DOI:10.12441/spyswjs.20240626001 [文章编号] 1673-1689(2025)09-0012-11

假单胞菌属蛋白酶对乳凝胶化的影响机制及调控策略研究进展

刘圣佳[1,2,3] 贺凯茹[1,2,3] 李 慧[4] 李永强[5] 李欣怡[6] 乌日娜[1,2,3] 武俊瑞[1,2,3] 赵三军[4*]

(1. 沈阳农业大学食品学院,辽宁 沈阳 110866; 2. 辽宁省食品发酵技术工程研究中心,辽宁 沈阳 110866; 3. 沈阳市微生物发酵技术创新重点实验室,辽宁 沈阳 110866; 4. 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司,内蒙古 呼和浩特 010010; 5. 蒙牛乳业(乌兰浩特)有限责任公司,内蒙古 乌兰浩特 137400; 6. 蒙牛乳业(齐齐哈尔)有限公司,黑龙江 齐齐哈尔 161000)

摘要:乳凝胶化是长期困扰乳制品行业的难题,其主要诱因是耐热蛋白酶污染。尽管在乳制品加工过程中通常会进行高温杀菌处理,但假单胞菌属分泌的耐热蛋白酶仍能在极端条件下存活。该酶会分解牛奶中蛋白质的肽键,不仅导致牛奶产生苦味,还会引发凝胶化现象,严重影响乳制品的品质与货架期。乳凝胶化机理较为复杂,且针对该领域的研究仍相对匮乏。因此,作者系统概述了假单胞菌属蛋白酶的特性、酶活性检测方法及影响因素,分析了乳凝胶化的形成机制,总结了生产工艺中的控制措施与新型调控策略,旨在为快速识别耐热蛋白酶、抑制其残留引发的乳凝胶化现象提供参考。

关键词:假单胞菌属;耐热蛋白酶;乳制品;凝胶化;检测方法;控制措施

Advances in the Mechanisms of the Effects of *Pseudomonas* spp. Proteases on Gelatinization of Dairy Products and Regulation Strategies

LIU Shengjia[1,2,3] *HE Kairu*[1,2,3] *LI Hui*[4] *LI Yongqiang*[5] *LI Xinyi*[6]
WU Rina[1,2,3] *WU Junrui*[1,2,3] *ZHAO Sanjun*[4*]

(1. Food Science College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Liaoning Food Fermentation Technology Engineering Research Center, Shenyang 110866, China; 3. Shenyang Key Laboratory of Microbial Fermentation Technology Innovation, Shenyang 110866, China; 4. Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Joint-stock Limited Liability Company, Hohhot 010010, China; 5. Mengniu Dairy (Ulanhot) Limited Liability Company, Ulanhot 137400, China; 6. Mengniu Dairy (Qiqihar) Limited Company, Qiqihar 161000, China)

Abstract: Gelatinization of dairy products has long been a common problem caused by heat-resistant protease contamination. Despite the high-temperature sterilization process, heat-resistant proteases secreted by *Pseudomonas* spp. can survive under extreme conditions. These enzymes can break down the peptide bonds of proteins in milk, resulting in the bitter taste and gelatinization of milk, which seriously affects the quality and shelf-life of dairy products. In view of the complex gelatinization mechanisms of dairy products and the lack of in-depth investigation, the author systematically outlined the characteristics, enzyme activity detection methods, and influencing factors of *Pseudomonas* spp. proteases, delved into the mechanisms underpinning the protease-induced gelatinization of dairy products, and summarized the control measures and novel regulatory

基金项目:国家自然科学基金面上项目(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)。

通信作者:赵三军(1983—),男,学士,工程师,主要从事质量安全追溯及乳制品加工研究。E-mail: zhaosanjun@mengniu.cn

收稿日期:2024-06-26 **修回日期:**2024-08-02

strategies in the production process. The review is expected to provide a reference for the rapid identification of heat-resistant proteases and the inhibition of gelatinization of dairy products due to protease residues.

Keywords: *Pseudomonas* spp.; heat-resistant protease; dairy product; gelatinization; detection method; control measure

乳制品在贮存过程中会发生物理与化学变化，其中凝胶化是最为严重的问题之一，具体表现为黏度增加、流动性减小、稳定性降低及脂肪分离。乳凝胶化的机理较为复杂，影响因素主要包括微生物分泌的耐热蛋白酶、热处理程度、乳固形物含量、乳成分、加工工艺和贮藏温度等。其中，嗜冷假单胞菌因产耐热蛋白酶的能力较强，成为导致液态乳品质下降的主要因素之一。

假单胞菌在原料乳收集及乳制品加工环境中广泛存在[1]，占相关环境微生物群落的70%~90%[2]。Dai等[3]从4 ℃贮存1周的原料乳中分离出的嗜冷假单胞菌占该样品微生物群的70%~90%。尽管在初始生牛乳的微生物群落中，嗜冷假单胞菌占比不足10%，但当生牛乳或巴氏杀菌乳变质时，它们会成为微生物群落中的优势菌群[4]。然而，无论是巴氏杀菌还是超高温灭菌（ultrahigh temperature sterilization，UHT）处理，均无法使假单胞菌属产生的耐热胞外酶完全失活。这些仍保持酶活性的耐热酶会对运输、贮藏及货架期内的乳制品品质造成严重影响，不仅导致其营养成分流失，还会降低消费者的接受度。基于此，作者概述了嗜冷假单胞菌属蛋白酶在乳制品变质过程中的变化规律，旨在为乳凝胶化问题的深入研究及防控策略的制定和应用提供参考。

1 假单胞菌属及其蛋白酶概述

1.1 假单胞菌属常见种类及在乳制品中的污染现状

假单胞菌属是乳制品中广泛存在的微生物，能在低温环境下生长繁殖。研究发现，在牧场环境中，假单胞菌属是分布最广的污染菌株，约占总分离菌株的57%[5]；在28 ℃条件下，有61.38%的假单胞菌株具备产蛋白酶的能力。Du等[6]从中国16个原料乳样品中共分离出480株嗜冷菌，其中假单胞菌占比达58.8%。Mejares等[7]研究表明，生牛乳贮存72 h后，假单胞菌属与不动杆菌属成为优势菌属，两者的总相对丰度超过60%。Stoeckel等[8]从原料乳中鉴定出2 906种营养嗜冷菌株，其中假单胞菌、乳球菌和不动杆菌占比超过总数的62%。导致乳制品品质劣变的假单胞菌主要有荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、脆弱假单胞菌，其中荧光假单胞菌是限制UHTS乳保质期的关键菌株[9]。此外，原料乳中还检测出格氏假单胞菌、解朊假单胞菌、布氏假单胞菌、霍氏假单胞菌和裴氏假单胞菌等菌株。

1.2 假单胞菌属蛋白酶及其特性

目前，在假单胞菌属分泌的胞外蛋白酶中，AprX的研究最为广泛[10]，该酶能抵抗UHTS处理，被认为是导致牛奶腐败的关键蛋白酶[11-14]。假单胞菌中约80%的菌株携带*AprX*基因[15-16]，该基因可表达AprX，即使在135 ℃条件下处理1 min，其酶活性残留率仍在20%以上[17]。AprX已被证实是一种与食品腐烂相关的蛋白酶[18]，降低其酶活性对提高UHTS乳在保质期内的稳定性具有重要意义。此外，来自纤溶酶系统的内源性蛋白酶也会导致乳制品蛋白质降解，但其破坏乳制品稳定性的机制与AprX截然不同。

假单胞菌属分泌的蛋白酶具有较高的稳定性和良好的催化性能[19-20]，主要体现在2个方面。一方面，假单胞菌属分泌的蛋白酶具有耐高温特性。王一恬[21]对荧光假单胞菌分泌的5种胞外蛋白酶进行研究，发现经商业巴氏杀菌（72 ℃、15 s）处理后，胞外蛋白酶仍保留约47%的酶活性；经UHTS处理后，仍保留约18%的酶活性。祁岩[22]研究发现，在75 ℃或85 ℃条件下加热180 min，无法使荧光假单胞菌蛋白酶完全失活。荧光假单胞菌产生的蛋白酶经121 ℃处理15 s后，酶活性残留率达58%~73%；经135 ℃处理5 s后，酶活性残留率仍达20%~40%[23]。莓实假单胞菌产生的蛋白酶经巴氏杀菌处理后表现出类似的热稳定性；经121 ℃油浴15 s后，酶活性仍为初始值的50%~55%[24]。不同种类假单胞菌产生的蛋白酶的热稳定性受氨基酸组成、二硫键含量及金属离

子结合能力等多种因素影响。另有研究发现，AprX在pH 8.5、45 ℃条件下酶活性最佳[25]。另外，与高温环境相比，多数嗜冷菌产生的胞外蛋白酶对40~70 ℃的热处理更为敏感，这种现象被称为“低温失活”。因此，在乳制品生产过程中，控制嗜冷菌蛋白酶的酶活性尤为重要[26]。蛋白酶稳定性与pH密切相关，牛乳正常pH为6.5~6.7，其pH变化与蛋白质和乳脂肪的水解有关。蛋白质和乳脂肪水解产生的酸性氨基酸和脂肪酸会导致pH下降，而pH下降又会进一步影响乳的稳态结构，使更多蛋白质结合位点暴露出来。当pH低于6.3时，牛乳会出现不可逆的絮凝沉淀，这也是牛乳体系失稳的开始[27]。

1.3 蛋白酶活性检测方法

乳制品中蛋白酶活性的检测方法较多，但由于干扰因素众多，这些方法在特异性与灵敏度方面表现不佳，见表1。因此，迫切需要一种特异性强、灵敏度高的新型快速检测方法。

表1 蛋白酶活性检测方法

Table 1 Protease enzyme activity detection methods

检测方法	原理	适用范围	优点	缺点
福林酚试剂法	福林酚试剂在碱性条件下被酪氨酸中的酚基还原，生成相兰与钨兰，用比色法测定	牛奶中蛋白酶活性的测定	属于国标法，准确度高，灵敏度高，操作较简便，检测限较低	耗时长，专一性较差
邻苯二甲醛衍生比色法	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下测定吸光度，测定游离氨基酸态氮含量	不同样品间蛋白酶活性的精确比较	精确度高，重现性好，反应时间短	由高温引起的SDS溶解问题对测定结果影响较大
人工底物偶氮酪蛋白法	人工底物偶氮酪蛋白在酶的作用下释放发色团，通过分光光度法对嗜冷菌蛋白酶活性进行测定	UHTS乳中嗜冷菌蛋白酶活性测定	灵敏度高，适用范围广	非天然底物，成本较高
甲醛法	甲醛固定氨基的碱性，使氨基酸的羧基显示出酸性，通过氢氧化钠标准溶液滴定进行定量，以酸度计测定滴定终点	粗略性和比较性测定	操作简单	准确性、精确度较低，重现性差
电化学法	酶催化反应过程中产生的电位变化	牛奶及其制品的蛋白酶活性测定	检测时间短	费时费力，成本高，电极不耐用，需要复杂的肽标记
竞争性酶联免疫吸附测定法	将酶标记的抗原与样品中的蛋白酶以及固相载体上吸附的抗体进行竞争性结合	乳制品中不同浓度蛋白酶活性测定	抗原与抗体特异性结合，能准确测定蛋白酶活性	孵育时间长，此过程会耗尽内源性κ-酪蛋白
异硫氰酸荧光素-酪蛋白酶法	使用可溶性异硫氰酸荧光素标记的酪蛋白，反应生成荧光素硫代氨基甲酰衍生物	生牛奶中痕量水平的细菌蛋白酶活性测定	操作简单，成本低，能灵敏测定细菌蛋白酶活性	前处理与测定耗时长
牛津杯法	分解特定底物形成透明水解圈，通过水解圈大小来判断蛋白酶活性	粗略性和比较性测定	价格便宜，操作简单	培养时间长
生物发光共振能量转移生物传感器	结合来自κ-酪蛋白的多个切割位点来探索蛋白酶识别位点，κ-酪蛋白被分泌的细菌蛋白酶切割	牛奶中荧光假单胞菌分泌的蛋白酶及UHTS乳中AprX酶活性的测定	时间短，灵敏度高，即使存在纤溶酶，也能选择性地测定细菌蛋白酶活性	需要优化缓冲液体系
表面等离子体共振技术	通过检测共振角的变化，实时监测生物分子间的相互作用，包括蛋白酶与底物、抑制剂、抗体之间的特异性结合过程	蛋白酶活性、抑制作用以及与其他生物分子的相互作用机制	检测速度快，能实时、动态地监测蛋白酶活性	操作复杂，成本高

目前，我国国家标准中普遍采用福林酚试剂法检测蛋白酶活性[28]，该方法准确度高、灵敏度高且检测限较低。此外，邻苯二甲醛衍生比色法也是一种常用的蛋白酶活性检测方法[29]，该方法精确度高、重现性好且反应时间短，但高温会导致SDS溶解，对分析结果影响较大，因此更适用于不

同样品间酶活性的比较。人工底物偶氮酪蛋白法利用发色物质在345 nm处具有最大吸收特性[30]，可有效测定接种嗜冷菌的UHTS乳中细菌蛋白酶活性。甲醛法以氨基酸态氮质量浓度表示酶活性[31]，但其数值对比难度较大。异硫氰酸荧光素-酪蛋白酶法操作简单、成本低且灵敏度较高，能在纳克和亚纳克范围内精确测定蛋白酶活性[32]，尤其适用于检测生牛乳中痕量水平的细菌蛋白酶活性，但样品前处理与测定耗时较长。

近年来，新型检测技术也逐步应用于乳制品中蛋白酶活性检测。生物发光共振能量转移生物传感器可用于测定牛奶中荧光假单胞菌分泌的蛋白酶活性。Dacres等[33]通过结合来自*κ*-酪蛋白的多个切割位点，针对蛋白酶识别位点设计了不同策略。该方法的优势在于，即使存在纤溶酶，也能选择性地测定细菌蛋白酶活性，可在几分钟内快速、准确地测定牛奶样品中与生理相关的AprX酶活性水平。表面等离子体共振技术能实时跟踪乳制品中蛋白酶与底物的结合与解离过程，捕捉到瞬时变化和中间态，通过测量这些变化即可实现对蛋白酶活性的检测，无需传统标记步骤，为乳制品中蛋白酶活性的检测提供了全新的无标记手段[34]。此外，GFP-Basta法、lgG单克隆抗体法等新型蛋白酶活性检测技术，存在成本较高、底物制备复杂等缺点。

1.4 假单胞菌属蛋白酶活性的影响因素

生产工艺、营养成分、温度、氧气及金属离子等因素共同作用，会对假单胞菌属蛋白酶活性产生综合影响。深入探究这些因素的作用机制，对精准调控假单胞菌属蛋白酶活性，减少其在生产、运输及贮藏过程中的危害具有重要意义。

1.4.1 生产工艺

牛奶在受热和凝胶化过程中的变化程度通常与所施加的热能呈负相关。相较于间接UHTS处理的牛奶，直接UHTS处理的牛奶接收到的热能更少，因此更易形成细软凝块并悬浮于乳清中[35]。为延长UHTS乳的保质期，需降低乳制品中假单胞菌属蛋白酶的酶活性。工业上可通过热处理降低最终乳制品中的酶含量，但由于假单胞菌属蛋白酶热稳定性强，若不预热直接进行UHTS处理，酶残留量仍较高，因此建议先在80~95 ℃条件下进行预热[36]。

1.4.2 营养成分

葡萄糖通常是假单胞菌属代谢的优先底物，也是AprX产生的抑制因子[37]；其次，假单胞菌属对有机酸、氨基酸的利用优于糖原、*D*-纤维二糖、*α*-*D*-乳糖、*β*-甲基-*D*-葡萄糖苷。如铜绿假单胞菌对有机酸、氨基酸的偏好度高于葡萄糖，恶臭假单胞菌的优先底物为*L*-精氨酸和*D*-半乳糖醛酸[38]。但随着假单胞菌种群扩大，当优先利用的营养物质供应不足时，会利用自身产生的蛋白酶水解蛋白质以获取营养[39]；蛋白质水解产生的NH_3、H_2S及其他化合物，会导致乳制品腐败变质[40]。因此，未来可通过筛选适宜的乳基质，寻找既能抑制蛋白酶产生，又不会促进嗜冷菌生长的碳源。

1.4.3 温度

假单胞菌的培养温度与碳源利用率直接相关，且其在蛋白酶活性较低时的碳源利用能力更强[41]。常见假单胞菌的最适生长温度约为25 ℃，当培养温度升高时，受蛋白质稳定性下降、代谢途径改变及基因表达调控等因素的影响，假单胞菌的蛋白酶合成会受到抑制。因此，在实际应用中需平衡嗜冷假单胞菌生长与蛋白酶分泌的关系，在现有条件下合理调控原料乳的贮藏温度，以最大限度地降低蛋白酶对原料乳的危害[42]。

1.4.4 氧气

假单胞菌是专性需氧菌，需在有氧环境下生长并合成胞外酶。Alves等[43]研究发现，培养时适当搅拌可以提高*Pseudomonas fluorescens* 07A产蛋白酶的能力，且搅拌培养比静态培养产酶时间更早且产量更高。此外，牛奶运输过程中的振动会促进好氧假单胞菌生长[44]。因此，需避免运输过程中剧烈摇晃，并尽量使用不透明包装材料，以减少对乳制品中酶活性的影响。

1.4.5 金属离子

目前已发现多种矿物质与假单胞菌属蛋白酶的产生及酶活性调控有关。钙是调控AprX结构的关键，可促进蛋白酶合成；铁对AprX合成的调节随浓度的不同而不同，即低浓度铁可刺激其合成，高浓度铁则具有抑制作用。张书文等[45]发现Fe^{2+}可以提高荧光假单胞菌BJ-10的胞外蛋白酶活性；Mu等[46]发现Mn^{2+}能增强荧光假单胞菌Rm12的蛋白酶活性；杨梦莹等[47]发现Zn^{2+}能显著提高

角蛋白酶活性，Mn^{2+}、Fe^{2+}、Al^{3+}对其也有增强作用，而Cu^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}则表现出抑制作用。因此，实际生产中需要控制金属离子的使用量与比例，避免其影响乳制品的稳定性。

2 乳凝胶化形成机制及影响因素

在UHTS乳贮存期间，乳中残留的蛋白酶是导致乳凝胶化现象的主要原因。这些耐热酶会持续水解乳中的蛋白质，其中微生物源蛋白酶主要作用于κ-酪蛋白，使其转化为副κ-酪蛋白，导致κ-酪蛋白对整个酪蛋白胶束的稳定作用丧失，进而使胶束之间相互聚集，最终形成凝胶。乳凝胶形成可分2个阶段：第一阶段是乳蛋白的水解；第二阶段是酪蛋白胶束的理化性质发生改变。

目前，乳凝胶化的形成机制主要分为2种。第一种机制与热稳定的蛋白酶相关。这类蛋白酶在乳制品贮存期间会水解蛋白质产生肽类物质，破坏蛋白质系统的稳定性，最终引发乳凝胶化。蛋白质水解既可由牛奶中天然存在的酶引发，也可由牛奶收集期间或之后引入的外源酶诱导。这种由蛋白质水解导致的乳凝胶化，通常发生在UHTS乳的保质期内，且往往在生产后较短时间内出现。第二种机制通常被称为“物理化学”型或“非酶”型年龄凝胶化[48]。该过程中，即使乳样品已发生凝胶化，其蛋白质在贮存期间也不会发生降解或水解。“物理化学”型凝胶通常在贮存数月后出现，且常超出UHTS乳的预期保质期。在总固形物含量或蛋白质浓度较高的牛奶中，该现象可能会更早发生。此外，还存在联合机制的可能性，例如“两阶段凝胶机制”——酶的作用先使乳体系变得不稳定，进而加速“非酶”型年龄凝胶化过程，但这一联合机制目前尚未得到证实。

以假单胞菌属中导致乳凝胶化的关键蛋白酶AprX为例[49]，其乳凝胶化形成机制见图1。AprX首先作用于胶束最外层的κ-酪蛋白，特异性裂解Phe-Met肽键，将κ-酪蛋白水解为副κ-酪蛋白。这一过程使副κ-酪蛋白胶束失去原有的带电荷部分，减小粒子间阻力，引发絮凝现象。此外，AprX还能非特异性裂解酪蛋白胶束表面的可溶性亲水酪蛋白-大肽（CMP）区域，导致酪蛋白胶束表面亲水尾部发生断裂，降低酪蛋白胶束间的静电斥力，进而使整个体系的排斥力下降。随着排斥力持续降低，酪蛋白胶束逐渐聚集融合，形成更大的颗粒团，这些颗粒团进一步相互作用，最终导致乳凝胶的形成。另外，AprX还具备水解β-酪蛋白和α_S-酪蛋白的能力，这一特性会破坏酪蛋白胶束内部的稳定性[50]，进一步推动乳凝胶化进程。

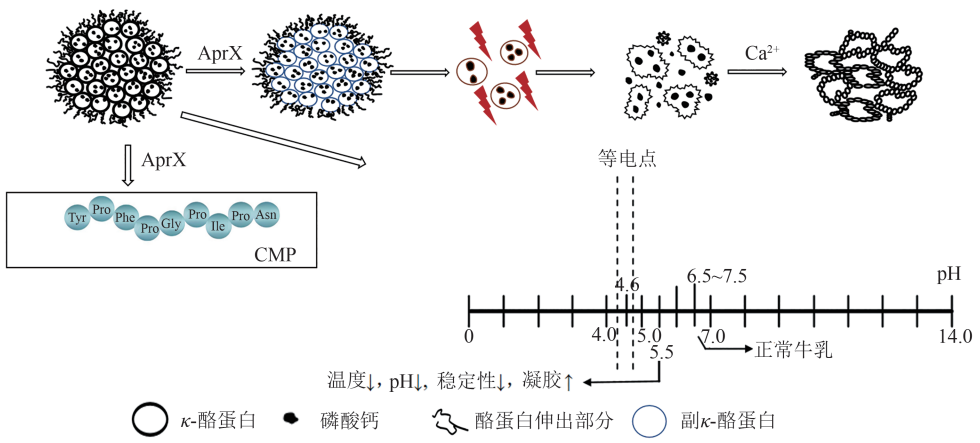


图1 乳凝胶化形成机制

Fig. 1 Gelatinization mechanism of dairy products

从原理层面进行剖析，乳凝胶的形成受多种因素协同影响，主要分为2个方面。一方面，乳凝胶的形成依赖酪蛋白与胶体磷酸钙（CCP）的配比，两者配比是决定凝胶成熟的关键[51]。Ca^{2+}活性会影响酪蛋白与CCP的结合方式，参与乳凝胶形成过程，同时调节酶的聚合与成熟，进而影响乳凝胶的结构与稳定性。CCP能增强乳凝胶网络连接并加速其成熟，酪蛋白含量则直接决定乳

凝胶的最终形态与性能；同时，酶的聚合与成熟过程也受CCP和酪蛋白含量的共同调节。在这些因素共同作用下，乳凝胶网状结构形成，粒子间的相互作用力增强，最终导致乳清析出，产生脱水收缩现象。这一过程既涉及物理层面的粒子相互作用，也与化学层面的酶促反应、离子活性密切相关。另一方面，在牛奶自然pH条件下，酪蛋白胶束的稳定性依赖其表面*κ*-酪蛋白形成的毛刷状结构[52]，此时胶束表面的净电荷较高，静电斥力使胶束能稳定分散于牛奶中。然而，当牛奶被酸化后，pH降低会导致酪蛋白胶束表面净电荷减少，尤其是当pH降至5.5以下且加热温度不超过50 ℃时，乳凝胶形成更加明显。当pH接近酪蛋白等电点时，酪蛋白分子所带净电荷趋于零，静电斥力大幅减弱，胶束间吸引力增强，开始聚集形成凝胶。而较低的温度会减缓分子热运动，既有利于胶束聚集，又不会破坏酪蛋白结构，进一步促进了乳凝胶的形成。

3　乳凝胶化调控策略

3.1　盐的添加

盐的添加会影响酪蛋白胶束的物理化学性质及化学键的形成，进而影响乳凝胶的形成。这可能是由于假单胞菌通常是在细胞处于低能量状态时产生蛋白酶，此时细胞更易耗尽底物；但当添加柠檬酸盐等更容易被代谢的碳源时，蛋白酶的产生会受到抑制[53]。在实际应用中，在UHTS处理前添加低质量分数（0.05%~0.10%）的多磷酸盐（如聚偏磷酸钠、六偏磷酸盐等），可有效延缓乳凝胶化。这可能是由于多磷酸盐既能降低乳制品中的Ca^{2+}水平，又能通过与酪蛋白胶束结合抑制蛋白质间的相互作用，从而延缓乳凝胶化过程[54]。

3.2　充入CO_2

目前国内外主要采用CO_2、N_2、乳酸菌、噬菌体、壳聚糖等多种物理、化学和生物处理技术控制假单胞菌。刘美凤等[55]研究发现，增压CO_2能显著抑制荧光假单胞菌等嗜冷菌的生长繁殖，不仅能杀灭荧光假单胞菌，还能抑制其蛋白酶的分泌。另有研究表明，向发酵乳制品中充入CO_2对产品感官及理化性质无明显影响，且能将保质期延长2~3 d；若用CO_2处理原料乳，可使原料乳的保质期从6 d延长至16 d[56]。Lo等[57]的研究也证实，采用CO_2处理原料乳能有效抑制荧光假单胞菌的生长，并将原料乳的变质时间推迟7 d。

3.3　优化生产工艺

目前尚无能够完全消除耐热蛋白酶的方法，但在生产过程中，可通过对嗜冷菌及其代谢物进行合理调控，降低其对乳制品品质的影响[58]。因此，作者对生产中可能造成微生物污染的工艺环节进行了分析，并总结了乳制品生产中乳凝胶化的控制措施，见表2。

表2　乳凝胶化控制措施

Table 2　Control measures for gelatinization of dairy products

控制措施	对乳凝胶化的具体影响	参考文献
控制原料乳中的嗜冷菌数量	牛奶中嗜冷菌数量应控制在1 000 CFU/mL以下，若超过该值，嗜冷菌会与牛奶中的乳蛋白、乳脂肪等成分发生反应并生成蛋白酶，不仅使牛奶产生凝结块，还会产生脂肪氢化味	[59-60]
深度冷藏	相同原料乳在2 ℃贮存比在4 ℃贮存生产出的UHTS乳保质期更长，建议冬季贮存原料乳温度设为2 ℃，夏季设为4 ℃	[61]
增加预热处理	建议将巴氏杀菌的预热过程调整为约55 ℃，由于大多数嗜冷菌产生的蛋白酶对40~70 ℃的热处理较为敏感，其在55 ℃左右时极为敏感，更易失活；将原料乳置于55 ℃条件下热处理60 min，其蛋白酶活性仅剩17%。	[62]
高压均质	高压均质不仅能灭活假单胞菌，对其产生的蛋白酶也具有一定的灭活作用，可降低荧光假单胞菌蛋白酶导致的乳蛋白水解；在100 MPa高压均质下处理含质量分数3%脂肪的牛乳，蛋白质水解度降低29%，乳凝胶化延迟23 d；在150 MPa高压均质处理下，蛋白质水解度降低51%，乳凝胶化延迟40 d	[63-65]
超高压处理	在不同压力（300、400、500 MPa）、保持时间（20、40、60 min）和温度（20、40、60 ℃）条件下，随着压力升高、时间延长或温度降低，乳凝胶化时间逐渐缩短，而凝胶强度与凝乳速率均得到改善，证明超高压处理对凝乳酶诱导的乳凝胶品质具有显著影响	[66]
超声处理	经超声处理的脱脂乳表现出明显的剪切变稀效应，触变性与黏弹性增大，凝胶点推迟；200 W超声处理时，酪蛋白的乳化活性和乳化稳定性均在20 min时达到最大值；400 W超声处理时，两者分别在20 min和4 min时达到最大值；600 W超声处理时，两者均在10 min时达到最大值	[67]
微滤技术	微滤技术可降低蛋白酶和纤溶酶的酶活性，从而有效延长乳制品保质期	[68-70]

3.4 新型调控策略

目前的新型调控策略主要包括5个方面。1)酶法调控:通过转谷氨酰胺酶可催化乳蛋白分子间形成共价键[71],通过增强乳蛋白凝胶网络结构,提高凝胶强度与稳定性,减少乳清析出,从而实现对乳凝胶化过程的调控。乳糖氧化酶可用于延缓假单胞菌属诱导的UHTS乳中的凝胶化现象[72]。2)微流控技术:通过控制乳液的形成与结构,将对蛋白酶敏感的聚合物材料包裹在乳液液滴中,形成具有特定结构和性能的水凝胶。在乳凝胶化过程中,蛋白酶的作用会改变乳凝胶的结构与性质,从而实现对乳凝胶化的定向调控[73]。3)分子对接技术:该技术被用于研究乳蛋白衍生肽对乳制品中蛋白酶的抑制作用。通过分析肽与蛋白酶活性位点的结合模式、氢键形成、疏水相互作用等,揭示肽的结构特征与其抑制酶活性之间的关联[74]。4)生物活性物质调控:抗菌肽可作为乳蛋白完整性和凝胶化过程的潜在调节剂,通过抑制蛋白酶活性维持乳蛋白的结构完整性[75]。5)基因编辑技术:通过对乳中蛋白酶相关基因进行编辑,如敲除导致乳蛋白过度水解的基因,或过表达能抑制蛋白酶活性的基因,从根源上控制蛋白酶活性,进而调控乳凝胶化过程,保障乳制品品质的稳定性。

4 展望

随着对假单胞菌属蛋白酶与乳凝胶化关系研究的不断深入,蛋白酶与乳蛋白的相互作用位点、结合模式以及两者作用后引发的一系列生化反应,仍有待进一步剖析。在实际的乳制品生产和贮存环境中,乳凝胶化过程往往受多种因素共同影响,因此未来的研究需综合考量温度、pH、离子强度等环境因素,以及其他微生物代谢产物对假单胞菌属蛋白酶活性和乳凝胶化的影响。同时,还需开发假单胞菌属蛋白酶的快速检测方法及配套试剂盒,方便生产企业及时监测产品质量,保障乳制品的安全与稳定性。基于对假单胞菌属蛋白酶作用机制的深入理解,可进一步开发新型调控策略,如借助生物发酵技术引入特定微生物,通过竞争抑制假单胞菌属的生长及蛋白酶的产生,实现对乳凝胶化的正向调控。从不同角度对乳凝胶化过程进行调控,能够为提升乳制品品质提供多元化技术方案。

参考文献

[1] BRUZAROSKI S R, DE SOUZA CORREIA S, DA SILVA DEVARA L F, et al. Influence of the storage temperature of raw sheep milk on the spoilage potential of *Pseudomonas* spp.[J]. Small Ruminant Research, 2023, 224: 106998.

[2] GAGNON M, JEAN S, DE TORO-MARTÍN J, et al. Biofilm formation in dairy: a food safety concern: insights into the prevalence of *Pseudomonadota* and yeasts on milking system surface biofilms[J]. Journal of Dairy Science, 2025, 108(8): 8141-8156.

[3] DAI L C, HU S Z, PANG X Y, et al. Community diversity of psychrophilic bacteria in dairy farm raw milk and its characteristic enzyme production at different temperature [J]. Food Bioscience, 2023, 54: 102921.

[4] 胡子毅. 利用噬菌体控制原料乳中假单胞菌的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2013.

[5] 胡少震. 原料乳中嗜冷菌污染源分析及快速检测方法的建立[D]. 阿拉尔:塔里木大学,2023.

[6] 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.

[7] MEJARES C T, HUPPERTZ T, CHANDRAPALA J. Thermal processing of buffalo milk: a review [J]. International Dairy Journal, 2022, 129: 105311.

[8] 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.

[9] 张熙,母智深. 原料乳中产耐热蛋白酶细菌的鉴定及其酶学特性研究[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(3):272-278.
ZHANG X, MU Z S. Identification of a bacterium isolated from raw milk and study on its heat-stable protease[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(3): 272-278.(in Chinese)

[10] ZHANG D, PALMER J, TEH K H, et al. 16S rDNA high-throughput sequencing and MALDI-TOF MS are complementary when studying psychrotrophic bacterial

diversity of raw cows' milk[J]. International Dairy Journal,2019,97:86-91.

[11] 邓应旺,韩雪,涂远强,等. 牛乳中嗜冷菌产耐热酶的研究进展[J]. 食品工业,2021,42(6):373-377.
DENG Y W,HAN X,TU Y Q,et al. Research progress on thermostable enzymes produced by psychrophilic bacteria in milk[J]. The Food Industry,2021,42(6):373-377.(in Chinese)

[12] MAIER C,HUPTAS C,VON NEUBECK M,et al. Genetic organization of the *aprX-lipA2* operon affects the proteolytic potential of *Pseudomonas* species in milk[J]. Frontiers in Microbiology,2020,11:1190.

[13] 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,2023,391-393:110147.

[14] MAIER C,HOFMANN K,HUPTAS C,et al. Simultaneous quantification of the most common and proteolytic *Pseudomonas* species in raw milk by multiplex qPCR[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2021,105(4):1693-1708.

[15] MARTINS M L,PINTO U M,RIEDEL K,et al. Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk[J]. Brazilian Journal of Microbiology,2015,46(1):207-217.

[16] CALDERA L,FRANZETTI L,VAN COILLIE E,et al. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods[J]. Food Microbiology,2016,54:142-153.

[17] 张淑娟,李华军,乌鲁科晖,等. 荧光假单胞菌BJ10蛋白酶生成及乳蛋白降解研究[J]. 食品加工与保鲜,2015,39(6):2466-2472.
ZHANG S J,LI H J,WU L K H,et al. Studies on protease production and milk protein degradation by *Pseudomonas fluorescens* BJ10[J]. Food Processing and Preservation,2015,39(6):2466-2472.

[18] WOODS R G,BURGER M,BEVEN C A,et al. The *aprX-lipA* operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a molecular analysis of metalloprotease and lipase production[J]. Microbiology,2001,147(2):345-354.

[19] VON NEUBECK M,BAUR 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.

[20] 韦盘秋,黄丽,黄加祥,等. 乳及乳制品中假单胞菌危害及控制研究进展[J]. 食品科技,2021,46(9):311-315.
WEI P Q,HUANG L,HUANG J X,et al. Research progress on the harm and control of *Pseudomonas* in milk and dairy products[J]. Food Science and Technology,2021,46(9):311-315.(in Chinese)

[21] 王一恬. 荧光假单胞菌耐热性蛋白酶特性及其对液态乳品质影响的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2023.

[22] 祁岩. 液态乳中荧光假单胞菌生长及产酶情况分析[J]. 食品科技,2023,48(7):50-56.
QI Y. Analysis of growth and protease production of *Pseudomonas fluorescens* in liquid milk[J]. Food Science and Technology,2023,48(7):50-56.(in Chinese)

[23] 任泽宇. 假单胞菌对牛乳品质危害的种间差异分析及种水平检测技术开发[D]. 无锡:江南大学,2022.

[24] ZHANG S W,LI H J,ULUKO H,et al. Investigation of protease production by *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 and degradation on milk proteins[J]. Journal of Food Processing and Preservation,2015,39(6):2466-2472.

[25] BAGLINIÈRE F,MATÉOS A,TANGUY G,et al. Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilisation[J]. International Dairy Journal,2013,31(2):55-61.

[26] VOLK V,GLÜCK C,LEPTIHN S,et al. Two heat resistant endopeptidases from *Pseudomonas* species with destabilizing potential during milk storage[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2019,67(3):905-915.

[27] MOHAMED AHMED I A,BABIKER E E,MORI N. pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins[J]. LWT-Food Science and Technology,2010,43(5):759-764.

[28] 王学标,何云侠,刘强. 福林酚试剂法与缩二脲试剂法测定饲用蛋白酶活力的比较分析[J]. 畜牧与兽医,2019,51(3):23-28.
WANG X B,HE Y X,LIU Q. Comparison of the folinphenol reagent method and the biuret reagent method for determination of feed protease activity[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2019,51(3):23-28.(in Chinese)

[29] QIN X,CHENG J Q,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.

[30] YUAN L, SADIQ F A, LIU T J, et al. Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes[J]. Journal of Zhejiang University: Science B (Biomedicine & Biotechnology), 2018, 19(8): 630-642.

[31] 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.
YANG X, QU X X, GUO Q H, et al. Comparison of different determination methods of protease activity in the milk[J]. China Dairy Industry, 2014, 42(6): 48-51. (in Chinese)

[32] BUTTON P D, ROGINSKI H, DEETH H C, et al. Improved shelf life estimation of UHT milk by prediction of proteolysis[J]. Journal of Food Quality, 2011, 34(4): 229-235.

[33] DACRES H, WEIHS F, WANG J, et al. Bioluminescence resonance energy transfer biosensor for measuring activity of a protease secreted by *Pseudomonas fluorescens* growing in milk[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1270: 341401.

[34] XIA N, LIU G, YI X Y. Surface plasmon resonance for protease detection by integration of homogeneous reaction [J]. Biosensors, 2021, 11(10): 362.

[35] 王春燕, 任彩霞, 任向东, 等. 影响超高温灭菌乳货架期品质的相关蛋白酶类研究进展[J]. 现代食品, 2020, 26(18): 40-47.
WANG C Y, REN C X, REN X D, et al. Research progress of proteases related to shelf life quality of UHT milk [J]. Modern Food, 2020, 26 (18): 40-47. (in Chinese)

[36] 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.

[37] 王月, 张荣先, 张旦旦, 等. 碳氮源对 *Bacillus pumilus* K9 产角蛋白酶的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(10): 1077-1083.
WANG Y, ZHANG R X, ZHANG D D, et al. Effects of carbon and nitrogen sources on keratinase production from *Bacillus pumilus* K9[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33 (10): 1077-1083. (in Chinese)

[38] 肖琳, 吴安宁, 许国超, 等. 恶臭假单胞菌的正丁醇耐受性驯化及比较基因组学分析[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(10): 65-72.
XIAO L, WU A N, XU G C, et al. Adapting *n*-butanol tolerance of *Pseudomonas putida* and comparative genomics analysis [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(10): 65-72. (in Chinese)

[39] 解万翠, 杨亚东, 杨锡洪, 等. 蜡状芽孢杆菌产中性蛋白酶发酵条件的优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 26-30, 129.
XIE W C, YANG Y D, YANG X H, et al. Response surface methodology optimization of fermentation conditions for neutral protease production by *Bacillus cereus*[J]. Food & Machinery, 2016, 32(1): 26-30, 129. (in Chinese)

[40] MACHADO S G, HEYNDRICKX M, DE BLOCK J, et al. Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 222: 65-71.

[41] DU B Y, LU M, LIU H M, et al. *Pseudomonas* isolates from raw milk with high level proteolytic activity display reduced carbon substrate utilization and higher levels of antibiotic resistance[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 181: 114766.

[42] 乔传丽, 金丹, 蒋艾廷, 等. 传统发酵酸牛奶中产蛋白酶酵母菌的筛选及产酶条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(5): 73-78.
QIAO C L, JIN D, JIANG A T, et al. Screening of yeast with high protease activities from traditional yogurt and optimization of enzyme conditions[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38 (5): 73-78. (in Chinese)

[43] ALVES M P, SALGADO R L, ELLER M R, et al. Temperature modulates the production and activity of a metalloprotease from *Pseudomonas fluorescens* 07A in milk [J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101 (2): 992-999.

[44] CHANG G H, LI Q H, WANG T, et al. Characterization of *Pseudomonas* spp. contamination and *in situ* spoilage potential in pasteurized milk production process [J]. Food Research International, 2024, 188: 114463.

[45] 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 S W, LIU L, LI H J, et al. Purification and

properties of extracellular protease from *Pseudomonads fluorescens*[J]. Food Science,2012,33(9):206-210.(in Chinese)

[46] MU Z S,DU M,BAI Y. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas fluorescens* Rm12 from raw milk [J]. European Food Research and Technology,2009,228(5):725-734.

[47] 杨梦莹,庞坤容,潘江欣,等. 一株可高效降解羽毛的铜绿假单胞菌的分离、鉴定、产酶条件优化及其酶活研究[J]. 微生物学报,2022,62(3): 968-981.
YANG M Y, PANG K R, PAN J X, et al. Isolation, identification, enzyme production optimization, and enzyme activity study of *Pseudomonas aeruginosa* strain capable of efficient feather degradation [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62 (3) : 968-981.(in Chinese)

[48] ANEMA S G. Age gelation,sedimentation,and creaming in UHT milk:a review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,2019,18(1):140-166.

[49] ZHANG C Y, BIJL E, 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.

[50] 汤恒,张娟,堵国成. 高效降解牛奶过敏原蛋白酶菌种筛选及其重组植物过氧化氢酶的功能验证[J]. 食品与生物技术学报,2021,40(3):28-34.
TANG H,ZHANG J,DU G C. Study on milk-allergen-degradation protease screening and its recombinant vegetative catalase function verification[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2021,40(3):28-34.(in Chinese)

[51] WANG T, LI Y D, DE WITTE F, et al. Influence of calcium concentration on the re-assembly of sodium caseinate into casein micelles and on their renneting behavior[J]. Food Research International, 2024, 180: 113991.

[52] REITER M, REITMAIER M, HASLBECK A, et al. Acid gelation functionality of casein micelles in concentrated state: influence of calcium supplementation or chelation combined with enzymatic stabilization[J]. Food Hydrocolloids,2023,143:108927.

[53] 邵言蹊,刘大松,徐姝,等. 低温诱导羊乳中β-酪蛋白从胶束中解离的研究[J]. 食品与生物技术学报,2021,40(8):27-36.
SHAO Y X, LIU D S, XU S, et al. Dissociation of β-casein from casein micelles in skimmed goat milk at low temperature [J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2021,40(8):27-36.(in Chinese)

[54] 王辉,吕加平,迟玉杰. 耐热蛋白酶对UHT乳品质的影响及控制方法研究进展[J]. 中国乳品工业,2007,35(9):25-29.
WANG H,LV J P,CHI Y J. Recent studies on effect of heat resistant enzymes on UHT milk quality and control measures[J]. China Dairy Industry,2007,35(9):25-29.(in Chinese)

[55] 刘美凤,付瑞东,姚春艳,等. 加压CO_2对乳中荧光假单胞菌杀菌效果的研究[J]. 中国乳品工业,2012,40(6):39-42.
LIU M F,FU R D,YAO C Y,et al. Sterilization effect of pressurized CO_2 on *Pseudomonas fluorescens* in milk[J]. China Dairy Industry,2012,40(6):39-42.(in Chinese)

[56] ZHENG A R, WEI C K, LIU J, et al. Deciphering the mechanism by which carbon dioxide extends the shelf life of raw milk: a microbiomics- and metabolomics-based approach[J]. Molecules,2024,29(2):329.

[57] LO R, TURNER M S, WEEKS M, et al. Culture-independent bacterial community profiling of carbon dioxide treated raw milk[J]. International Journal of Food Microbiology,2016,233:81-89.

[58] SAHA S,MAJUMDER R,ROUT P,et al. Unveiling the significance of psychrotrophic bacteria in milk and milk product spoilage: a review[J]. The Microbe, 2024, 2: 100034.

[59] 张鹏博,李智星,魏勇,等. 不同检测时间对原料乳中嗜冷菌检测结果的影响[J]. 中国乳业,2023(1):77-80.
ZHANG P B,LI Z X,WEI Y,et al. Effect of different detection time on the detection results of psychrophilein raw milk[J]. China Dairy,2023(1):77-80.(in Chinese)

[60] ZHANG D,LI S Q,PALMER J,et al. The relationship between numbers of *Pseudomonas* bacteria in milk used to manufacture UHT milk and the effect on product quality [J]. International Dairy Journal,2020,105:104687.

[61] 郭奇慧,白雪,胡新宇,等. UHT乳贮存期间蛋白变化的研究[J]. 食品工业科技,2008,29(12):143-144,147.
GUO Q H, BAI X, HU X Y, et al. Study on protein changes of UHT milk during storage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(12): 143-144, 147.(in Chinese)

[62] 张书文. 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.

[63] 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):210-214,222.
AI Z W, XU Z Y, YE J J. Effects of dynamic high-pressure processing on bioactive components of milk[J]. Food & Machinery, 2023, 39(7): 210-214, 222.(in Chinese)

[64] 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.
AI Z W. Recent progress in understanding the effects of ultra-high pressure homogenization on microorganisms and enzymes in milk[J]. Journal of Dairy Science and Technology,2022,45(2):42-46.(in Chinese)

[65] DE OLIVEIRA M M,DE CASTRO LEITE B R,TRIBST A A L,et al. Use of high pressure homogenization to reduce milk proteolysis caused by *Pseudomonas fluorescens* protease [J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 92: 272-275.

[66] Khaled Sobhy Nassar Nassar. 超高压处理改善羊乳及其酪蛋白胶束的理化和流变特性[D]. 北京:中国农业科学院,2020.

[67] 马蓉. 超声处理对脱脂牛乳功能性质及蛋白结构的影响[D]. 兰州:甘肃农业大学,2018.

[68] WANG D, FRITSCH J, MORARU C I. Shelf life and quality of skim milk processed by cold microfiltration with a 1.4-μm pore size membrane, with or without heat treatment[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(10): 8798-8806.

[69] LOTT T T, MARTIN N H, 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.

[70] VAN DER SCHAAF J M,GOULDING D A,FUERER C, et al. A novel approach to isolation of β-casein from micellar casein concentrate by cold microfiltration combined with chymosin treatment [J]. International Dairy Journal, 2024,148:105796.

[71] BAULAND J, FAMELART M H, FAIVELEY M, et al. Rheological properties of enzymatic milk gel: effect of ion partitioning in casein micelles[J]. Food Hydrocolloids, 2022,130:107739.

[72] RIVERA FLORES V K, DEMARSH T A, ALCAINE S D. Lactose oxidase: enzymatic control of *Pseudomonas* to delay age gelation in UHT milk[J]. Journal of Dairy Science,2021,104(3):2758-2772.

[73] WANG W, LI B Y, ZHANG M J, et al. Microfluidic emulsification techniques for controllable emulsion production and functional microparticle synthesis [J]. Chemical Engineering Journal,2023,452:139277.

[74] MUDGIL P, AL DHAHERI M K O, ALSUBOUSI M S M, et al. Molecular docking studies on α-amylase inhibitory peptides from milk of different farm animals [J]. Journal of Dairy Science,2024,107(5):2633-2652.

[75] ASHOKBHAI J K, BASAIAWMOIT B, DAS S, et al. Antioxidative, antimicrobial and anti-inflammatory activities and release of ultra-filtered antioxidative and antimicrobial peptides during fermentation of sheep milk: *in-vitro*, *in-silico* and molecular interaction studies [J]. Food Bioscience,2022,47:101666.

(责任编辑:刘冬梅)