抑制剂(plasmin inhibitors, PI)组成^[4]。纤溶酶受热处理的影响很小,原料乳在 75 °C、15 s 的巴氏杀菌处理下,纤溶酶活性仅降低 25%^[5];原料乳经超高温处理(137 °C, 4 s)后,纤溶酶仍残存 30%~40%活性^[6]。

UHT 乳在贮存期间,残留的纤溶酶会水解酪蛋白,进而造成乳出现苦味并且凝胶老化现象^[7]。经纤溶酶水解的

蛋白会形成具有苦味短肽和氨基酸残基,使牛乳出现苦味。纤溶酶通过水解胶束中的 β -和 $as2-/as1-CN$ 形成蛋白片段并释放到乳清相中,这些片段通过疏水作用和钙桥彼此结合形成凝胶^[8],导致牛乳出现凝胶老化。此外,纤溶酶能够促进分子间形成 β -折叠,导致蛋白沉积^[9]。上述由纤溶酶带来的不良影响降低了牛乳品质及企业效益,对消费者健康构成潜在威胁,因此需对乳中纤溶酶活性进行重点控制。

原料乳中纤溶酶和 PG 的含量受多种因素影响,如季节因素、体细胞数量的变化、胎次的不同、泌乳阶段的差异、产奶量的多少、品种、养殖模式等^[10]。成品乳中的纤溶酶活性水平受贮藏条件、热处理和 pH 等条件影响较大^[11]。目前国内外已有许多针对不同因素^[5,12-15]对纤溶酶活性影响的研究,但未见针对于某一种乳制品其原料乳到成品乳生产过程中,不同因素对纤溶酶活性带来的影响。因此,本研究测定从原料乳到 UHT 成品的生产过程中纤溶酶活性的变化,分析不同因素对纤溶酶活性的影响。

牛乳中纤溶酶活性的测定可以采用荧光法^[16]、传感器法^[17]以及酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等。其中,荧光法检测样本量小,检测速度慢,不适合大样本的测定;传感器法使用成

本较高,且数据处理复杂;与之相比 ELISA 更快速、灵敏、简便、载体易于标准化。因此,本研究选用 ELISA 法测定牛乳中纤溶酶活性的变化,并对结果进行分析,旨在对抑制 UHT 乳中纤溶酶活性,减小纤溶酶对 UHT 乳造成影响的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛纤溶酶 ELISA 检测试剂盒(江苏酶免实业有限公司); Synergy NEO2 HTS 酶标仪(美国 BIO-TEK 公司); LHS-70HC(70 L)恒温恒湿培养箱(上海捷呈实验仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样本采集

不同因素的样品来源见表 1。

1.2.2 纤溶酶活性测定

于板条上的标准品孔中加入标准品 50 μL ; 样本孔先加待测样本 10 μL , 再加稀释液 40 μL , 随后于每孔中均加入抗体 100 μL , 用封板膜封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min 后洗涤板条 5 次。每孔中均加入底物 A、B 各 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min 后, 每孔均加入终止液 50 μL , 15 min 内, 于 450 nm 波长处测定 OD 值。

1.3 数据处理

重复测定所有样品中纤溶酶含量 3 次, 测定结果表示为“平均值 \pm 标准偏差”。采用 IBM SPSS Statistics 27.1.1 单因素方差分析中 Duncan 多重比较法 ($P < 0.05$) 对理化指标进行差异显著性分析。采用 WPS Office Excel 绘制标准曲线并计算各样品中的纤溶酶浓度; 采用 Origin 2019 绘制纤溶酶变化折线图。

2 结果与分析

2.1 加工前原料乳内在因素对纤溶酶活性的影响

2.1.1 乳房炎程度

对不同程度乳房炎乳的纤溶酶活性进行了测定, 结果如图 1 所示, 轻度(56.832 U/mL)、中度(56.019 U/mL)、重度(60.654 U/mL)乳房炎乳的纤溶酶活性较健康生乳(46.102 U/mL)相比显著升高 ($P < 0.05$)。即乳房炎乳中的纤溶酶活性会相较健康生乳高, 这与 ANDREWS^[18] 的研究相符。

乳房炎乳中纤溶酶活性水平上升的原因是患乳房炎的奶牛血管通透性会增加, 可导致血液中的纤溶酶原更多的转移到牛乳中。由 KAARTINEN 等^[19] 的研究可知乳房炎乳中, 激活纤溶酶及纤溶酶系统所需要的尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, u-PA)相较于正常乳更少。此外, 炎症可诱导活化的免疫细胞分泌 u-PA, 促进 PG 向纤溶酶的转化, 使得纤溶酶活性增加^[20]。

奶牛乳房炎发病原因与病原微生物感染、环境因素、管理不当、奶牛自身因素等有关^[21-23]。在饲养过程中, 须对多重因素进行严格控制来抑制奶牛患乳房炎。为确保纤溶酶的稳定控制, 首先需要严格防止在牛乳采集过程中乳房炎乳与健康乳的混合。养殖场可采用乳汁体细胞计数(somatic cell count, SCC)^[24]、加州乳房炎试验(California mastitis test, CMT)^[25]、乳汁 pH 检查^[26]等方法, 以精准识别并控制患有乳房炎的奶牛, 并对其进行治疗。此外, 改善饲养环境条件, 规范挤奶操作, 定期为奶牛接种育苗等措施均能有效预防乳房炎的发生。

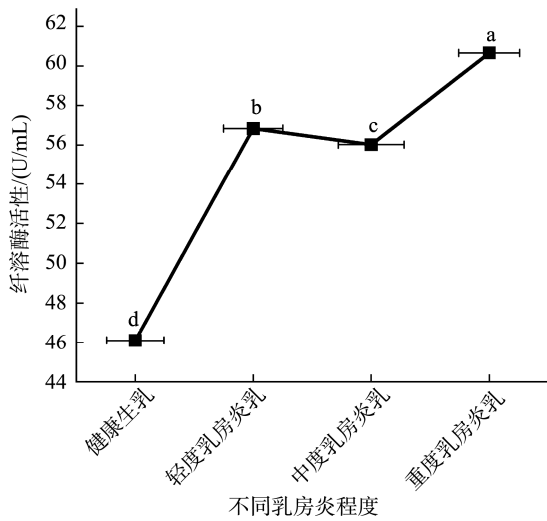
2.1.2 体细胞数

不同体细胞数的原料乳中的纤溶酶活性变化如图 2 所示, 随着体细胞数增高, 纤溶酶活性有所增加, 体细胞数和纤溶酶活性存在一定的正相关性, 这与吕加平等^[12] 的研究结果一致; 在体细胞数达到 15.5~23.2 万/mL 范围内, 纤溶酶活性的增加速率减缓。

表 1 不同因素的样品来源
Table 1 Sample sources for different factors

因素	样品来源	取样批次/时间	样本数	
牧场端	乳房炎程度	同一牧场不同乳房炎程度的奶牛	—	4
	体细胞数	同一牧场所得的不同体细胞数奶样	—	4
	疫苗(应激)	同一牧场不同奶牛接种育苗前后所得奶样	接种疫苗前后及稳定后(5 d)取样	9
	饲料调整	3 个不同牧场调整饲料前后所得牛乳	调整饲料前及调整饲料后取样	6
工艺端	离心除菌	3 个不同牧场牛乳经相同离心除菌操作后所得奶样	离心除菌前后取样	6
	巴氏杀菌预热	同一牧场牛乳经不同巴氏杀菌条件处理后所得奶样	—	14
	微滤除菌	同一牧场牛乳微滤处理后所得奶样	原料乳、巴氏杀菌乳、微滤后乳、成品乳分别取样	4
	UHT 预热	同一牧场牛乳经不同 UHT 预热条件处理后所得奶样	—	4

注: 收集后的样品于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏条件下运送到实验室检测纤溶酶活性。—表示采集的样品为同批次。



注: 折线图中小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$), 下同。

图 1 不同乳房炎程度牛乳中纤溶酶活性变化

Fig.1 Changes in milk plasmin activity with different degrees of mastitis

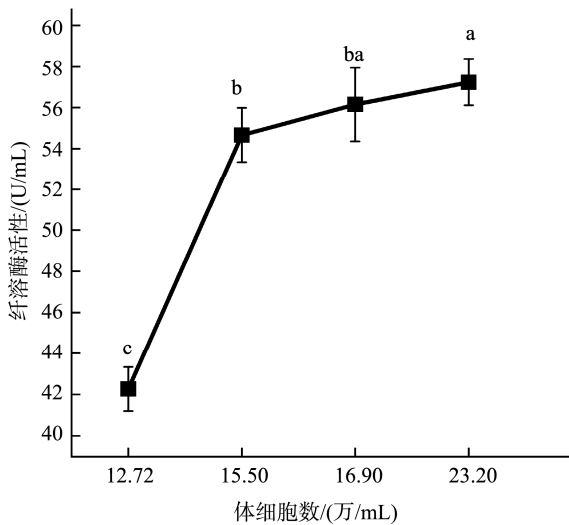


图 2 不同体细胞数牛乳中纤溶酶活性变化

Fig.2 Changes in milk plasmin activity with different numbers of somatic cells

健康奶牛的乳汁中的体细胞数不超过 3.0×10^5 个/mL, 其存在为正常的生理现象, 是乳腺组织进行新陈代谢的产物^[23]。纤溶酶活性与体细胞数呈正相关, 一方面是由于牛乳体细胞数增加会导致乳腺细胞通透性增大, 导致由血液流入乳中的纤溶酶量增加^[27], 另一方面是由于体细胞数的增加导致乳中纤溶酶原激活物增加, 加快纤溶酶原转化为纤溶酶的速度, 从而促进蛋白水解^[28]。此外, 进入牛乳的体细胞是纤溶酶、纤溶酶原的重要来源^[10], 牛乳储存过程中, 其中的体细胞会发生自溶现象。吕加平等^[12]通过超声波处理模拟 SCC 自溶状态, 发现原料乳中体细胞自溶可使乳中纤溶酶活性明显增加。

SCC 为监测奶牛乳房炎发病情况的可靠指标, 奶牛患有乳房炎会导致机体产生炎症反应, 导致乳和乳腺组织中的嗜中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞等的数量提升, 损伤组织脱落的上皮细胞也会增加, 导致乳汁中体细胞增多^[29], 牛乳中纤溶酶活性也相应的升高。当乳房感染乳房炎时, 体细胞数可超过 5.0×10^5 CFU/mL^[28], 因此需对乳汁中体细胞异常的奶牛进行重点控制, 防止异常体细胞乳混入健康乳。养殖场可采用流式细胞法(flow cytometry, FCM)、近红外光谱法(near-infrared spectrometry, NIR)、加州乳房炎试验^[27]等方法, 以精准识别体细胞数异常乳。

2.1.3 疫苗

牛口蹄疫是由口蹄疫病毒引起的传染性疾病, 其发病症状为急性高热, 口蹄部位出现溃疡, 食欲不振, 精神萎靡等, 还会导致牛行为发生改变, 出现跛行、蹒跚步态^[30]。为预防牛口蹄疫, 需要定时为其接种疫苗。本研究对同牧场的 3 只不同奶牛接种牛口蹄疫疫苗前后及稳定后所产奶中的纤溶酶活性水平进行测定, 结果如图 3, 样本 1 接种疫苗后纤溶酶活性持续降低, 样本 3 接种疫苗后纤溶酶活性持续增加, 纤溶酶样本 2 打疫苗前后纤溶酶活性呈现为先降低后增加, 由此可知, 接种疫苗对纤溶酶活性的影响无明显规律。

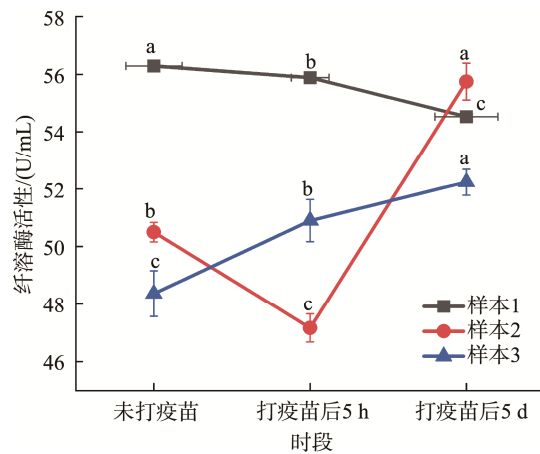


图 3 注射育苗前后牛乳中纤溶酶活性变化

Fig.3 Changes in milk plasmin activity before and after nursery injection

奶牛接种疫苗后若短时间内所产生乳中纤溶酶活性发生变化, 可能为急性应激导致。具体为牛接种疫苗后, 疫苗成分能使牛产生免疫反应, 免疫系统的激活会释放免疫调节物质, 过度激活会导致炎症, 组织损伤, 从而引发应激行为^[31]。应激行为使得泌乳奶牛机体产生不良反应, 包括乳腺局部内环境的相对稳定性遭到破坏, 奶牛无机离子代谢出现紊乱, 自由基代谢紊乱、自由基过剩而引起乳腺细胞氧化损伤^[32], 最终导致短期内其所生牛乳中纤溶酶活性发生变化, 该现象在样本 2 中最为明显。当牛的状态趋于稳定后, 其肌肉会逐渐松弛且应激行为逐渐消退, 同

时, 奶牛场在疫苗接种后, 普遍不会立即进行取奶作业。综合以上因素, 认为疫苗刺激对纤溶酶的影响较为有限。

2.1.4 饲喂

奶牛的饲料主要有粗饲料、精饲料、特殊饲料(维生素饲料、矿物质饲料、饲料添加剂)等^[32], 饲喂奶牛主要以干草、农作物秸秆等粗饲料为主^[33]。在奶牛的养殖过程中, 调整饲料配比有助于提高生产质量、为牛补充特定营养物质、解决牛热应激情况下摄食量降低导致的产奶量减少等问题^[34]。目前尚未有针对奶牛饲料调整是否诱发纤溶酶活性变化的研究。因此, 本研究对 3 个牧场饲料调整前后的样本进行了纤溶酶活性的测定。结果如图 4: A 牧场调整饲料后牛乳中纤溶酶活性仅降低 1.605 U/mL, B 牧场调整饲料后纤溶酶活性仅升高 1.076 U/mL, 这两个牧场中纤溶酶活性变化较小; C 牧场奶牛受饲料调整影响较大, 纤溶酶活性降低 11.734 U/mL。不同牧场间纤溶酶活性变化存在差异。

不同饲料中的营养成分、比例等都不同, 饲料配比更换后, 牛体需一定时间来适应新的营养成分和比例, 该过程中牛可能会出现应激反应。此外对饲料进行过多调整可能直接为牛带来负面影响, 如高浓缩饲料可加剧牛热应激引起的酸中毒现象^[35]。C 牧场牛乳纤溶酶活性大幅降低可能与以上现象有关, 尽管该样本中纤溶酶活性下降对 UHT 乳而言为正向影响, 但该现象可能会损害牛的健康, 需预防该现象的发生。因此, 在更换饲料时, 需科学的调整饲料配方, 并逐步进行换料, 实时关注牛的适应情况。

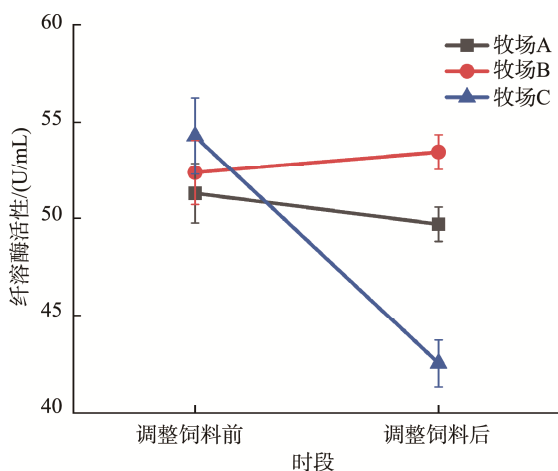


图 4 饲料调整前后的牛乳中纤溶酶活性变化
Fig.4 Changes in milk plasmin activity before and after feed adjustment

2.2 UHT 乳加工工艺对对纤溶酶活性的影响

图 5 为 UHT 乳生产的工艺流程。本研究对其中的离心, 巴氏杀菌预热, 微滤, 降膜及 UHT 预热工艺对纤溶酶活性的影响进行研究。

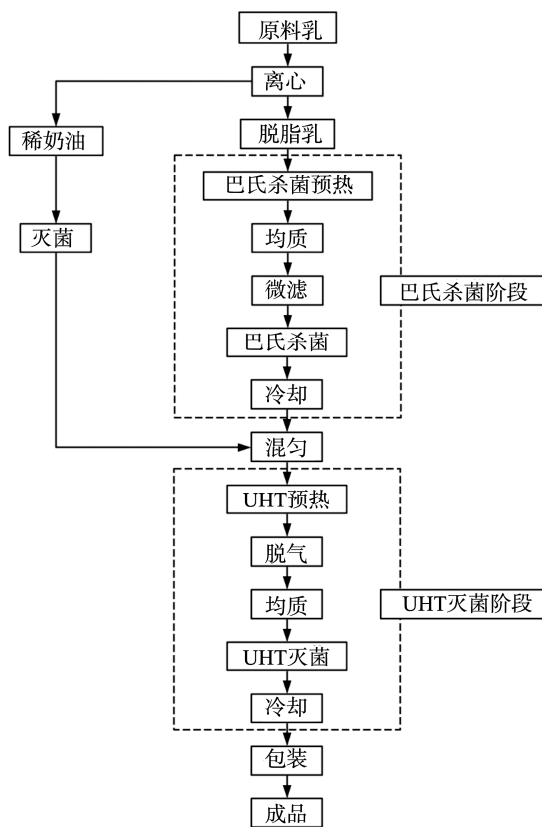


图 5 UHT 乳生产工艺流程图
Fig.5 UHT milk production process flow chart

2.2.1 离心

对不同牧场牛乳离心除菌前后其纤溶酶活性进行测定, 结果如图 6 所示, 牧场 1 样本离心除菌前 59.421 U/mL, 离心除菌后 59.832 U/mL; 牧场 2 样本离心除菌前 54.666 U/mL, 离心除菌后 56.019 U/mL; 牧场 3 样本离心除菌前 63.378 U/mL, 离心除菌后 65.351 U/mL。离心除菌对 PL 活性变化无显著影响。

离心除菌是基于颗粒和分散相之间密度的差异来除去乳中体细胞和细菌的一种灭菌方式^[36]。由任璐等^[37]的研究可知, 离心除菌可有效降低原料乳中细菌总数, 且该方法去除芽孢效果非常显著。纤溶酶分子质量为 28 kDa~83 kDa, 纤溶酶原分子质量为 88 kDa^[38], 二者较低的分子量使得离心灭菌对其含量影响不大。

离心除菌后纤溶酶活性变化较小并不能说明离心除菌对纤溶酶活性没有抑制作用。孙玥等^[36]研究了普通 UHT 乳和离心除菌 UHT 乳在 6 个月贮藏期内纤溶酶活性变化, 结果表明热处理后获得的成品乳纤溶酶活性相差不大, 离心除菌 UHT 乳纤溶酶活性略微低于普通 UHT 乳。随着贮存时间延长, 两种牛乳中纤溶酶活性均逐渐上升, 离心除菌 UHT 乳中纤溶酶活性上升速率显著低于普通 UHT 乳, 这是由于牛乳体细胞中含有 PA, 可增强非活性 PG 向纤溶酶的转化, 因此高体细胞乳中 PG 向纤溶酶的

转化率较高^[39]。牛乳经离心除菌后,其中的大部分体细胞被除去,这使得离心除菌 UHT 乳在储存期间纤溶酶活性上升较慢,可以较好的维持 UHT 乳的品质。实际生产中在使用离心除菌的前提下,若想直接降低纤溶酶含量,可结合其他工艺来实现。

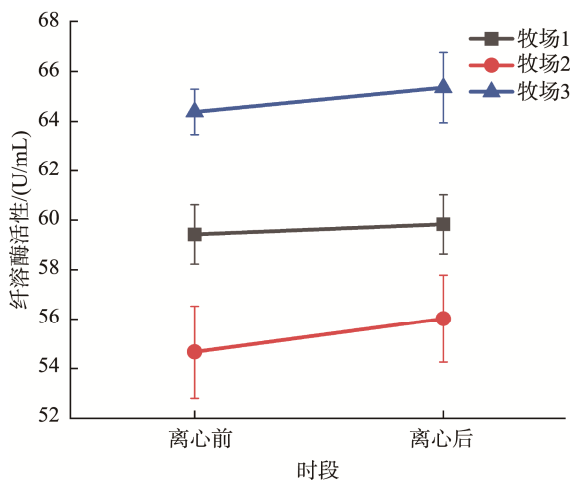


图 6 离心前后的牛乳中纤溶酶活性变化

Fig.6 Changes in milk plasmin activity before and after centrifugation

2.2.2 巴氏杀菌预热

在对乳进行巴氏灭菌处理前需先对牛乳进行预热处理,该处理可优化灭菌效果,同时使酶类物质的三级结构打开,使其更易被灭活^[40]。本研究测定不同巴杀预热条件(40、45、50、55、60、65、70 °C温度下,分别对乳进行 3 s、5 s 处理)处理牛乳后,其中纤溶酶活性变化,以探究最佳预热条件。图 7 结果表明,预热时间 3 s, 55 °C 预热处理的牛乳表现出最低的酶活性,其次为 55 °C 处理 5 s,二者酶活性仅相差 1.216 U/mL,即 55 °C 预热条件灭活纤溶酶活性最佳。

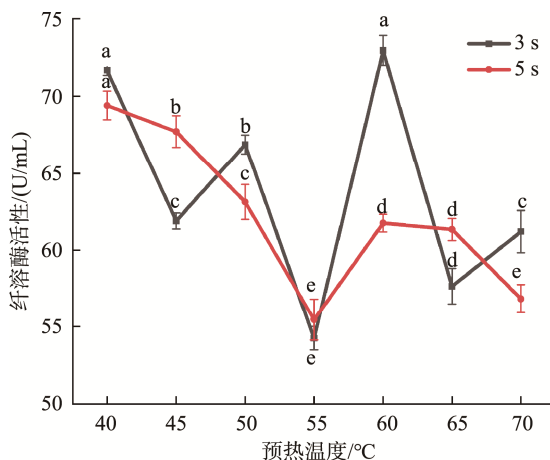


图 7 不同巴氏杀菌预热温度的牛乳纤溶酶活性变化

Fig.7 Changes in milk plasmin activity at different pasteurisation preheating temperatures

对乳进行 3 s 热处理得到的酶活性曲线波动较大,该现象原因为牛乳是一个较为复杂的体系,包括纤溶酶系统组分、酪蛋白和乳清蛋白等多种成分,其中每种成分对温度的敏感程度不同,最终导致温度上升与纤溶酶失活的关系非线性^[41]。 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -LG)是乳清蛋白之一,在 50 °C 以上变性, β -LG 包含二硫键和游离巯基,在高于 55 °C 的温度下观察到其到硫醇反应性增加,从而可产生更多的二硫键,变性的 β -LG 通过与 PG 的二硫键相互作用,从而降低其活性^[42],进而导致由 PG 衍生的纤溶酶减少,即 55 °C 预热条件下牛乳整体的纤溶酶活性降低最为明显。

2.2.3 微滤

本研究取奶仓样品、巴氏杀菌预热后样品、微滤样品及成品样品,测定其纤溶酶活性来探究微滤操作对纤溶酶活性的影响。其测定结果分别为 58.875、62.304、55.883 及 69.130 U/mL(图 8)。

纤溶酶系统组分的耐热性及其他抗性有所不同,不同的加热条件会改变不同组分之间的比例,最终成品乳所表现出的纤溶酶活性会有所不同。牛乳经预热处理后,纤溶酶活性升高了 6%。由 PRADO 等^[43]的研究可知巴氏杀菌条件下,PI 耐热性优于 PAI,两者的失活率分别为 35.8%和 81.1%。巴氏杀菌热处理或直接 UHT 前的预处理可灭活牛乳中的 PAI 和 PI,减少对 PG 激活的抑制和纤溶酶的抑制作用,使得牛乳纤溶酶活性上升^[44-45]。本研究中巴杀预热后的纤溶酶活性与原料乳相比升高,这与前人的研究结果相符,即巴氏杀菌及一定程度热处理会使得牛乳的纤溶酶活性增加。

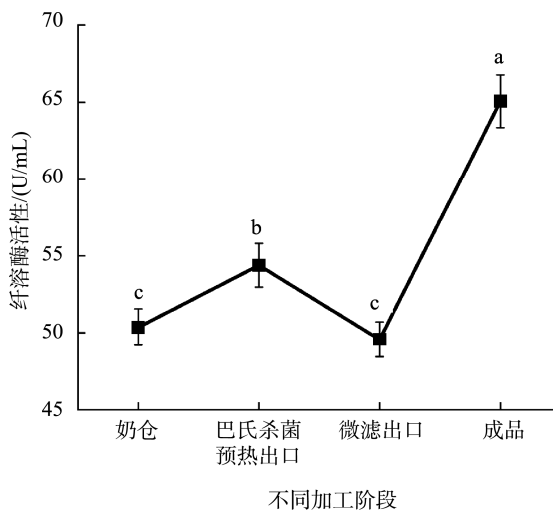


图 8 微滤 UHT 乳生产过程中纤溶酶活性的变化

Fig.8 Changes in milk plasmin activity during microfiltered UHT milk production

经过微滤处理后,样品纤溶酶活性降低了 10%,说明微滤能一定程度上降低纤溶酶活性。有研究表明:热处理

后 PG 的激活常发生于货架期内, 纤溶酶活力需要 3 d 至数周时间达到最大^[46-47]。也有研究报道, UHT 牛乳在货架期(10~120 d)内纤溶酶活性伴随着 α s1-CN 含量的下降而增加^[48]。后续过程中纤溶酶活性不断增高, 成品纤溶酶值较初始样品高 10.225 U/mL, 较微滤后样品高 13.247 U/mL, 该现象可能为成品乳贮藏期间上述原因导致。综上所述, 微滤操作可一定程度降低纤溶酶活性, 但在后续样品储藏过程中, 纤溶酶活性依旧会持续上升, 因此对成品乳中纤溶酶活性的变化及控制可继续深入研究。

2.2.4 UHT 预热

在对乳进行 UHT 灭菌处理前需先对牛乳进行预热处理。本研究测定了乳经巴氏杀菌后以及巴氏杀菌乳经不同 UHT 预热条件处理后的纤溶酶活性, 以探究预热条件对纤溶酶活性的具体影响。结果如图 9 所示, 随着温度的逐步上升, 纤溶酶活性的总体变化趋势呈先上升、后下降、再上升的趋势。经 90 °C 5 s 预热处理的牛乳纤溶酶活性最低, 为 64.795 U/mL, 其数值仅较巴氏杀菌后样品高 0.971 U/mL, 上升幅度为 1.52%。

纤溶酶系统中各组分的热稳定性不同, 因此随着加热温度的升高, 纤溶酶活性会出现如图 9 所示的波动。其中纤溶酶和 PG 可以完全在巴氏杀菌条件下存活(72 °C 为 15 s)^[49], 并且对某些高温、短时间和 UHT 热处理具有一定抗性, 而 PAI 在巴氏杀菌后几乎完全灭活(75 °C 为 15 s), PI 失去其三分之一的活性^[1]。由此可知, 经巴杀处理所得的牛乳中主要纤溶酶组分为纤溶酶及 PG, 牛乳在 80~85 °C 5 s 时纤溶酶处理过程中, PG 可向纤溶酶发生转化导致纤溶酶活性上升。经 90 °C 5 s 预热处理无法降低纤溶酶活性, 但该温度对纤溶酶及 PG 的抑制效果较其他处理条件好, 因此实际生产中可以采用 90 °C 5 s 预热处理。

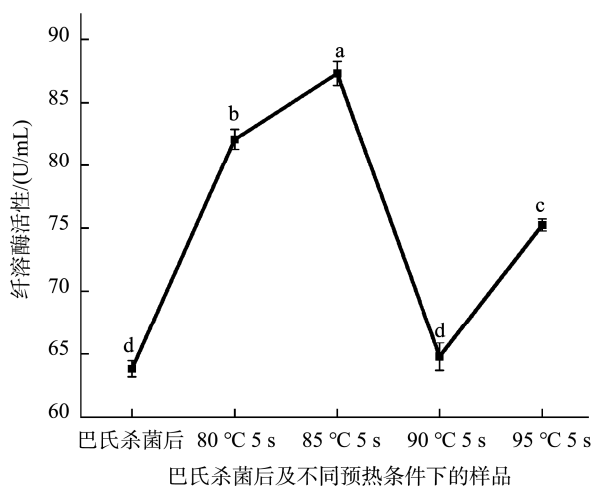


图 9 不同 UHT 预热温度的牛乳纤溶酶活性变化
Fig.9 Changes in milk plasmin activity at different UHT preheating temperatures

3 结 论

结果表明, 在原料乳阶段, 牛乳中纤溶酶活性高低与牛乳房炎的严重程度及乳中体细胞数呈现显著正相关, 而牛是否接种疫苗, 或者饲料种类是否改变, 与纤溶酶活性变化无显著关联。在 UHT 乳生产加工过程中, 离心除菌使得牛乳中纤溶酶活性略有上升; 巴氏杀菌预热阶段, 55 °C 处理能最有效地抑制牛乳抑制酶活性上升; 预热结合微滤处理能显著降低纤溶酶活性约 10%; 采用不同条件对牛乳进行 UHT 预热处理均会导致酶活性上升, 其中 90 °C 处理 5 s 的条件下, 酶活性上升幅度较小, 仅为 1.52%。本研究测定的所有加工操作均无法完全灭活牛乳中的纤溶酶活性, 且成品 UHT 乳在储存过程中纤溶酶活性仍有可能上升, 因此需研究灭活纤溶酶酶活性效果更好, 且能抑制纤溶酶后续上升的工艺, 以确保 UHT 乳在货架期内不发生品质变化。

参考文献

- [1] TRAN H, DATTA N, LEWIS MJ, *et al.* Predictions of some product parameters based on the processing conditions of ultra-high-temperature milk plants [J]. *International Dairy Journal*, 2008, 18(9): 939-944.
- [2] FOX PF, KELLY AL. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1 [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(6): 500-516.
- [3] ALBENZIO M, SANTILLO A, CAROPRESE M, *et al.* Composition, indigenous proteolytic enzymes and coagulating behaviour of ewe milk as affected by somatic cell count [J]. *Journal of Dairy Research*, 2011, 78(4): 442-447.
- [4] GAUTAM PB, SHARMA R, ATBHAIYA Y, *et al.* Thermosonication: A technique to inactivate the plasmin system in milk [J]. *International Dairy Journal*, 2024, 1: 105997.
- [5] 张书文, 刘鹭, 孙洁, 等. 影响原料乳品质的纤溶酶活性的因素分析[J]. *农业工程学报*, 2014, 30(13): 286-292.
ZHANG SW, LIU L, SUN J, *et al.* Analysis of factors affecting fibrinolysis activity in raw milk [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2014, 30(13): 286-292.
- [6] CAESSENS PWJR, DAAMEN WF, GRUPPEN H, *et al.* β -lactoglobulin hydrolysis. 2. peptide identification, SH/SS exchange, and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(8): 2980-2990.
- [7] 程方键, 陈晓民, 盛玉娟, 等. 超高温灭菌乳货架期影响因素及预测模型研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(17): 282-291.
CHENG FJ, CHEN XM, SHENG YJ, *et al.* Progress of research on influencing factors and prediction models of ultra-high temperature treated milk shelf life [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(17): 282-291.
- [8] 杨晋辉, 钱文涛, 李洪亮, 等. 牛乳纤溶酶及其活性影响因素研究进展[J].

- 食品科学, 2023, 44(13): 235–243.
- YANG JH, QIAN WT, LI HL, *et al.* Recent advances in milk plasmin and factors affecting its activity [J]. Food Science, 2023, 44(13): 235–243.
- [9] YUN SY, IMM JY. Changes in particle size, sedimentation, and protein microstructure of ultra-high-temperature skim milk considering plasmin concentration and storage temperature [J]. Molecules, 2021, 26(8): 2339.
- [10] 谭伟, 贺保平, 樊启程, 等. 纯牛奶纤溶酶和纤溶酶原的来源及其对产品的影响[J]. 中国食品, 2023(22): 100–102.
- TAN W, HE BP, FAN QC, *et al.* Sources of pure milk plasminogen and plasminogen and their effects on products [J]. China Food, 2023(22): 100–102.
- [11] ISMAIL B, NIELSEN SS. Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry [J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(11): 4999–5009.
- [12] 吕加平, 张书义, 王辉, 等. 原料乳体细胞数与纤溶酶活性的相关性研究[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(3): 4–6.
- LU JP, ZHANG SY, WANG H, *et al.* Relativity of SCC and plasmin activity in raw milk [J]. China Dairy Industry, 2010, 38(3): 4–6.
- [13] 孙琦, 刘鹭, 蒋士龙, 等. 不同热处理工艺对牛乳中热敏感成分的影响[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(11): 47–53.
- SUN Q, LIU L, JIANG SL, *et al.* Effects of heat treatment processing on the heat-sensitive components in milk [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(11): 47–53.
- [14] ZHANG T, LIU Y, CAO J, *et al.* Exploration of novel plasmin inhibitor from β -lactoglobulin for enhancing the storage stability of uht milk [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(30): 17041–17050.
- [15] NAIK L, LATA K, SHARMA R. Effect of high-pressure processing on milk enzymes [M]. Enzymes Beyond Traditional Applications in Dairy Science and Technology. Academic Press, 2023, 1: 57–75.
- [16] CABALLERO-VILLALOBOS J, GARZÓN AI, MARÍN ALM, *et al.* Plasmin activity in Manchega ewe milk: The effect of lactation, parity and health of the udder, and its influence on milk composition and rennet coagulation [J]. Small Ruminant Research, 2018, 158: 57–61.
- [17] DACRES H, WANG J, ANDERSON A, *et al.* A rapid and sensitive biosensor for measuring plasmin activity in milk [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2019, 301: 127141.
- [18] ANDREWS AT. Breakdown of caseins by proteinases in bovine milks with high somatic cell counts arising from mastitis or infusion with bacterial endotoxin [J]. Journal of Dairy Research, 1983, 50(1): 57–66.
- [19] KAARTINEN L, SANDHOLM M. Regulation of plasmin activation in mastitic milk: Correlation with inflammatory markers and growth of streptococcus agalactiae [J]. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 1987, 34(1–10): 42–50.
- [20] LARSEN LB, KELLY AL. Agents of change, enzymes in milk and dairy products [M]. Switzerland: Springer, 2021.
- [21] 童津津, 张华, 熊本海, 等. 奶牛乳腺内微生物区系与乳房健康的关系研究进展[J]. 动物营养学报, 2021, 33(2): 651–657.
- TONG JJ, ZHANG H, XIONG BH, *et al.* Research advance of relationship of udder microbiota and udder healthy of dairy cows [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(2): 651–657.
- [22] DŽERMEIKAITĖ K, BAČĖNINAITĖ D, ANTANAITIS R. Innovations in cattle farming: Application of innovative technologies and sensors in the diagnosis of diseases [J]. Animals, 2023, 13(5): 780.
- [23] 弓瑞娟, 张鹏, 魏琳琳, 等. 影响牛奶中体细胞数的因素及控制措施[J]. 中国动物保健, 2023, 25(10): 83–84.
- GONG RJ, ZHANG P, WEI LL, *et al.* Factors affecting somatic cell count in milk and control measures [J]. China Animal Health, 2023, 25(10): 83–84.
- [24] 詹经纬, 童津津, 熊本海, 等. 奶牛乳腺健康与乳中体细胞数之间关系的研究进展[J]. 动物营养学报, 2021, 33(3): 1299–1305.
- ZHAN JW, TONG JJ, XIONG BH, *et al.* Research progress on relationship of mammary gland health and milk somatic cell count of dairy cows [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(3): 1299–1305.
- [25] 李海强, 杨大盛, 卢琦, 等. 2 种奶牛隐性乳房炎检测方法比较[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(8): 2677–2683.
- LI HQ, YANG DS, LU Q, *et al.* Comparison of two methods for detecting recessive mastitis in cows [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(8): 2677–2683.
- [26] ALI A, MIR MUR, GANIE SA, *et al.* Milk-compositional study of metabolites and pathogens in the milk of bovine animals affected with subclinical mastitis [J]. Molecules, 2022, 27(23): 8631.
- [27] 王益, 吕加平, 张柏林. 体细胞数对乳制品加工品质的影响及其快速检测方法[J]. 食品与发酵工业, 2006(12): 114–118.
- WANG Y, LV JP, ZHANG BL. The effect of SCC on dairy products and its rapid detection [J]. Food and Fermentation Industries, 2006(12): 114–118.
- [28] 李志国, 边燕飞, 闫清泉, 等. 原料乳体细胞数对乳酪品质影响的研究进展[J]. 食品科技, 2021, 46(12): 82–87.
- LI ZG, BIAN YF, YAN QQ, *et al.* Research progress on the effect of somatic cell number of raw milk on cheese quality [J]. Food Science and Technology, 2021, 46(12): 82–87.
- [29] EYASSU S, DOKIN EF, ELNA M, *et al.* Potential of lact operoxidase to diagnose subclinical mastitis in goats [J]. Small Ruminant Research, 2007, 69(1/2/3): 154–158.
- [30] 刘俊. 牛口蹄疫的病理机制与防治[J]. 北方牧业, 2024(10): 42.
- LIU J. Pathological mechanism and control of foot-and-mouth disease in cattle [J]. Northern Pastoral Industry, 2024(10): 42.
- [31] 张长梅. 牛羊口蹄疫疫苗应激反应及预防措施[J]. 吉林畜牧兽医, 2023, 44(12): 151–152.
- ZHANG CM. Stress reaction and preventive measures of foot-and-mouth disease vaccine in cattle and sheep [J]. Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2023, 44(12): 151–152.
- [32] 徐中相, 王福增. 奶牛常用饲料分类及其营养价值[J]. 中国动物保健, 2022, 24(2): 88–89.

- XV ZF, WANG FZ. Classification and nutritional value of commonly used feeds for dairy cows [J]. *China Animal Health*, 2022, 24(2): 88–89.
- [33] 于福秋. 奶牛常用饲料的种类及合理饲喂方法[J]. *现代畜牧科技*, 2022(2): 58–59.
- YV FQ. Types of feeds used for dairy cows and proper feeding methods [J]. *Modern Animal Husbandry Science & Technology*, 2022(2): 58–59.
- [34] CORREA-CALDERÓN A, AVENDAÑO-REYES L, LÓPEZ-BACA M, *et al.* Heat stress in dairy cattle with emphasis on milk production and feed and water intake habits. Review [J]. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 2022, 13(2): 488–509.
- [35] MIN L, LI D, TONG X, *et al.* Nutritional strategies for alleviating the detrimental effects of heat stress in dairy cows: A review [J]. *International Journal of Biometeorology*, 2019, 63: 1283–1302.
- [36] 孙玥, 吴华星, 段雪梅, 等. 原料乳离心除菌对 UHT 乳品质的改善作用[J]. *中国乳品工业*, 2021, 49(4): 13–18.
- SUN Y, WU HX, DUAN XM, *et al.* Improvement of UHT milk quality by bact of uigation of raw milk [J]. *China Dairy Industry*, 2021, 49(4): 13–18.
- [37] 任璐, 于鹏, 刘振民, 等. 离心除菌技术在巴氏杀菌乳生产中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(1): 46–50.
- REN L, YU P, LIU ZM, *et al.* Application of high-speed centrifuge technology in pasteurized milk processing [J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(1): 46–50.
- [38] FRANCE TC, KELLY AL, CROWLEY SV, *et al.* Influence of processing temperature on plasmin activity and proteolysis in process streams from cold microfiltration of skim milk [J]. *International Dairy Journal*, 2023, 140: 105590.
- [39] ANEMA SG. Age gelation, sedimentation, and creaming in UHT milk: A review [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(1): 140–166.
- [40] STOECKEL M, LIDOLT M, STRESSLER T, *et al.* Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products [J]. *International Dairy Journal*, 2016, 61: 250–261.
- [41] BURBRINK CN, HAYES KD. Effect of thermal treatment on the activation of bovine plasminogen [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(6): 580–585.
- [42] SOMBERS SE. Effects of whey proteins and heat treatment on the location and activity of plasmin system components [D]. West Lafayette: Purdue University, 2005.
- [43] PRADO B, SOMBERS S, ISMAIL B, *et al.* Effect of heat treatment on the activity of inhibitors of plasmin and plasminogen activators in milk [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(6): 593–599.
- [44] TOECKEL M, LIDOLT M, STRESSLER T, *et al.* Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products [J]. *International Dairy Journal*, 2016, 61: 250–261.
- [45] NEWSTEAD DF, PATERSON G, ANEMA SG, *et al.* Plasmin activity in direct-steam-injection UHT-processed reconstituted milk: Effects of preheat treatment [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(6): 573–579.
- [46] KOUICHI N, MISA W, YUKIO S, *et al.* Purification and characterization of liver catalase in acatalasemic beagle dog: Comparison with normal dog liver catalase [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2000, 32(1): 89–98.
- [47] 沈国强, 张栋, 杨春霞. 牛肝过氧化氢酶提取工艺的研究[J]. *化学与生物工程*, 2008(1): 37–39.
- SHEN GQ, ZHANG D, YANG CX. Study on extraction of catalase from cattle liver [J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2008(1): 37–39.
- [48] 李威, 索艳丽. 过氧化氢酶对断奶仔猪健康评价的影响[J]. *饲料工业*, 2015, 36(14): 51–53.
- LI W, SUO YL. Effect of catalase on health evaluation of weaned piglets [J]. *Feed Industry*, 2015, 36(14): 51–53.
- [49] DULLEY JR. Bovine milk protease [J]. *Journal of Dairy Research*, 1972, 39(1): 1–9.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)