

牛乳纤溶酶及其活性影响因素研究进展

杨晋辉^{1,2}, 钱文涛^{1,2,*}, 李洪亮^{2,3}, 王孟辉², 赵婧茹², 任晓敏¹

(1.蒙牛高科乳制品(北京)有限责任公司,北京 101100; 2.内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司,内蒙古 呼和浩特 011500; 3.蒙牛乳业(北京)有限责任公司,北京 101100)

摘要: 纤溶酶是影响牛乳产品货架期质量的重要因素。纤溶酶的水解活性受到激活剂、抑制剂以及激活剂抑制因子等调控因子的影响,其热灭活参数、水解特性,以及所诱导凝胶表现特性、凝胶机制和检测方法均不同于嗜冷菌所分泌的蛋白酶。奶牛品种、泌乳阶段、胎次、体细胞数、细菌所分泌的蛋白酶等都会影响生乳中纤溶酶含量和活性。由于乳清蛋白、酪蛋白和美拉德反应会对纤溶酶的结构和底物识别产生影响,因此,热加工、膜浓缩和高压等加工工艺都会对牛乳中纤溶酶活性产生影响。本文通过对纤溶酶系组成及其调控机制、纤溶酶诱导牛乳老化凝胶形成机制、影响纤溶酶活性因素和纤溶酶的检测方法进行综述,以期对牛乳纤溶酶的研究提供进一步参考。

关键词: 牛乳; 纤溶酶; 老化凝胶; 奶牛; 加工

Recent Advances in Milk Plasmin and Factors Affecting Its Activity

YANG Jinhui^{1,2}, QIAN Wentao^{1,2,*}, LI Hongliang^{2,3}, WANG Menghui², ZHAO Jingru², REN Xiaomin¹

(1. Mengniu Hi-Tech Dairy Products (Beijing) Co., Ltd., Beijing 101100, China; 2. Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Co., Ltd., Hohhot 011500, China; 3. Mengniu Dairy (Beijing) Co., Ltd., Beijing 101100, China)

Abstract: Plasmin is an important factor affecting the shelf-life quality of milk products, and its hydrolytic activity is regulated by many factors, such as activators, inhibitors, and activator inhibitors. Compared with protease secreted by psychrophilic bacteria, plasmin presents different thermal inactivation parameters and hydrolysis properties; the milk gelation properties induced by the two enzymes, the gelation mechanisms and the methods used to detect the milk hydrolysates are different. Plasmin activity in raw milk is affected by dairy cow breeds, lactation stage, parity, and the number of somatic cells, as well as protease secreted by bacteria. As whey protein, casein and Maillard reaction can affect plasmin structure and substrate recognition by it, heating, membrane filtration, and high pressure processing can affect plasmin activity. In this paper, we summarize the composition and regulatory mechanism of the plasmin system in milk, the mechanism of plasmin-induced age gelation of milk, the factors affecting plasmin activity and the methods used to assay plasmin activity, with the aim to provide a reference for further research on milk plasmin.

Keywords: milk; plasmin; age gelation; cows; processing

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220531-379

中图分类号: TS252.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)13-0235-09

引文格式:

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.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220531-379. <http://www.spkx.net.cn>

YANG Jinhui, QIAN Wentao, LI Hongliang, et al. Recent advances in milk plasmin and factors affecting its activity[J].

Food Science, 2023, 44(13): 235-243. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220531-379.

<http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-05-31

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(32130081); 呼和浩特市重大科技专项(2021-农-重-1)

第一作者简介: 杨晋辉(1987—)(ORCID: 0000-0003-0159-1669), 男, 高级工程师, 博士, 研究方向为乳品质量改良。

E-mail: yangjinhui1@mengniu.cn

*通信作者简介: 钱文涛(1977—)(ORCID: 0000-0002-4513-0218), 男, 高级工程师, 硕士, 研究方向为乳制品加工和乳品质量改良。E-mail: qianwentao@mengniu.cn

随着“健康中国2030”的推动实施，消费者对于摄入营养的关注度不断提升。2009—2018年间，我国居民乳制品的平均摄入量从12.8 g/d增长至29.1 g/d，仍未达到膳食推荐标准，仅相当于欧美国家人均摄入量的1/15^[1]。纯牛乳是我国居民摄入乳制品的主要形式，其摄入量占比达到60%^[2]。然而，货架期内牛乳的蛋白水解会引起偶然的产品苦包和蛋白絮凝^[3]，严重影响消费者的饮乳体验和消费欲望。

牛乳中能够引起蛋白水解的酶包括内源酶和嗜冷菌所分泌的胞外蛋白酶。牛乳中的内源酶主要包括纤溶酶、弹性蛋白酶和组织蛋白酶，纤溶酶活性占总蛋白酶活性的60%左右^[4]。纤溶酶所引起的酪蛋白水解是超高温（ultra high temperature, UHT）灭菌乳在贮存期间出现凝胶和苦味的主要原因^[3]。牛乳中的纤溶酶及其酶原来源于血液，其活性受到复杂的激活-抑制调控机制调节^[5]。尽管纤溶酶水解酪蛋白对乳酪最终风味和质量有着积极的影响^[6]，但其诱导老化凝胶严重限制了牛乳产品的货架期^[3]。本文对牛乳中纤溶酶系组分、纤溶酶诱导牛乳老化凝胶、影响纤溶酶活性的因素和纤溶酶的检测方法进行综述，以期对牛乳纤溶酶的深入研究提供参考。

1 牛乳中的纤溶酶系统

纤溶酶系统是一套复杂的相互调节的蛋白调节系统，其组成包括纤溶酶、纤溶酶原、纤溶酶原激活剂、纤溶酶抑制剂、纤溶酶原激活剂抑制因子，其相互之间的调节关系如图1所示。牛乳中纤溶酶及其酶原与血液中的纤溶酶和酶原性质相一致，血液中的纤溶酶主要以酶原形式通过乳腺细胞的连接处进入牛乳中，然后在乳腺管腔内或在贮存期间被激活^[5]。

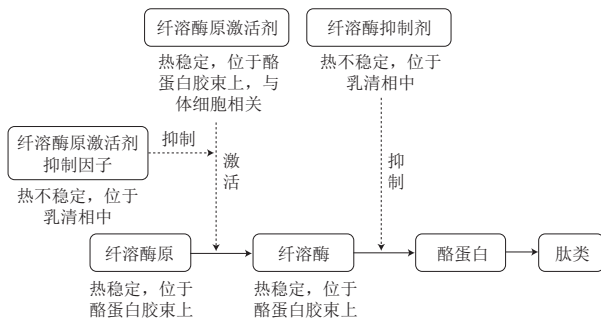
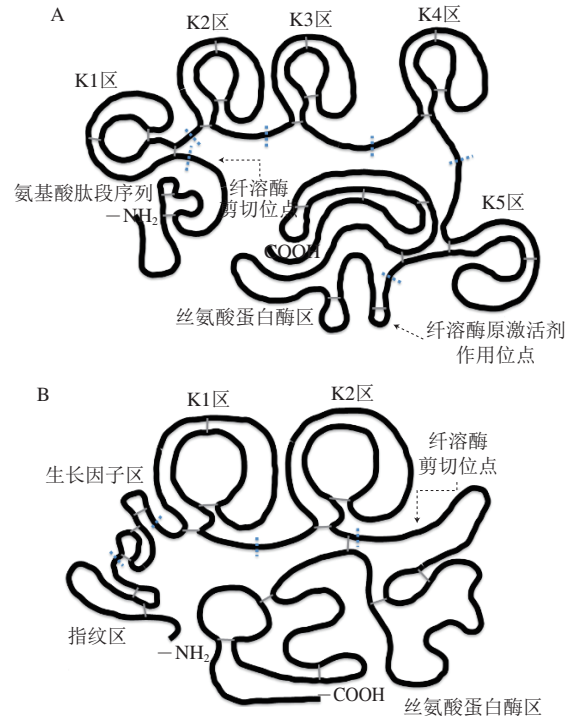


图1 牛乳纤溶酶系统示意图^[6]

Fig. 1 Schematic diagram of milk plasmin system^[6]

牛乳中纤溶酶为碱性丝氨酸蛋白酶，分子质量为48 kDa，在pH 7.4~7.5和37 °C条件下表现出最佳的类似胰蛋白酶活性^[6]。牛乳中纤溶酶主要以纤溶酶原形式存在，纤溶酶原为糖基化蛋白质，由786个氨基酸残基组成，分子质量为88 kDa^[6]。纤溶酶原有5个典型的环饼状结构域

(kringles)，每个结构域有3个二硫键参与维持结构稳定，如图2A所示，这些结构域含有对赖氨酸亲和力不同的结合位点，在调节酶原激活方面发挥重要的作用^[6]。



A、B分别参考文献[7-8]进行绘制，其中点虚线为不同结构域的分界线，灰色短线条为二硫键。

图2 纤溶酶原(A)和纤溶酶原激活剂(B)的域结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of the domain structure of plasminogen (A) and plasminogen activator (B)

纤溶酶原激活剂也属于碱性丝氨酸蛋白酶，通过水解纤溶酶原的环饼状结构域5(K5区)与催化结构域之间的Arg557-Ile558来激活酶原(图2A)；此外，纤溶酶通过自催化剪切纤溶酶原Lys77-Arg78部分，释放出77个氨基酸残基的预活化肽后，剩余Arg-纤溶酶原构象发生改变，更容易被激活剂所激活^[6,9]。纤溶酶也可以催化纤溶酶原激活剂由单链转化为双链(图2B)，极大提高激活剂的催化活性^[5]。所有酪蛋白组分，特别是 α_{s2} -酪蛋白，能够增强激活剂对纤溶酶原的活化作用^[6]。牛乳中纤溶酶原激活剂主要有两种，分别为组织型和尿激酶型。组织型激活剂来源于血液转运，其活性与纤维蛋白数量显著相关，与酪蛋白相连接；而尿激酶型激活剂来源于淋巴细胞的分泌，与生乳中的体细胞相连接^[6]。尿激酶型激活剂可以从体细胞解离，并通过赖氨酸或静电作用与酪蛋白相结合^[5]。

纤溶酶原激活剂抑制因子和纤溶酶抑制剂均属于丝氨酸蛋白酶抑制剂，分别抑制酶原激活剂和纤溶酶，两者均分布在乳清相中，活性受pH值和温度影响较大^[5]。牛乳中鉴定出多种丝氨酸蛋白酶抑制剂，包括C1-抑制剂、

抗凝血酶-III、间- α -胰蛋白酶抑制剂、 α 2-巨球蛋白、 α 1-蛋白酶抑制剂和 α 2-抗纤溶酶 α ，而 α 2-抗纤溶酶被认为是主要的纤溶酶抑制剂^[6]。

2 纤溶酶诱导牛乳凝胶形成的过程

牛乳的凝胶老化主要是由乳清蛋白中的 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin, β -lg)和酪蛋白中 κ -酪蛋白(casein, CN)相互结合形成三维网络结构的过程,表现为牛乳黏度上升和蛋白絮凝^[3]。老化凝胶的形成主要分为3个阶段:1)热加工过程中, β -lg和 κ -CN内的二硫键发生分子间交联,形成 β -lg- κ -CN复合物,并附着在酪蛋白胶束表面;2)货架期内,附着在酪蛋白胶束表面的 β -lg- κ -CN复合物缓慢解离到乳清相中;3)乳清相中 β -lg- κ -CN复合物形成交联,并与蛋白结合在一起^[3]。根据凝胶机理不同,牛乳的老化凝胶分为酶促凝胶和非酶促凝胶,酶促凝胶是指由蛋白酶水解酪蛋白颗粒,将 β -lg- κ -CN复合物释放到乳清中,彼此交联形成凝胶^[3]。不同来源蛋白酶诱导牛乳老化凝胶差异比较如表1所示。非酶促凝胶则是由于贮存过程中,解离 κ -CN的胶束会由于重力作用缓慢聚集(储存时间超过货架期)形成凝胶^[3]。除蛋白酶外,影响牛乳老化凝胶的因素还包括乳牛泌乳、热加工强度和贮存温度等,产品中盐类添加剂会延迟或加速凝胶出现^[10]。

表1 不同蛋白酶诱导牛乳老化凝胶的比较

Table 1 Comparison of milk age gelation induced by different proteases

特性	内源酶	外源酶	参考文献
种类	主要是纤溶酶,来源于奶牛血液	由嗜冷菌分泌,主要是假单胞杆菌分泌的耐热酶	
活化能/(kJ/mol)	36.3±12.2	96.1±9.3	
热灭活参数 ^[11]			
<i>D/T</i> (min/°C)	0.2/140	(2.7±1.4) /130	[11]
Z/°C	80	30.0±2.3	
水解特性	β -CN> α ₂ -CN> α ₁ -CN> κ -CN	κ -CN> β -CN> α ₂ - α ₁ -CN,不同嗜冷菌分泌耐热酶水解特性有所不同	[12]
凝胶表观特性	包装顶部形成类似于“奶皮”漂浮物,液体部分较为清亮透明,有柔软易碎软凝胶悬浮于液体中	牛乳产品包装顶部形成蛋糕样黏附物,底部形成致密坚固块状沉淀,液体部分不透明	[12-13]
凝胶形成机理	纤溶酶通过水解酪蛋白中的 β -和 α ₂ - α ₁ -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	耐热酶水解乳清和酪蛋白胶束上的 κ -CN形成“副 κ -CN样”肽段,而带有“副 κ -CN样”肽段的胶束和变性乳清蛋白通过疏水作用和钙桥连接形成致密凝胶	[14]
肽类特征	疏水,在色谱图上出峰时间较晚,其中有些为苦味肽	亲水,在色谱图上出峰时间较早	[12]
检测方法	β -lg-CN条带较浅或缺失,出现 γ -CN条带(分子质量介于 κ -CN和 β -lg之间,或小于 α -乳白蛋白(α -lactalbumin, α -la))	κ -CN缺失,出现“副 κ -CN样”肽段条带(分子质量位于 β -lg和 α -la之间)	[10,13]
蛋白成分检测	非蛋白氮含量不变,非酪蛋白氮含量增加	非蛋白氮含量和非酪蛋白氮含量均增加	[12]

注:Z.在热力致死时间曲线上缩短90%的加热时间所需要升高的温度。*D/T*.在一定的环境和热力致死温度(*T*/°C)下,杀灭某种微生物90%所需要的时间(*D*/min)。

纤溶酶对赖氨酸和精氨酸具有亲和性,可水解Lys-X和Arg-X键,优先水解含赖氨酸的肽键,其对酪蛋白组分的水解优先顺序为 β -、 α ₂-和 α ₁-CN,而对 κ -CN和乳清蛋白的水解程度较小^[6],对不同酪蛋白的水解位点和水解产物如表2所示。 β -CN的乳糖基化导致赖氨酸残基的 ϵ -氨基被封闭,构象发生变化,纤溶酶无法识别并结合底物,这表明乳糖基化赖氨酸的形成会抑制纤溶酶的水解作用^[15]。进一步研究表明,琥珀酰化赖氨酸同样阻止了纤溶酶对 β -CN的识别结合作用^[16],因此,酪蛋白中完整赖氨酸残基结构对于纤溶酶水解至关重要。

表2 纤溶酶对酪蛋白的切割位点及其降解产物^[6]

Table 2 Cleavage sites of casein by plasmin and corresponding degradation products^[6]

蛋白组分	切割位点	产物
β -CN	优先识别Lys28-Lys29、Lys105-His106和Lys107-Glu108,也能识别Lys29-Ile30、Lys113-Tyr114和Arg183-Asp184	γ -CN: γ 1 (β -CN f29-209)、 γ 2 (β -CN f106-209)和 γ 3 (β -CN f108-209), 蛋白胨: PP 8 _{non} (β -CN f1-28)、PP 5 (β -CN f1-105/107)和PP 8 _{non} (β -CN f29-105/107)
α ₂ -CN	8个位点,分别为Lys21-Gln22、Lys24-Asn25、Arg114-Asn115、Lys149-Lys150、Lys149-Lys150、Lys181-Thr182、Lys188-Ala189和Lys197-Thr198	水解形成大约14种肽,其中3种来自C末端区域的肽(f198-207、f182-207和f189-207)具有较高疏水性,可能是苦味肽来源
α ₁ -CN	主要有7个位点: Arg22-Phe23、Arg90-Tyr91、Lys102-Lys103、Lys103-Tyr104、Lys105-Val106、Lys124-Glu125和 Arg151-Gln152,另外还有11个切割位点	λ -CN

纤溶酶对乳清相酪蛋白的亲水区域表现出较高的亲和力和,而对疏水或磷酸化区域的亲和力最低,因此,纤溶酶可能通过水解酪蛋白-酪蛋白和酪蛋白-磷酸钙相互作用位点使酪蛋白胶束失稳^[17]。纤溶酶的水解作用降低了酪蛋白的伴侣活性,促进了分子间 β -折叠结构的形成,使酪蛋白胶束粒径增大^[18]。酪蛋白胶束的解离降低了纤溶酶与酪蛋白结合的位阻效应,有利于纤溶酶的进一步水解^[16]。当大约60%的 β -CN和 α ₁-CN被水解、水解度达到2.1%时,纤溶酶诱导软凝胶便会出现^[13]。有学者将纤溶酶诱导凝胶形成过程分为以下几个阶段:1)纤溶酶快速水解 β -和 α ₂-CN;2)酪蛋白之间的疏水互作、酪蛋白与磷酸钙的结合力、酪蛋白与离子盐之间的相互作用,均明显减弱,酪蛋白胶束微观结构破坏;3)酪蛋白微观结构发生重排,形成凝胶网络结构,出现表观凝胶现象;4)纤溶酶继续水解酪蛋白胶束,表观上形成半透明清亮液体^[13]。

纤溶酶通过水解 α ₁-CN和 β -CN使得乳脂球表面的酪蛋白胶束结构解体,从而导致乳脂球相互融合、上浮,在产品表面形成乳油层^[19]。牛乳中纤溶酶和纤溶酶原的添加可降低牛乳乳油层的硬度,增加其延展性,并增强感官指标中的结构和表观特性^[20]。与正常牛乳相比,内源酶的水解会使牛乳粒径分布同时增大和减小,形成3个粒径峰,这不同于外源酶水解所形成的双峰分布^[13]。直接加热的UHT牛乳的货架期贮存实验结果表明,纤溶酶水解

酪蛋白所释放的肽段中有1/3为苦味肽^[17]，这可能是凝胶产品中苦味物质的主要来源。此外，货架期内牛乳中纤溶酶的激活会导致色泽参数 L 、 a 、 b 值均缓慢降低^[21]。

3 影响纤溶酶活性的因素

3.1 动物

3.1.1 种类和品种

不同品种泌乳动物之间乳中纤溶酶活性存在差异。尽管骆驼乳（ 31.76 ± 3.64 ）U/mL和牛乳（ 24.77 ± 3.42 ）U/mL中的纤溶酶活力无显著差异，但骆驼乳（ 23.69 ± 2.12 ）U/mL中的纤溶酶原活力远低于牛乳（ 44.40 ± 2.39 ）U/mL^[22]。牛乳、绵羊乳和山羊乳的比较中，3种乳酪蛋白部分纤溶酶活力无显著差异，而绵羊乳乳清部分纤溶酶活力分别是山羊乳和牛乳乳清部分的4.5倍和11.5倍；牛乳酪蛋白部分的纤溶酶原活力最高，分别为绵羊乳和山羊乳部分的16.4倍和8.2倍，牛乳乳清部分纤溶酶原活力是绵羊乳的3倍，山羊乳中乳清部分纤溶酶原活性极低^[23]。水牛泌乳前7周内乳中纤溶酶活力为1.37~13.44 U/mL，纤溶酶原活力为12.06~54.98 U/mL^[24]。

牛乳中的纤溶酶及其酶原的活力也会受到乳牛品种的影响，国内的一项研究中纤溶酶活力在各实验乳牛品种中的排序是：荷斯坦乳牛>水牛>娟姗牛^[25]；而国外另一项研究却给出相反的结果：娟姗牛>瑞典红牛>荷斯坦乳牛，同时娟姗牛乳中的纤溶酶原活性也高于其他两种牛乳^[26]；但也有研究观察到纤溶酶及其酶原活性在不同的乳牛和绵羊品种之间不存在差异^[27-28]。不同乳牛品种间纤溶酶含量的差异可能与乳中酪蛋白相关，通过调整合成底物和酪蛋白比例以消除酪蛋白干扰后，品种间的纤溶酶活性差异得以抵消^[6]。

3.1.2 泌乳阶段和胎次

随着泌乳期的推进，乳牛乳腺的血乳屏障受损，上皮细胞通透性增加，来自血液的纤溶酶原和激活剂数量增加，纤溶酶原活化比例增加，导致泌乳后期通常伴随着较高的纤溶酶活性^[6]。然而，绵羊乳中纤溶酶活性的变化与乳牛并不一致，泌乳初期或中期绵羊乳中纤溶酶、酶原和酶原激活剂活性要高于泌乳后期^[28-30]。水牛乳中也有相类似的趋势，前4周内纤溶酶活性增加，随后降低，并在第7周以后趋于稳定；而纤溶酶原在泌乳开始后便逐渐下降，并在4周后稳定^[24]。与泌乳阶段变化相似，泌乳动物胎次的增加也会导致乳腺组织不可逆损伤程度增加，通透性增加，从而导致乳中纤溶酶活性可能随胎次增加而逐渐增加^[6]。纤溶酶活性随乳牛胎次呈二次性变化，第2、3胎乳牛的纤溶酶活性高于初产和第4胎乳牛^[25]，此外经产绵羊乳中纤溶酶活性是初产绵羊乳的1.5~2.2倍^[30]。

3.2 牛乳质量

3.2.1 体细胞数

在体细胞数低于50万个/mL和高于100万个/mL的两个绵羊群比较中，高体细胞数羊乳中的纤溶酶活性显著高于低体细胞数羊乳，纤溶酶原也具有类似的变化，但会受到泌乳阶段的影响^[29]。有关乳牛的研究也表明，体细胞数和纤溶酶活性呈显著正相关（相关系数0.567），但与纤溶酶原活性的相关性不显著（相关系数为-0.516）^[22]。乳房炎的发生使得体细胞的主要成分由单核细胞向多核细胞转变，中性粒细胞数量大幅增加^[31]。绵羊乳中体细胞数从30万个/mL增长至200万个/mL时，其中淋巴细胞的比例下降6.2%，多形核白细胞上升5.1%^[4]。炎症可诱导活化的免疫细胞分泌尿激酶型纤溶酶原激活剂，促进纤溶酶原向纤溶酶的转化，纤溶酶活性增加^[6]。与低体细胞数（<30万个/mL）绵羊乳相比，高体细胞数使得纤溶酶原激活剂和纤溶酶活性显著增加，纤溶酶原活性无显著变化，纤溶酶原/纤溶酶比值下降^[28]。尿激酶型酶原激活剂能够从体细胞上解离下来，并与酪蛋白相结合，而牛乳中的体细胞数、体细胞在牛乳中的时长以及牛乳的热处理等因素，都能影响该解离过程^[9]。

3.2.2 微生物酶

生乳中的嗜冷菌在贮运过程所分泌的蛋白酶具有干扰纤溶酶系统的作用。荧光假单胞杆菌所分泌的胞外蛋白酶会引起纤溶酶从酪蛋白胶束解离到乳清相中，从而影响牛乳产品特性^[32]，其中，荧光假单胞杆菌M3/6的蛋白酶还能激活纤溶酶原激活剂，使得尿激酶型激活剂催化活力增加4倍，纤溶酶原衍生活力（纤溶酶原被激活为纤溶酶后酶活力的增加值）增加2.5倍^[33]。乳房链球菌在感染期间能分泌的PauA和PauB也表现出纤溶酶原激活剂的活性^[34]。由大肠杆菌分泌的大肠杆菌素能够有效抑制丝氨酸蛋白酶的水解作用，其对血液蛋白酶和尿激酶型纤溶酶原激活剂表现出抑制作用^[35]。多黏芽孢杆菌分泌的蛋白酶能够水解纤溶酶原，形成类似纤溶酶的水解活性^[36]。

3.3 加工工艺

如前所述，二硫键在维持纤溶酶、酶原及其激活剂的空间构象和催化活性方面起着重要作用。 β -lg是牛乳乳清蛋白的主要成分，其受热变性后释放游离巯基，通过分子间二硫键交联来抑制纤溶酶活性，而天然的 β -lg对纤溶酶也表现出抑制作用；对 β -lg的游离巯基进行修饰后，其对纤溶酶的抑制作用消失^[6]。在同样的加热条件下，随着体系中 β -lg含量的增加，纤溶酶和纤溶酶原的残留活性逐渐降低^[37]。有研究认为， β -lg通过二硫键交换与纤溶酶原结合形成复合物，降低了酶原与尿激酶型激活剂之间的亲和力，抑制酶原激活过程^[38]。乳清蛋白表现出对纤溶酶原激活剂活性的促进作用，天然、变性的 α -la处理组以及变性 β -lg处理组的酶原激活速率常数分别是对照组的7.07、2.85倍和2.27倍^[39]。总之，乳清蛋白对纤溶酶系的影响与乳清蛋白种类、变性程度和数量有关；

而完整的酪蛋白胶束结构能够发挥位阻效应,保护纤溶酶免受 β -lg的抑制作用^[40]。加工工艺对纤溶酶体系的影响与乳清蛋白和酪蛋白胶束变化均有关系。

3.3.1 热处理

由于纤溶酶系组分的耐热性有所不同,不同加热条件下,最终所表现出的纤溶酶活性会有所不同。巴氏杀菌(75℃、15s)条件下,纤溶酶抑制剂耐热性优于纤溶酶原激活剂抑制因子,两者的失活率分别为35.8%和81.1%^[41]。巴氏杀菌热处理(72~75℃、15s)或直接UHT前的预处理(80~85℃、30s)可灭活牛乳中的纤溶酶原激活剂抑制因子和纤溶酶抑制剂,减少对酶原激活的抑制和纤溶酶的抑制作用,使得牛乳在货架期内的纤溶酶活性上升^[11,41-42]。

相比之下,纤溶酶、酶原及其激活剂的耐热性较高(表3)。生乳中纤溶酶原质量浓度为0.8~2.8 $\mu\text{g/mL}$,是纤溶酶(0.1~0.7 $\mu\text{g/mL}$)的2~30倍^[43]。巴氏杀菌乳中纤溶酶原和纤溶酶的质量浓度分别为0.55~2.75 $\mu\text{g/mL}$ 和0.14~0.73 $\mu\text{g/mL}$ ^[6,44]。生乳中纤溶酶活力为7.4~18.6 U/mL,经过巴氏杀菌后,牛乳中纤溶酶活力下降约25%左右^[25]。纤溶酶的活性在不同的温度区间段表现不同:纤溶酶原的变性温度为50~62℃,此温度区间内加热,部分环饼状结构域展开造成构象改变,暴露出Lys77-Arg78,使得纤溶酶原更容易被激活^[38];纤溶酶从65~70℃开始逐渐灭活;巴氏杀菌加热段区间(75~85℃)纤溶酶及其酶原的失活被纤溶酶原激活所掩盖;在90℃左右,纤溶酶活性迅速降低;而95℃以上时,纤溶酶活性缓慢降低^[11]。温度低于90℃时,酶活性呈现出温度依赖性;温度高于90℃,酶活性与加热维持时间有关^[11]。纤溶酶在90℃上下表现出不同的变化可能涉及不同的灭活机制,这与 β -lg中活性巯基对纤溶酶及其酶原的影响有关^[37]。温度在低于和高于90~95℃各温度段中, β -lg变性的限速反应分别为肽链展开和蛋白聚集^[45],这与纤溶酶活性随温度变化的趋势相印证。与组织型激活剂相比,尿激酶型激活剂的催化活性更高^[46],更耐受热加工,其热稳定性甚至高于纤溶酶和纤溶酶原^[37],75~85℃、15~30s加热条件下,纤溶酶原激活剂失活率在50%~75%之间^[47]。

表3 纤溶酶、纤溶酶原和纤溶酶原激活剂的灭活动力学参数^[37]
Table 3 Inactivation kinetic parameters of plasmin, plasminogen and plasminogen activator^[37]

温度/℃	纤溶酶系统	活化能 E_a (kJ/mol)	D/T (min/℃)	$Z/℃$
60~90	纤溶酶	244	3.1/80	8.5
	纤溶酶原	230	2.7/80	
	纤溶酶原激活剂	241	3.5/80	
95~140	纤溶酶	29	0.2/140	80
	纤溶酶原	35	0.2/140	
	纤溶酶原激活剂	24	0.3/140	

直接式UHT牛乳中,纤溶酶和纤溶酶原的灭活率分别为80%和60%;而间接式UHT工艺中,缓慢的加热和冷却过程导致了较高的纤溶酶及其酶原灭活率,分别为100%和80%^[11]。为了保证货架期内直接UHT产品的稳定性,可以加入UHT前的预热步骤,例如90℃加热180s,这可以导致乳中99.7%纤溶酶灭活^[11]。

3.3.2 高压

当高压加工压力小于300 MPa时,牛乳中纤溶酶活力降低幅度低于10%;但当加工压力为400 MPa时,纤溶酶活力残留70%~75%;加工压力为600 MPa时,纤溶酶残留活力为25%~36%,并且随着加工时间的延长,残留活力会逐渐降低^[48]。室温条件下400 MPa的压力使得纤溶酶原衍生活力降低20%~30%;高压导致酪蛋白胶束崩解,纤溶酶原和纤溶酶均释放到乳清相中,尽管结构破坏的酪蛋白更易被纤溶酶水解,然而释放到乳清相中的纤溶酶也更容易被抑制剂所抑制,因此高压处理并未导致酪蛋白水解程度的增加^[49]。室温下600 MPa高压处理的纤溶酶活性并未降低,而较高温度下的高压处理会促进纤溶酶失活:与室温处理相比,60℃高压加工纤溶酶的失活率达到86.5%^[50]。与 β -lg相比,纤溶酶及其酶原对加工压力的耐受性较高,压力低于600 MPa的加工条件下纤溶酶失活率低于50%,压力低于500 MPa的加工下纤溶酶原失活率低于20%,牛乳中残留的纤溶酶活力和 β -lg含量呈现类似逻辑斯蒂曲线^[51]。

传统的均质加工也能降低纤溶酶活力(降幅达40%~46%)和纤溶酶原衍生活力(降幅达46%~54%):随着均质压力(50~100 MPa)的提高,纤溶酶活性灭活率提高;此外,分段高压均质比单阶段的高压均质灭活率更高^[52]。

3.3.3 膜浓缩

利用超滤膜浓缩牛乳生产乳酪时,天然乳清蛋白被浓缩,纤溶酶活性受到抑制, β -和 α -CN的水解程度降低^[53]。当用渗滤去除乳清蛋白后,纤溶酶的浓缩比显著高于纤溶酶原、酪蛋白或脂肪;渗滤过程中纤溶酶原和纤溶酶抑制剂的浓缩影响了纤溶酶的活性, β -lg和 α -1a浓度下降时,纤溶酶活性增加,纤溶酶活性与 β -lg和 α -1a的浓度间接相关^[54]。

3.4 贮存条件

热处理后纤溶酶原的激活通常发生在货架期内,纤溶酶活力需要3d至数周时间达到最大^[55-56];随着贮存时间的延长,纤溶酶因自水解或活性的不可逆抑制而出现活性下降^[11]。但也有学者报道,直接UHT牛乳在货架期(10~120d)内纤溶酶活性伴随着 α_{s1} -CN含量的下降而增加^[57]。低温贮存时, β -CN和纤溶酶会从酪蛋白胶束中解离出来,纤溶酶的自水解起主导作用,5d内纤溶酶活力下降20%;而37℃贮存时,纤溶酶原的激活作用

在2 d内占主导作用, 4~10 d后纤溶酶活力由于自水解作用而下降65%^[58]。冷藏时温度越低, 酪蛋白胶束中胶体磷酸钙溶解增加, 乳清相中Ca²⁺浓度增加, 纤溶酶原的活化和纤溶酶活性增加, 乳清Ca²⁺有可能通过竞争性抑制机制来影响纤溶酶原激活剂对酶原的亲合力^[59]。

牛乳中外源添加4、8、12 U/L的纤溶酶后, 室温条件下分别贮存5、4、3周时便会出现凝胶, 而在高温贮藏条件下凝胶会提前1~2周出现^[13]。脱脂乳中添加2.5 U/L纤溶酶在37 °C贮存3周后, 出现了链状蛋白团聚和纤维状蛋白桥, 而在23 °C条件下仅出现蛋白颗粒凝集; 当外源纤溶酶添加量增加至15 U/L时, 23 °C贮存3周后出现致密的蛋白网络结构, 当贮存温度升至37 °C时, 蛋白网络结构解体^[18]。

4 纤溶酶活力的检测

纤溶酶的水解活力既可以通过检测蛋白水解度及其水解产物来确定, 也可以直接测定。可以通过检测水解肽段、蛋白条带以及pH 4.6下可溶非蛋白氮或游离氨基酸含量的变化来判定蛋白水解发生程度。有研究比较了三硝基苯磺酸 (trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)、反相高效液相色谱 (reversed phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)、凝胶电泳和荧光胺4种方法检测纤溶酶水解牛乳的灵敏性: TNBS、荧光胺和RP-HPLC等方法对pH 4.6下可溶物和6%三氯乙酸可溶物中的检测结果呈现较高的相关性 ($r > 0.93$), 凝胶电泳适用于定性分析, 荧光胺的检测限最低, RP-HPLC检测灵敏度最高, 从检测准确性、可靠性和便捷程度考虑, 推荐TNBS作为常规实验室检测纤溶酶活力的方法^[60]。高分辨超声光谱也被用于开发检测纤溶酶诱导的 β -CN水解, 非线性反应曲线与经典的逆米氏模型曲线趋于一致, 当底物 β -CN质量浓度在1.0~8.6 mg/mL范围内, 曲线拟合所得的最大反应速率 (V_{\max}) 和米氏常数 (K_m) 分别为 $(6.30 \pm 2.21) \times 10^{-5} \text{ mol}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ 和 $(10.33 \pm 3.50) \text{ mg}/\text{mL}$; 当 β -CN质量浓度为1 mg/mL时, 最大断裂肽键数为5~6 (水解度2.7%)^[61]。纤溶酶原的检测方法与纤溶酶相一致, 先检测样品中纤溶酶活力, 然后向样品中加入酶原激活剂进行孵育, 孵育后再次进行纤溶酶活力检测, 两次纤溶酶活力检测值之差即为纤溶酶原衍生活力^[6]。有研究将夹心酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 应用于乳中纤溶酶及其酶原的检测, 方法的线性范围低至5~75 ng/mL, 变异系数为5%~8%, 不需要预处理即可检测, 且与其他乳蛋白不存在交叉反应, 但由于酪蛋白的干扰作用, 检测准确率较低 (60%~90%)^[62]。为避免酪蛋白的干扰, 可以用柠檬酸钠或 ϵ -氨基己酸将纤溶酶

解离到乳清中进行测定; 为避免乳清中纤溶酶抑制剂对纤溶酶活力检测的影响, 可以用超速离心将酪蛋白和乳清蛋白分离后再检测^[6]。表4列出最近关于纤溶酶检测生物传感器的报道, 均是基于纤溶酶对底物的特异性剪切, 通过引起光、电、机械振动或表面张力等信号的变化进行检测, 检测限可以达到0.032~0.860 nmol/L。

表4 检测牛乳纤溶酶含量的生物传感器研究汇总
Table 4 Summary of biosensors for milk plasmin detection

方法原理	方法性能	参考文献
纤溶酶识别元件上的特异性底物, 酶促反应生成的肽段导致压电晶体的共振频率增加	线性范围1~20 nmol/L, 检测限为0.65 nmol/L, 平均回收率 (63.0±0.6) %	[63]
纤溶酶特异水解有Lys-Thr-Phe-Lys序列和Cys残基的二茂铁肽底物 (ferrocenyl peptide substrate, FcPS), 监测FcPS氧化还原信号, 电化学信号随着纤溶酶添加量的增加成比例地降低	检出限为50 ng/mL或15 mU/mL, 还可以实时检测纤溶酶反应的动力学参数	[64]
该生物传感器基于对纤溶酶敏感的二茂铁修饰肽 (ferrocene-modified peptide, Fc-P) 开发而成。Fc-P底物被纤溶酶酶切并释放含有Fc肽的短片段, 导致循环伏安法测定的氧化还原电流降低	线性范围1~20 nmol/L, 检出限为 (0.56±0.03) nmol/L	[65]
涂有亲水性SiO ₂ 的石英晶体微量天平装配有 α -、 β -和 κ -CN涂层, 蛋白酶水解底物时传感器的测定频率发生变化	纤溶酶的检出限为0.5 nmol/L, 能够在反应2 min后区分纤溶酶和其他蛋白酶	[66]
该生物传感器包含一个纤溶酶特异性肽靶序列, 其两侧是生物发光共振能量转移 (bioluminescence resonance energy transfer, BRET) 转导元件—N端的绿色荧光蛋白和C端的变体海肾荧光素酶, 当纤溶酶作用于传感器时出现光学信号变化	牛纤溶酶检测限为0.86 nmol/L, 线性范围1.19~29.92 nmol/L, 检测时间为10 min	[67]
电磁声学传感器的石英盘疏水表面涂有 β -CN作为底物, 传感器将 β -CN的水解程度转变为音频作为信号输出	线性范围为32 pmol/L~10 nmol/L, 检测限达到32 pmol/L	[68]
与磁性纳米粒子耦合的纤溶酶底物在金传感器表面形成黑色自组装单层。在纤溶酶水平升高的情况下, 底物被切割, 附着在磁珠上的肽片段将被传感器条下方的磁铁吸引, 从而显示出金色的表面	线性范围0.1~1 000.0 ng/mL, 检出限1 ng/mL	[69]
纤溶酶剪切传感器晶体表面 β -CN释放短肽, 黏度降低, 导致串联共振频率增加, 运动阻力降低	检测范围0.1~40.0 nmol/L, 检出限 (167.16±39.36) pmol/L	[70]
纤溶酶水解空气/溶液界面的 β -CN, 引起界面张力的变化	线性范围0.33~13.30 nmol/L, 检测限为0.7 nmol/L	[71]

5 结语

纤溶酶是牛乳中最主要的内源蛋白酶, 其对液体乳产品质量有着重要的影响。巴氏杀菌乳在低温下冷藏且销售周期短, 间接UHT产品中纤溶酶灭活程度较高, 两类产品出现纤溶酶诱导的老化凝胶风险较低; 而直接UHT产品中蛋白变性程度较低, 纤溶酶残留活性较高。随着消费者对乳中活性物质关注度的上升, 活性蛋白保留成为了乳品工艺改良的新方向。乳清蛋白和美拉德反应对纤溶酶活性具有抑制作用, 因此, 如何在最大程度保留活性蛋白和减少美拉德反应的同时, 抑制纤溶酶的水解作用, 成为了乳品加工工艺优化, 特别是直接UHT工艺改良的重要课题。目前纤溶酶的检测方法主要在实验室研究阶段, 生物传感器等快速检测方法离商业应用尚有一段距离, 开发纤溶酶的快速检测方法对于产品的线下检测和快速诊断有着重要的意义。因此,

针对纤溶酶的灭活工艺优化和快速检测应该成为乳业研究的重要课题,而纤溶酶的调控和作用机制也需进一步明确,为保证牛乳产品质量夯实理论基础。

参考文献:

- [1] 中国营养学会. 中国居民膳食指南(2022)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2022: 47-74.
- [2] 范煜桢, 赵艾, 张玉梅, 等. 中国八城市人群乳制品摄入状况及其影响因素分析[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(9): 52-56. DOI:10.19870/j.cnki.11-3716/ts.20210312.001.
- [3] 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. DOI:10.1111/j.1541-4337.2011.00157.x.
- [4] 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. DOI:10.1017/S0022029911000525.
- [5] ISMAIL B, NIELSEN S. Enzymes indigenous to milk: plasmin system in milk[M]// FUQUAY G. Encyclopedia of dairy sciences. 2nd ed. Oxford: Elsevier Inc., 2011: 308-313.
- [6] LARSEN L B, KELLY A L. Agents of change, enzymes in milk and dairy products[M]. Switzerland: Springer, 2021: 11-55.
- [7] AISINA R, MUKHAMETOVA L. Structure and function of plasminogen/plasmin system[J]. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2014, 40(6): 590-605. DOI:10.1134/S1068162014060028.
- [8] TELLGREN-ROTH Å, DITTMAR K, MASSEY S E, et al. Keeping the blood flowing: plasminogen activator genes and feeding behavior in vampire bats[J]. Naturwissenschaften, 2009, 96(1): 39-47. DOI:10.1007/s00114-008-0446-0.
- [9] ISMAIL B, NIELSEN S. Invited review: plasmin protease in milk: current knowledge and relevance to dairy industry[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(11): 4999-5009. DOI:10.3168/jds.2010-3122.
- [10] DEETH H C, LEWIS M J. High temperature processing of milk and milk products[M]. UK: John Wiley & Sons, 2017: 284-289.
- [11] 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. DOI:10.1016/j.idairyj.2016.06.009.
- [12] DATTA N, DEETH H. Age gelation of UHT milk: a review[J]. Food and Bioproducts Processing, 2001, 79(4): 197-210. DOI:10.1205/096030801753252261.
- [13] ZHANG C, BIJL E, HETTINGA K. Destabilization of UHT milk by protease AprX from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin[J]. Food Chemistry, 2018, 263: 127-134. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.04.128.
- [14] 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. DOI:10.1111/1541-4337.12407.
- [15] BHATT H, CUCHEVAL A, COKER C, et al. Effect of lactosylation on plasmin-induced hydrolysis of β -casein[J]. International Dairy Journal, 2014, 38(2): 213-218. DOI:10.1016/j.idairyj.2014.01.017.
- [16] BHATT H, CUCHEVAL A, COKER C, et al. Effect of micellar structure of casein and its modification on plasmin-induced hydrolysis[J]. International Dairy Journal, 2017, 75: 75-82. DOI:10.1016/j.idairyj.2017.07.009.
- [17] RAUH V M, JOHANSEN L B, IPSEN R, 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. DOI:10.1021/jf502088u.
- [18] YUN S Y, IMM J Y. 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. DOI:10.3390/molecules26082339.
- [19] ZHANG C, 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. DOI:10.3168/jds.2019-17150.
- [20] ŞİMŞEK B, GÜN İ, EKINCI M B. Effects of plasmin and plasminogen on textural biochemical and microbiological properties of clotted cream[J]. Journal of Food Safety, 2018, 38(6): e12554. DOI:10.1111/jfs.12554.
- [21] RAUH V M, SUNDGREN A, BAKMAN M, et al. Plasmin activity as a possible cause for age gelation in UHT milk produced by direct steam infusion[J]. International Dairy Journal, 2014, 38(2): 199-207. DOI:10.1016/j.idairyj.2013.12.007.
- [22] HAMED H, TRUJILLO A J, JUAN B, et al. Interrelationships between somatic cell counts, lactation stage and lactation number and their influence on plasmin activity and protein fraction distribution in dromedary (*Camelus dromedaries*) and cow milks[J]. Small Ruminant Research, 2012, 105(1/2/3): 300-307. DOI:10.1016/j.smallrumres.2012.01.002.
- [23] LEITE J A, MONTOYA C A, LOVEDAY S M, et al. Heat-treatments affect protease activities and peptide profiles of ruminants' milk[J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 67-76. DOI:10.3389/fnut.2021.626475.
- [24] BLÄNNING C, SANDELIUS S. Buffalo milk: influence of the first stage of lactation on plasmin system and free fatty acid of buffalo milk[D]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2015: 22-36.
- [25] 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. DOI:10.3969/j.issn.1002-6819.2014.13.035.
- [26] KHALED J. Plasmin and plasminogen variation in bovine raw milk[D]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2019: 12-27.
- [27] SHISHANTHI J. Plasmin, plasminogen, protein and somatic cells variation of bulk milk[D]. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2017: 23-41.
- [28] KOUTSOULI P, PATOUNAS G, MASSOURAS T, et al. Plasmin-plasminogen system and milk coagulation properties of two Greek dairy sheep breeds[J]. Small Ruminant Research, 2015, 124: 89-94. DOI:10.1016/j.smallrumres.2015.01.015.
- [29] ALBENZIO M, CAROPRESE M, SANTILLO A, et al. Effects of somatic cell count and stage of lactation on the plasmin activity and cheese-making properties of ewe milk[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(3): 533-542. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(04)73194-X.
- [30] CABALLERO-VILLALOBOS J, GARZÓN A, MARÍN A M, 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. DOI:10.1016/j.smallrumres.2017.10.005.
- [31] RAINARD P, FOUCRAS G, BOICHARD D, et al. Invited review: low milk somatic cell count and susceptibility to mastitis[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(8): 6703-6714. DOI:10.3168/jds.2018-14593.

- [32] FAJARDO-LIRA C, ORIA M, HAYES K D, et al. Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83(10): 2190-2199. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(00)75102-2.
- [33] FROHBIETER K A, ISMAIL B, NIELSEN S S, et al. Effects of *Pseudomonas fluorescens* M3/6 bacterial protease on plasmin system and plasminogen activation[J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(10): 3392-3401. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(05)73023-X.
- [34] WARD P N, LEIGH J A. Characterization of PauB, a novel broad-spectrum plasminogen activator from *Streptococcus uberis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(1): 119-125. DOI:10.1128/JB.184.1.119-125.2002.
- [35] EGGERS C T, MURRAY I A, DELMAR V A, et al. The periplasmic serine protease inhibitor ecotin protects bacteria against neutrophil elastase[J]. *Biochemical Journal*, 2004, 379(1): 107-118. DOI:10.1042/bj20031790.
- [36] LARSON N K, ISMAIL B, NIELSEN S S, et al. Activity of *Bacillus polymyxa* protease on components of the plasmin system in milk[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(6): 586-592. DOI:10.1016/j.idairyj.2005.09.020.
- [37] DENIS T S, HUMBERT G, GAILLARD J L. Heat inactivation of native plasmin, plasminogen and plasminogen activators in bovine milk: a revisited study[J]. *Le Lait*, 2001, 81(6): 715-729. DOI:10.1051/lait:2001159.
- [38] BURBRINK C, HAYES K. Effect of thermal treatment on the activation of bovine plasminogen[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(6): 580-585. DOI:10.1016/j.idairyj.2005.08.017.
- [39] RIPPEL K, NIELSEN S, HAYES K. Effects of native and denatured whey proteins on plasminogen activator activity[J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(8): 2344-2350. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(04)73356-1.
- [40] RAUH V M. Impact of plasmin activity on the shelf life and stability of UHT milk[D]. Aarhus: Aarhus University, 2014: 43-49.
- [41] 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. DOI:10.1016/j.idairyj.2005.09.018.
- [42] NEWSTEAD D F, PATERSON G, ANEMA S G, 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. DOI:10.1016/j.idairyj.2005.11.011.
- [43] OZEN B F, HAYES K D, MAUER L J. Measurement of plasminogen concentration and differentiation of plasmin and plasminogen using Fourier-transform infrared spectroscopy[J]. *International Dairy Journal*, 2003, 13(6): 441-446. DOI:10.1016/S0958-6946(03)00055-4.
- [44] RICHARDSON B, ELSTON P. Plasmin activity in commercial caseins and caseinates[J]. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 1984, 19: 63-67.
- [45] TOLKACH A, KULOZIK U. Reaction kinetic pathway of reversible and irreversible thermal denaturation of β -lactoglobulin[J]. *Le Lait*, 2007, 87(4/5): 301-315. DOI:10.1051/lait:2007012.
- [46] ISMAIL B, CHOI L, WERE L M, et al. Activity and nature of plasminogen activators associated with the casein micelle[J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(9): 3285-3295. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(06)72365-7.
- [47] PRADO B, ISMAIL B, RAMOS O, et al. Thermal stability of plasminogen activators and plasminogen activation in heated milk[J]. *International Dairy Journal*, 2007, 17(9): 1028-1033. DOI:10.1016/j.idairyj.2007.02.001.
- [48] HUPPERTZ T, FOX P F, KELLY A L. Plasmin activity and proteolysis in high pressure-treated bovine milk[J]. *Le Lait*, 2004, 84(3): 297-304. DOI:10.1051/lait:2004003.
- [49] GARCIA-RISCO M, RECIO I, MOLINA E, et al. Plasmin activity in pressurized milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(3): 728-734. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(03)73653-4.
- [50] GARÍA-RISCO M, OLANO A, RAMOS M, et al. Micellar changes induced by high pressure. Influence in the proteolytic activity and organoleptic properties of milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83(10): 2184-2189. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(00)75101-0.
- [51] SCOLLARD P G, BERESFORD T P, NEEDS E C, et al. Plasmin activity, β -lactoglobulin denaturation and proteolysis in high pressure treated milk[J]. *International Dairy Journal*, 2000, 10(12): 835-841. DOI:10.1016/S0958-6946(01)00028-0.
- [52] HAYES M G, KELLY A L. High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity[J]. *Journal of Dairy Research*, 2003, 70(3): 307-313. DOI:10.1017/S0022029903006319.
- [53] BENFELDT C. Ultrafiltration of cheese milk: effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(6): 600-608. DOI:10.1016/j.idairyj.2005.10.016.
- [54] AALTONEN T, OLLIKAINEN P. Effect of microfiltration of milk on plasmin activity[J]. *International Dairy Journal*, 2011, 21(4): 193-197. DOI:10.1016/j.idairyj.2010.12.002.
- [55] GAZI I, VILALVA I C, HUPPERTZ T. Plasmin activity and proteolysis in milk protein ingredients[J]. *International Dairy Journal*, 2014, 38(2): 208-212. DOI:10.1016/j.idairyj.2013.11.012.
- [56] LU R, STEVENSON C D, GUCK S E, et al. Effect of various heat treatments on plasminogen activation in bovine milk during refrigerated storage[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2009, 44(4): 681-687. DOI:10.1111/j.1365-2621.2008.01808.x.
- [57] CORASSIN C H, ROSIM R E, KOBASHIGAWA E, et al. Relationship between plasmin activity and casein fractions during storage of UHT milk[J]. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2013, 16: 29-33. DOI:10.1590/S1981-67232013005000008.
- [58] CRUDDEN A, FOX F, KELLY A L. Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk[J]. *International Dairy Journal*, 2005, 15(4): 305-313. DOI:10.1016/j.idairyj.2004.08.008.
- [59] SCHROEDER D, NIELSEN S, HAYES K. The effect of raw milk storage temperature on plasmin activity and plasminogen activation in pasteurized milk[J]. *International Dairy Journal*, 2008, 18(2): 114-119. DOI:10.1016/j.idairyj.2007.08.003.
- [60] CHOVE L M, GRANDISON A S, LEWIS M J. Comparison of methods for analysis of proteolysis by plasmin in milk[J].

- Journal of Dairy Research, 2011, 78(2): 184-190. DOI:10.1017/S0022029911000094.
- [61] DIZON M, TATARKO M, SZABO K, et al. Application of high-resolution ultrasonic spectroscopy for detection of the plasmin activity toward β -casein[J]. Food Chemistry, 2021, 353: 129373. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129373.
- [62] DUPONT D, BAILLY C, GROSCLAUDE J, et al. Differential titration of plasmin and plasminogen in milk using sandwich ELISA with monoclonal antibodies[J]. Journal of Dairy Research, 1997, 64(1): 77-86. DOI:10.1017/S0022029996001938.
- [63] POTURNAYOVA A, KARPISOVA I, CASTILLO G, et al. Detection of plasmin based on specific peptide substrate using acoustic transducer[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 223: 591-598. DOI:10.1016/j.snb.2015.09.143.
- [64] OHTSUKA K, MAEKAWA I, WAKI M, et al. Electrochemical assay of plasmin activity and its kinetic analysis[J]. Analytical Biochemistry, 2009, 385(2): 293-299. DOI:10.1016/j.ab.2008.11.006.
- [65] CASTILLO G, PRIBRANSKY K, MEZŐ G, et al. Electrochemical and photometric detection of plasmin by specific peptide substrate[J]. Electroanalysis, 2015, 27(3): 789-798. DOI:10.1002/elan.201400622.
- [66] TATARKO M, MUCKLEY E S, SUBJAKOVA V, et al. Machine learning enabled acoustic detection of sub-nanomolar concentration of trypsin and plasmin in solution[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 272: 282-288. DOI:10.1016/j.snb.2018.05.100.
- [67] 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. DOI:10.1016/j.snb.2019.127141.
- [68] ROMÁNSZKI L, TATARKO M, JIAO M, et al. Casein probe-based fast plasmin determination in the picomolar range by an ultrahigh frequency acoustic wave biosensor[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 275: 206-214. DOI:10.1016/j.snb.2018.08.025.
- [69] CHINNAPPAN R, AL ATTAS S, KAMAN W E, et al. Development of magnetic nanoparticle based calorimetric assay for the detection of bovine mastitis in cow milk[J]. Analytical Biochemistry, 2017, 523: 58-64. DOI:10.1016/j.ab.2017.02.009.
- [70] POTURNAYOVA A, SZABO K, TATARKO M, et al. Determination of plasmin in milk using QCM and ELISA methods[J]. Food Control, 2021, 123: 107774. DOI:10.1016/j.foodcont.2020.107774.
- [71] ROMÁNSZKI L, HIANIK T, KERESZTES Z. Plasmin determination based on enzymatic digestion of a β -casein layer at the air/water interface[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2021, 609: 125786. DOI:10.1016/j.colsurfa.2020.125786.