

嗜冷菌耐热蛋白酶 AprX 对乳制品的危害与控制

王 宇, 韩 雪*

(哈尔滨工业大学化工与化学学院 哈尔滨 150001)

摘要 嗜冷菌分泌的耐热蛋白酶能够降低乳制品品质而受到广泛关注。嗜冷菌分泌的蛋白酶具有耐热性,能够在超高温瞬时灭菌处理后仍保持部分活性。原料乳中常见的外源耐热蛋白酶是假单胞菌分泌的胞外蛋白酶 AprX,全面了解蛋白酶 AprX 的生物学特性、蛋白水解潜力和调控途径,有助于寻找抑制嗜冷菌蛋白酶的方法。本文概述蛋白酶 AprX 的最新研究进展和控制手段,为蛋白酶 AprX 的控制提供新思路。

关键词 嗜冷菌; 蛋白酶 AprX; 腐败潜力; 控制策略

文章编号 1009-7848(2024)07-0425-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.07.041

为满足人们日益增长的消费需求,提高食品质量,减少食物浪费成为全球可持续发展的重要一环^[1-2]。食品中的微生物污染是造成食品浪费的重要原因,原料乳营养成分丰富,水分含量高,一旦受到外源微生物的污染,会造成微生物快速生长繁殖,从而降低原料乳的品质^[3]。低温贮藏技术能够有效抑制微生物的生长,提高原料乳的品质^[4]。在原料乳的低温贮藏过程中,一类能够在低温条件下生长的嗜冷菌,主要是假单胞菌,逐渐成为原料乳中的优势菌株^[5]。

为保障乳制品品质并延长其货架期,高温杀菌技术被用来杀灭原料乳中的微生物,包括嗜冷菌在内的绝大多数微生物,均能在高温灭菌过程中被灭活^[6]。然而,由嗜冷菌分泌的胞外耐热蛋白酶能够在加热灭菌后残存部分活性,继续分解乳蛋白,成为危害乳制品品质的重要因素^[7]。1998 年,Liao 等^[8]首次表征了荧光假单胞菌分泌的胞外耐热蛋白酶 AprX,从此蛋白酶 AprX 成为原料乳中外源耐热蛋白酶的研究热点。蛋白酶 AprX 是一种具有较强耐热性的碱性金属蛋白酶,对酪蛋白中的 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白具有较强的水解作用,能够抵抗原料乳的热处理过程。图 1 为原料乳被嗜冷菌污染的过程,来源于环境和设备的嗜冷菌

污染原料乳后,能在冷藏条件下繁殖,同时分泌耐热蛋白酶 AprX,蛋白酶 AprX 能够在热处理后保留部分活性,在乳制品的保藏期内继续水解乳蛋白,使得乳制品出现凝胶、沉淀、苦味等问题,缩短乳制品的货架期^[9-10]。

蛋白酶 AprX 是假单胞菌在生长过程中分泌的胞外蛋白酶,抑制嗜冷菌的生长和减少嗜冷菌分泌蛋白酶是控制蛋白酶 AprX 危害乳制品的两种重要手段^[13-14]。改善牧场和挤奶环境,控制原料乳贮存温度等物理方法,以及通过天然活性成分来抑制嗜冷菌的生长和蛋白酶分泌等生物方法都被用来控制蛋白酶 AprX 的危害^[15]。本文概述蛋白酶 AprX 的生物学特性,其对乳制品的危害和控制,以期提高乳制品的品质,减少乳资源的浪费。

1 蛋白酶 AprX 的合成和调控

蛋白酶 AprX 的生物学特性是由其相关基因的表达和调控决定的,了解 AprX 的合成和调控途径,有利于有针对性的提出控制措施。

1.1 蛋白酶 AprX 的合成

蛋白酶 AprX 是由 *aprX* 基因编码,Woods 等^[12]于 2001 年发现了 *aprX-lipA* 操纵子 (*aprX-inh-aprDEF-prtAB-lipA*),如图 2 所示。*aprX* 基因位于操纵子的 5' 端。其中,*inh* 基因编码蛋白酶抑制剂;*aprDEF* 基因编码分泌系统,包括 ABC 转运蛋白 (AprD)、膜融合蛋白 (AprE) 和外膜蛋白 (AprF);*prtAB* 基因编码丝氨酸蛋白酶同系物;*lipA* 基因编码脂肪酶^[16]。Wang 等^[17]在探究 *aprD* 基

收稿日期: 2023-07-22

基金项目: 黑龙江省高校协同创新成果项目 (LJGXCG2023-048)

第一作者: 王宇,男,博士生

通信作者: 韩雪 E-mail: xhan@hit.edu.cn

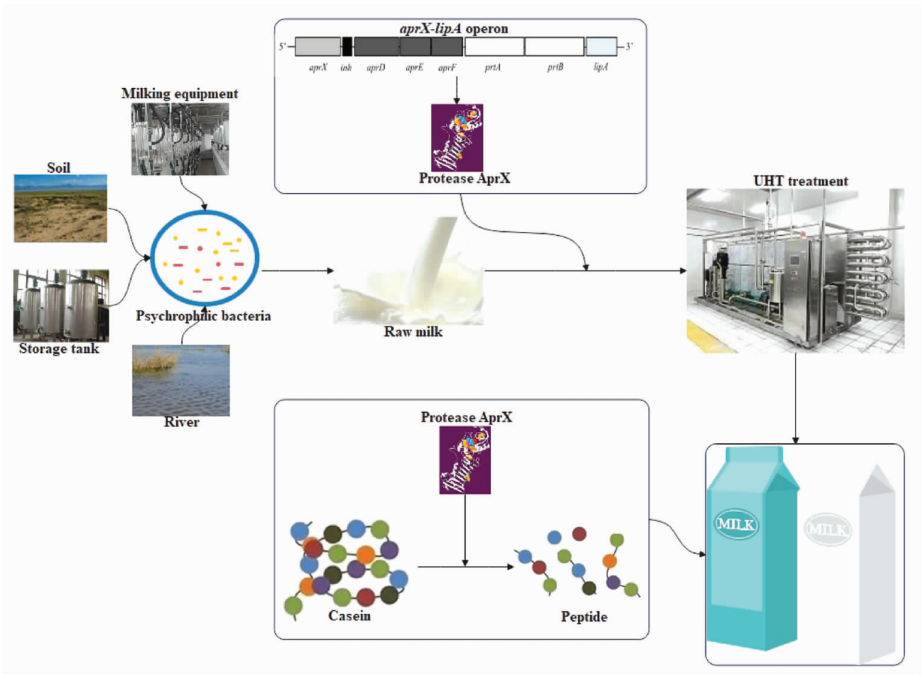
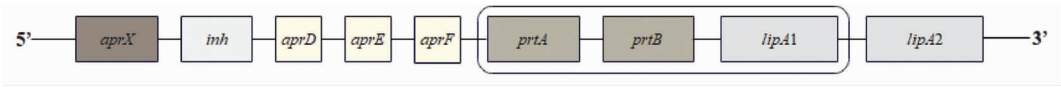


图 1 原料乳被嗜冷菌污染的过程^[11-12]

Fig.1 Contamination process of psychrophilic bacteria in raw milk^[11-12]

因缺陷莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)菌株的腐败能力时发现,与野生型相比,*aprD* 基因缺陷的菌株的胞外蛋白酶活力显著降低,这可能是由于*aprD* 基因的缺失影响了蛋白酶 AprX 的分泌。



注:方框表示部分菌株的操纵子缺乏框内的部分或全部基因。

图 2 *aprX-lipA* 操纵子结构^[12,18]

Fig.2 Structure of the *aprX-lipA* operon^[12,18]

不同嗜冷菌假单胞菌的 *aprX-lipA* 操作子的结构略有不同,部分菌株的操纵子缺失或部分缺失 *partAB* 和 *lipA2* 基因^[19]。*aprX-lipA* 操纵子的遗传特异性影响嗜冷假单胞菌的蛋白水解能力, Maier 等^[18]发现含有 I 型操纵子(含有操纵子内的 9 个全部基因)的嗜冷假单胞菌表现出高蛋白水解活性,而含有 II 型操纵子(操纵子内缺乏 *prtAB* 基因)的嗜冷假单胞菌表现出低蛋白水解活性, *prtAB* 基因可能在蛋白酶 AprX 的合成和修饰过程中起到重要作用, *prtAB* 基因也有望成为蛋白酶 AprX 的控制靶点。

1.2 影响蛋白酶 AprX 合成的因素

蛋白酶 AprX 是假单胞菌在生长过程中分泌

到细胞外,将环境中的蛋白质进行分解以维持自身的生长, AprX 的合成受到环境因素和营养条件的影响。

1.2.1 温度 温度除了能影响嗜冷假单胞菌的生长以外,还能影响蛋白酶 AprX 的分泌,嗜冷菌产胞外蛋白酶具有温度依赖性^[12,20]。尽管嗜冷假单胞菌能够在低温条件下生长,在低温甚至冷藏条件下,嗜冷假单胞菌的生长速度也会受到抑制。Alves 等^[21]研究发现荧光假单胞菌 07A 在冷藏温度下,培养 12 h 后,菌株数量较 25 ℃时有明显的降低,且仍处于迟缓期,此时胞外蛋白酶活力较低,然而蛋白酶的表达水平却高于对数时期的水平。在嗜冷菌生长的稳定期之前,菌株的数量和胞

外蛋白酶的活力表现出正相关,随着菌株的生长对蛋白质类营养需求的增加,相应的胞外蛋白酶活力逐渐增强,以满足细菌自身的生长^[22]。然而在冷藏条件下,假单胞菌分泌的胞外蛋白酶受温度影响催化能力下降,菌株则通过加速蛋白酶表达来补偿由温度降低造成的酶催化能力的下降^[23]。为此,需要平衡嗜冷假单胞菌生长和蛋白酶分泌的关系,在现有条件下调节原料乳的运输和贮藏温度,来最大限度减少蛋白酶 AprX 的危害。

1.2.2 营养成分 蛋白酶 AprX 是嗜冷假单胞菌摄取营养物质用于自身生长的胞外蛋白酶,其合成和分泌受到营养成分调控。嗜冷假单胞菌作为需氧菌,柠檬酸循环是维持其正常生长的重要过程。Fairbairn 等^[24]发现柠檬酸盐是荧光假单胞菌 NCDO 2085 容易利用的能源,然而其对蛋白酶的产生具有很强的抑制作用。柠檬酸对已经形成的蛋白酶活性没有影响,这表明柠檬酸的抑制作用不是由于其螯合性质。Jaspe 等^[25]发现荧光假单胞菌 NCDO 2085 胞外蛋白酶的产生,发生在牛乳中谷氨酸、谷氨酰胺、半乳糖、乳酸和葡萄糖消耗殆尽之后,当补充这些成分后,蛋白酶的产生在不同程度上降低,表明胞外蛋白酶的产生是菌体用来弥补容易利用的能源的一种损耗。假单胞菌对碳源的摄取可能是其分泌蛋白酶 AprX 的关键^[7]。假单胞菌可利用碳源的消耗使菌体内柠檬酸的含量下降,刺激蛋白酶 AprX 的产生,用以将蛋白质分解成氨基酸补充碳源(图 3)。综上,蛋白酶 AprX 是假单胞菌合成用来弥补碳源的消耗,而不是氮源的消耗。

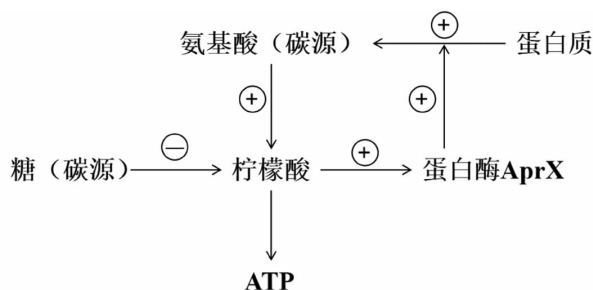


图 3 蛋白酶 AprX 受柠檬酸调控图

Fig.3 The protease AprX is regulated by citrate

有证据表明,原料乳能够促进假单胞菌分泌蛋白酶 AprX,可能是由于假单胞菌对乳糖的利用

率较低,当原料乳中的可利用碳源消耗,菌体开始分泌蛋白酶 AprX^[25]。Zhang 等^[26]发现乳脂肪能够促进假单胞菌分泌胞外蛋白酶的活力,可能是由于脂肪促进了 *lipA* 基因的表达,进而促进了同一操纵子上 *aprX* 基因的表达。Wang 等^[27]发现乳清蛋白能够促进荧光假单胞菌 W3 蛋白酶 AprX 的表达,这可能是蛋白酶 AprX 对乳清蛋白的水解能力较差所致,乳清蛋白不能够被蛋白酶 AprX 水解成可利用的碳源。营养成分对蛋白酶产生的影响为研究人员对蛋白酶 AprX 的调控提供了新的视角,补充合适的碳源有望成为控制蛋白酶 AprX 的新方法。然而,碳源对嗜冷假单胞菌的生长也不容忽视,Jaspe 等^[25]发现补充葡萄糖、乳酸等碳源,并没有显著影响荧光假单胞菌 NCDO 2085 的生长。未来,筛选适合乳基质、对蛋白酶 AprX 的产生具有明显抑制作用,且不促进嗜冷菌生长的合适碳源,具有重要意义。

1.2.3 群体感应 环境中的嗜冷假单胞菌侵染原料乳后,快速繁殖,在生长过程中,会向原料乳中分泌包括蛋白酶 AprX 在内的对乳制品造成潜在危害的代谢产物,而这些产物的合成和分泌均受到群体感应(Quorum sensing, QS)的调控^[28]。假单胞菌最常见的群体感应是由酰基高丝氨酸内酯类信号分子(Acyl-homoserine lactone, AHL)调控的 LuxI/R 型 QS 系统^[29]。假单胞菌已被报道能够产生多种 AHL 信号分子,包括 C4-HSL、3OC8-HSL^[30]、C10-HSL、C6-HSL^[31]、3-oxo-C6-HSL 和 3-oxo-C8-HSL^[32]等。如图 4 所示,AHLs 由 LuxI 型合酶合成,在细菌的生长过程中产生并通过细胞膜上的 ABC 转运系统(ATP binding cassette)运输到胞外^[33]。当 AHLs 含量积累到一定的阈值后,可激活 LuxR 蛋白并调控相关基因的表达,进而调控假单胞菌胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS)、生物膜、胞外蛋白酶以及色素的合成,危害乳制品的品质^[34]。

QS 系统被认为是调控假单胞菌生物膜形成的重要途径,近些年,发现 QS 系统对假单胞菌胞外酶的分泌也具有调控作用^[30,35]。Liu 等^[36]发现当荧光假单胞菌 AHLs 的产生降低后,菌株的胞外蛋白酶活力降低。Yuan 等^[37]发现 C8-HSL 能够加速被产氮假单胞菌污染的乳制品的腐败,在对菌株进行 RNA 测序发现 C8-HSL 能够促进蛋白酶

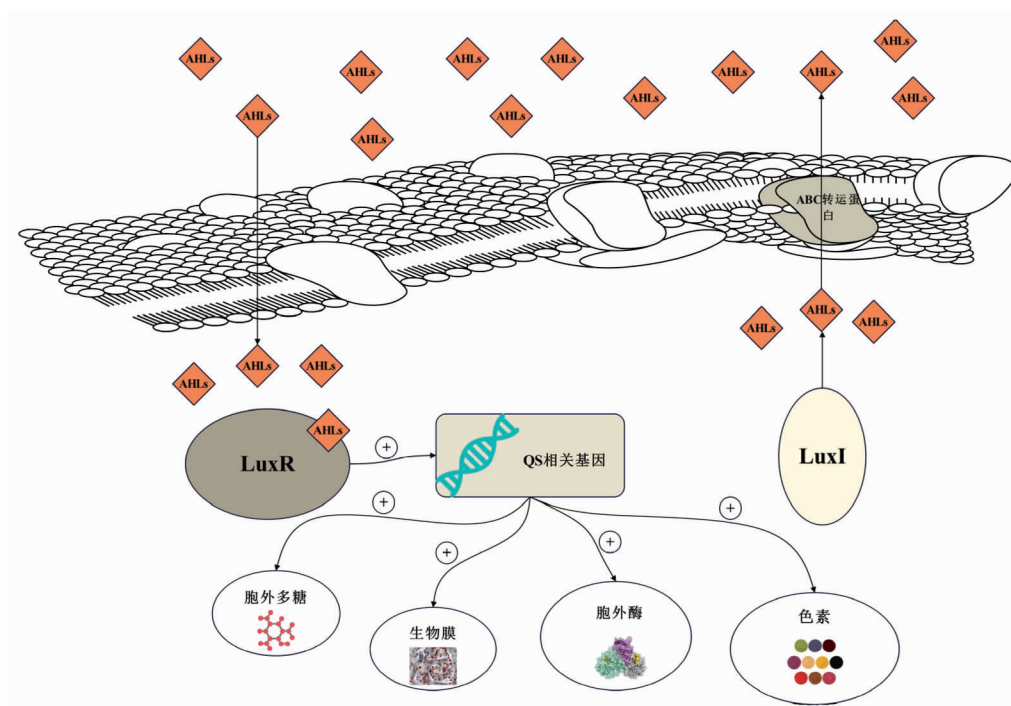


图4 假单胞菌 LuxI/R 型 QS 系统

Fig.4 LuxI/R type QS system of *Pseudomonas*

相关基因 (*prtA1*, *XJ20_11680*, *XJ20_24505*) 的表达上调,其中 *prtA1* 基因是合成蛋白酶 AprX 的关键基因^[18]。Liu 等^[30]发现由荧光假单胞菌 395 产生的 C4-HSL 和 3OC8-HSL 能够在转录水平上调节蛋白酶基因,AHLs 信号分子参与了 *aprX* 启动子的控制,群体感应通过调控 *aprX* 启动子活性来调控蛋白酶 AprX 的产生。群体感应对蛋白酶 AprX 调控的重要性,使得研究人员可以尝试通过对群体感应进行干预,来达到调控蛋白酶 AprX 的效果,筛选群体感应抑制剂有望成为控制嗜冷菌蛋白酶的重要防腐剂。

2 蛋白酶 AprX 的生物学特性

蛋白酶 AprX 是假单胞菌分泌的一种典型的耐热蛋白酶,来源于不同种属的蛋白酶 AprX 在生物学特性上存在差异,对不同来源 AprX 的生物学特性进行总结有利于增强对该酶的认识。

2.1 影响蛋白酶 AprX 活性的因素

蛋白酶的活性受到多种因素影响,其中温度、pH、金属离子和抑制剂是影响蛋白酶活性的重要因素。

2.1.1 温度和 pH 值 温度是影响酶促反应的一个重要因素,蛋白酶 AprX 的最适催化温度一般在 30~40 ℃ 之间,最适 pH 值一般在 6~9 之间^[38]。表 1 总结了近年来报道的 AprX 的最适温度和 pH 值等生物学特性。蛋白酶 AprX 在常规乳制品的 pH 值和保藏温度条件下,具有一定酶活,这意味着 AprX 对不同种乳制品均有一定程度的危害。

2.1.2 金属离子和抑制剂 尽管金属离子对蛋白酶 AprX 的活性的影响具有差异性,整体上 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 被认为是蛋白酶 AprX 的促进剂。蛋白酶 AprX 是一种 Zn^{2+} 依赖蛋白, Zn^{2+} 是蛋白酶 AprX 活性中心的重要组成部分,因而 Zn^{2+} 可以促进蛋白酶 AprX 的活力, Ca^{2+} 可以通过调节钙结合结构域来提高蛋白酶活力^[39],而 Mn^{2+} 能够与 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 竞争酶的活性位点,从而为酶提供更大的催化能力^[40]。乳中含有丰富的 Ca^{2+} ,这也在一定程度上加速了蛋白酶 AprX 的污染作用,吕高婧^[41]发现荧光假单胞菌分泌的胞外蛋白酶对高钙奶的腐败作用要强于纯牛乳。

EDTA(二价金属螯合剂)、EGTA(钙离子螯合剂)和 1,10-邻菲咯啉(锌离子螯合剂)被认为是

蛋白酶 AprX 的有效抑制剂。3 种金属离子的螯合剂对蛋白酶 AprX 活性的抑制作用也说明了二价金属阳离子 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 是维持蛋白酶 AprX 活性必不可少的成分^[42]。

2.2 蛋白酶 AprX 的热稳定性

蛋白酶 AprX 的耐热性是其危害乳制品品质的关键因素。大量研究证明蛋白酶 AprX 具有耐热性,如表 1 所示。原料乳中丰富的蛋白质和脂肪也在一定程度上增加了蛋白酶 AprX 的耐热性,使其尽管经受 UHT 高温处理后,还能残存部分活性^[51]。Schokker 等^[52]认为酪蛋白通过与蛋白酶结合并且能够抑制蛋白酶的水解来增强蛋白酶的耐热性。蛋白酶 AprX 的强耐热性来源于其灵活的三级结构,当加热后温度降低时,已经展开的蛋白酶 AprX 能够准确有序的重新折叠,形成钙盐桥^[11]。在高温处理后,蛋白酶 AprX 也会发生一定程度的失活,在热处理过程中,蛋白酶中的天冬酰胺和谷氨酰胺残基发生脱酰胺作用,被认为可能是蛋白酶 AprX 的热失活原因^[53]。在常规 UHT 处理基础上,升高加热

温度和延长加热时间能够更好的灭活蛋白酶 AprX,延长 UHT 乳的货架期,而这势必会加速乳中的褐变反应,影响 UHT 乳的色泽和品质。

研究表明,蛋白酶 AprX 具有低温失活现象,即对 40~70 °C 条件下的热处理敏感^[48,54]。蛋白酶 AprX 在低温条件下的自催化分解可能是造成其低温失活的重要原因,Volk 等^[54]通过 HPLC-SEC-UV 观察到来自解脲假单胞菌(*P. proteolytica*)的蛋白酶 AprX 的自水解。蛋白酶 AprX 的低温失活现象在缓冲液中比在乳中更加明显,这可能是乳中的蛋白质和 Ca^{2+} 对其保护作用,乳中的蛋白质能够竞争蛋白酶 AprX 的活性位点,减少了蛋白酶 AprX 的自水解作用,而 Ca^{2+} 则能够帮助蛋白酶 AprX 在加热条件下展开的部分结构重新进行正确的折叠^[11]。蛋白酶 AprX 的低温失活为研究人员对其控制提供了一个新的思路,在常规热处理之前增加预加热程序,通过低温失活作用和热灭活作用相结合来灭活蛋白酶,Glück 等^[48]发现预加热过程能够降低蛋白酶活力。

表 1 来自假单胞菌的蛋白酶 AprX 的特性

Table 1 Properties of the protease AprX from <i>Pseudomonas</i>							参考文献
菌株	培养基	最适温度/ °C	最适 pH 值	分子量/ ku	抑制剂	激活剂	
假单胞菌 LBSA1	合成培养基	40	9	49	EDTA, EGTA, DTT	NS	40%(90 °C, 30 min) [43]
荧光假单胞菌 TSS	LB 培养基	50	8	47	Co^{2+}	Ca^{2+} , Zn^{2+}	NS [44]
人参假单胞菌	低盐培养基	40	8	49.4	1, 10-邻菲咯啉, EDTA	NS	88%(138 °C, 18 s) [45]
荧光假单胞菌 BJ-10	营养肉汤	30	7	47	Cu^{2+} , DTT	Fe^{2+}	97.23%(90 °C, 30 min), 47.67%(130 °C, 3 min) [46]
荧光假单胞菌	LB 培养基	30	8	45	NS	NS	77.64%(80 °C, 20 min), 39.28%(130 °C, 30 s) [47]
假单胞菌 WS 4992	UHT 乳	45	9	33.6	NS	NS	58.9%(138 °C, 18 s) [48]
假单胞菌 WS4993	UHT 乳	45	7	37.5	NS	NS	45.8%(138 °C, 18 s) [48]
假单胞菌 WS 4672	UHT 乳	40	9	34.5	NS	NS	53.1%(138 °C, 18 s) [48]
荧光假单胞菌 Rm12	NB 培养基	40	7.5	45	1, 10-邻菲咯啉, EDTA	Mn^{2+}	9%(120 °C, 20 s) [49]
荧光假单胞菌 F	CM 培养基	45	8.5	45	EDTA, EGTA, 邻菲咯啉	NS	NS [50]
荧光假单胞菌 07A	LB 培养基	37	7.5	50	1, 10-邻菲咯啉, EDTA	Mn^{2+}	31.7%(72 °C, 15 s), 40.5(100 °C, 5 min) [39]

3 蛋白酶 AprX 对乳制品的潜在危害

3.1 蛋白酶 AprX 水解酪蛋白规律

研究表明,蛋白酶 AprX 对酪蛋白具有较强的水解能力而几乎不水解乳清蛋白^[10,27]。关于蛋白酶 AprX 对酪蛋白的水解规律存在菌株特异性,不同来源的 AprX 对酪蛋白的水解规律略有不同。Baglinière 等^[55]发现蛋白酶 AprX 对酪蛋白的水解顺序为 β -酪蛋白> κ -酪蛋白> α -酪蛋白,Gaucher 等^[56]也得到了相同的结论。然而,Adams 等^[57]和 Zhang 等^[10]发现蛋白酶 AprX 优先水解酪蛋白中的 κ -酪蛋白,虽然蛋白酶 AprX 对酪蛋白的水解顺序存在差异,但是 AprX 对 κ -酪蛋白具有很强的水解能力是共识。

3.2 蛋白酶 AprX 对乳制品的危害

蛋白酶 AprX 对乳制品的危害主要来源于其在加热灭菌后残存的活力对乳蛋白的水解。表 2 总结了近年来报道的蛋白酶 AprX 对乳制品的危害。

凝胶化是蛋白酶 AprX 对 UHT 乳的主要危害。D'Incecco 等^[63]发现蛋白酶 AprX 具有类凝乳酶活性,能够特异性水解 κ -酪蛋白 105~106 处的肽键,生成酪蛋白巨肽进而造成 UHT 乳形成凝胶。蛋白酶对 κ -酪蛋白 105~106 处的水解可能归功于 κ -酪蛋白残基的特殊构象,这种特殊构象使得 κ -酪蛋白能够与凝乳酶和蛋白酶 AprX 结合发生水解反应^[64]。Morandi 等^[65]发现接种嗜冷假单胞菌的 UHT 乳会形成凝胶,然而 UHT 乳的凝胶化不仅与蛋白水解程度有关,嗜冷菌的污染水平也是重要因素。Zhang 等^[10]发现当 AprX 水解了 κ -酪蛋白后诱导形成了致密凝胶,相比于纤溶酶,AprX 更易诱导形成凝胶。

蛋白酶 AprX 对酪蛋白的水解也影响着奶酪产业,蛋白酶 AprX 的类凝乳酶特性使其能够缩短干酪的凝乳时间^[60],然而当原料乳的蛋白水解程度过大时,则会造成干酪产量下降,干酪中的干物质含量降低等不利影响^[59]。Boulares 等^[66]将奶酪产量下降与革兰氏阴性嗜冷菌产生的酶相关联,高水平的蛋白水解会对奶酪的生产和最终产品的感官特性产生负面影响。然而,在奶酪的成熟过程中,一定程度的蛋白水解是必要的,控制蛋白酶 AprX 的水解程度可能在奶酪制造业发挥积极作用^[60]。蛋白酶 AprX 对酸奶的品质也会造成负面影响,酪蛋白在水解过程中,产生的肽类物质会影响酸奶的风味,而酸奶在发酵过程中涉及的生化反应众多,整个体系复杂,目前 AprX 对酸奶的危害研究工作并不详细。

4 蛋白酶 AprX 的控制

嗜冷假单胞菌来源广泛,很容易在原料乳的收集、运输和贮藏过程中污染原料乳,并在原料乳中生长繁殖、分泌耐热蛋白酶 AprX,因此控制蛋白酶 AprX 的危害主要从减少嗜冷菌污染,控制嗜冷菌生长,减少蛋白酶分泌等 3 个方面进行控制。

4.1 卫生和冷藏

保持牧场和设备的干净、卫生能够有效降低原料乳中嗜冷菌的污染量。嗜冷菌在生长过程中,会形成生物膜来增加嗜冷菌的耐受性,因此需要对挤奶设备和贮藏设备按期清洗、消毒,在阻止嗜冷菌污染的同时,防止嗜冷菌产生生物膜^[67]。尽管低温条件下嗜冷菌能够生长繁殖,而低温依然能够限制嗜冷菌的生长^[3]。原料乳在离开乳房后温度约为 35℃,很适合微生物的生长,因此快速预冷

表 2 蛋白酶 AprX 对乳制品的危害
Table 2 Harm of protease AprX to dairy products

乳制品种类	危害	原因	参考文献
UHT 乳	凝胶化	κ -酪蛋白水解	[9]
	苦味、涩味	游离氨基酸增加	[15]
干酪	产量降低	酪蛋白含量下降	[58]
	干物质含量下降	乳清中蛋白含量下降	[59]
	凝乳时间缩短	κ -酪蛋白水解	[60]
	异味	成熟过程中蛋白水解	[61]
酸奶	乳清分离	κ -酪蛋白水解	[62]
	异味	蛋白质水解	[62]

是减少细菌生长的重要手段,同时努力缩短从运输到加工的时间间隔也是控制嗜冷菌生长的重要途径。

4.2 高压均质和充气处理

高压均质是乳制品行业常用的均质技术,可以用来替代或补充传统的热巴氏杀菌工艺,能够有效减少蛋白水解,延长乳制品货架期^[68]。de Oliveira 等^[69]发现 150 MPa 的高压均质无法灭活嗜冷菌产生的蛋白酶,没有改善脱脂牛乳的水解,却使得全脂牛乳的蛋白水解减少 51%,使全脂牛乳形成凝胶推迟了 40 d,脂肪球碎裂后被蛋白质吸附是导致牛奶蛋白水解减少的主要因素。

CO₂ 是碳原子的最高氧化状态,能够抑制微生物生长^[70]。将 CO₂ 冲入后,CO₂ 能与乳中的水分子发生反应生成碳酸,同时能够降低乳中的氧分压,抑制好氧嗜冷菌的生长^[71]。刘美凤等^[72]利用 CO₂ 加压处理原料乳发现能够灭活 99.8% 的荧光假单胞菌,高压处理可以使 CO₂ 渗入细胞,起到灭活的效果。N₂ 作为惰性气体也常被用作微生物防腐,Munsch-Alatossava 等^[73]发现向原料乳冲入 N₂ 也能起到降低乳中氧分压的作用,抑制嗜冷菌的生长。

4.3 生物防腐

相比于传统原料乳的防腐技术,生物防腐针对性更强,效果更优,通过生物手段来达到抑制嗜冷菌的生长,从而减少蛋白酶 AprX 的危害,筛选天然的防腐剂对保障乳制品免受蛋白酶 AprX 的危害至关重要。

乳酸菌是一类安全的食用菌,在食品的加工、保藏过程中发挥重要作用^[74]。乳酸菌能够产生抗菌肽,这是嗜冷菌的天然防腐剂^[75]。刘辉^[76]从植物乳杆菌 Q7 中分离出的抗菌肽能够螯合 Zn²⁺,破坏荧光假单胞菌的外膜,最后作用于细胞膜使细胞内离子泄露,导致菌体死亡。Wang 等^[14]发现植物乳杆菌 90 对嗜冷假单胞菌具有明显的抑菌作用,这种抑菌作用是由菌株分泌的有机酸、细菌素等多种抑菌物质协同作用的结果。

噬菌体,是一种细菌病毒,已在食品工业中成功用作生物防治剂^[77]。噬菌体对嗜冷假单胞菌的控制如图 5 所示。

与乳酸菌的抑菌原理不同,噬菌体则可以直接裂解嗜冷假单胞菌实现对嗜冷菌的控制^[71]。利用噬菌体控制嗜冷假单胞菌的关键在于筛选对假单胞菌具有特异性的噬菌体。Tanaka 等^[78]从原料

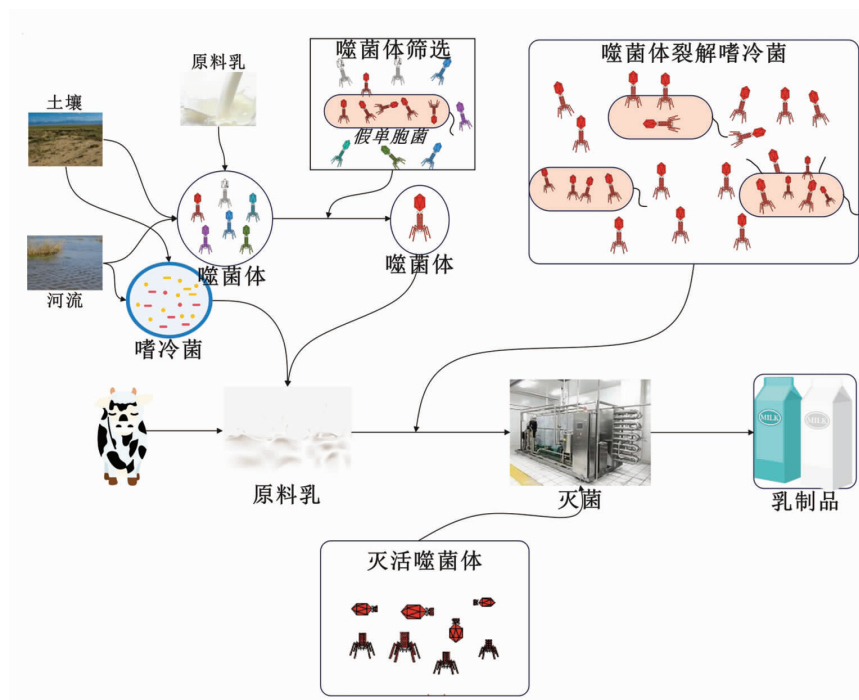


图 5 噬菌体控制嗜冷菌示意图

Fig.5 Schematic diagram of phage control of psychrophilic bacteria

乳中分离出噬菌体 HU1 发现其在冷藏条件下能够抑制嗜冷假单胞菌的生长,并且在 63 ℃加热 30 min 后无法检出噬菌体 HU1,这表明在原料乳的热处理过程中噬菌体也被灭活,不存在后续的潜在危害。do Nascimento 等^[79]从河流和乳液废水中分离并筛选出对荧光假单胞菌具有特异性的噬菌体 UFJF_PfDIW6 和 UFJF_PfSW6,这两株噬菌体能够有效减少原料乳中荧光假单胞菌的数量,同时减少乳蛋白水解。噬菌体 UFJF_PfDIW6 和 UFJF_PfSW6 在 pH 值 5~11 之间均具有活性,这使得它们能够在乳品工业中具有更广阔的应用前景。

4.4 分子对接筛选抑制剂防腐

近些年,虚拟筛选技术因其具有节约时间、减少资金投入的特点被广泛应用于药物开发^[80]。利用虚拟筛选技术来筛选抑制嗜冷菌生长和蛋白酶分泌的抑制剂,有望成为控制嗜冷菌危害的新手段。

虚拟筛选技术的流程如图 6 所示,利用关键蛋白的氨基酸序列建立 3D 结构,将数据库中的小

分子与蛋白结构进行对接,筛选出结合能力最强的小分子化合物作为潜在抑制剂,通过验证得到抑制嗜冷菌生长或蛋白酶分泌的抑制剂^[81]。相比于传统化学抑制剂,虚拟筛选可以从天然产物数据中进行抑制剂的筛选,减少抑制剂的副作用。Cen 等^[82]利用同源建模构建了荧光假单胞菌 PF08 冷休克蛋白(CspA)、海藻酸盐合成蛋白(AlgK)和环境调节 σ 因子(RpoS)的三维模型,利用虚拟筛选分子对接技术筛选出 3 种蛋白抑制剂 *L*-苯丙氨酸,发现 *L*-苯丙氨酸能够显著降低该嗜冷菌在低温条件下的生长能力,起到控制嗜冷菌危害的作用。Ding 等^[81]构建了荧光假单胞菌 P07 群体感应关键蛋白 LuxI 和 LuxR 蛋白的三维模型,利用虚拟筛选从天然产物数据库中筛选出群体感应抑制剂愈创木酚和柠檬醛,发现这两种抑制剂能有效抑制荧光假单胞菌 P07 的运动能力、生物膜形成能力和胞外酶形成能力。今后,针对嗜冷假单胞菌特异性蛋白的抑制剂筛选有望成为嗜冷菌控制的重要手段。

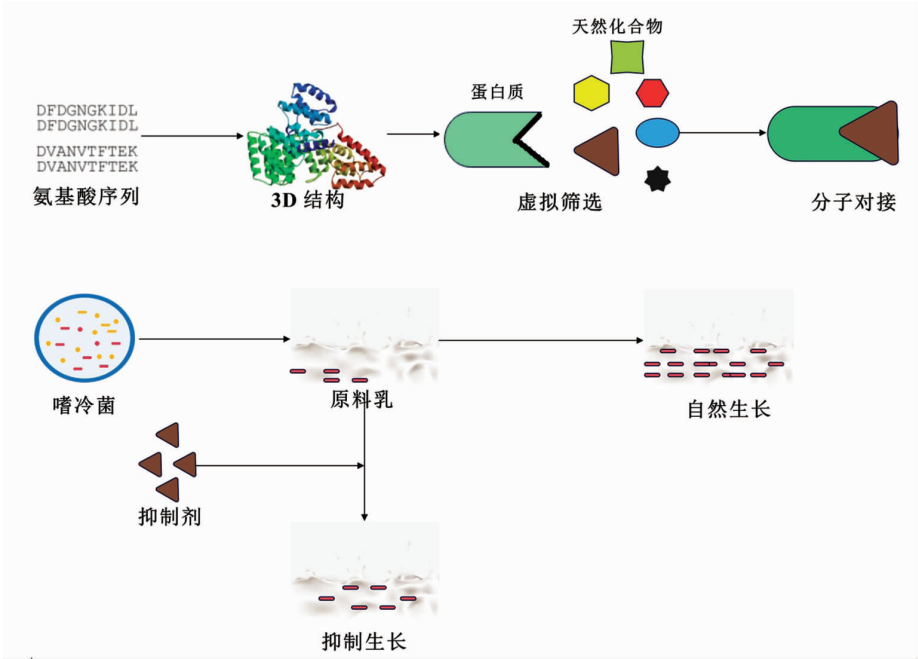


图 6 虚拟筛选技术流程示意图

Fig.6 Schematic diagram of virtual screening technology process

5 结语

原料乳中嗜冷假单胞菌分泌的胞外蛋白酶 AprX 对乳制品行业提出了巨大的挑战。目前,对

蛋白酶 AprX 的三维结构和耐热性并没有很好地了解,在今后的研究中,明确 AprX 的耐热性和在结构上的关联具有重要意义。在嗜冷菌控制方面

依然面临着很大挑战,乳制品种类的复杂性使得利用各种新兴方法筛选合适的嗜冷菌防腐剂面临巨大挑战,是今后乳制品行业发展的重点。

参 考 文 献

- [1] KAROUI R, DE BAERDEMAEKER J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products[J]. Food Chemistry, 2007, 102(3): 621-640.
- [2] LABORDE D, MARTIN W, SWINNEN J, et al. COVID-19 risks to global food security[J]. Science, 2020, 369(6503): 500-502.
- [3] WANG Y, HAN X, CHEN X, et al. Potential harmful of extracellular proteases secreted by *Pseudomonas fluorescens* W3 on milk quality[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(3): e15192.
- [4] RAJMOHAN S, DODD C, WAITES W M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93(2): 205-213.
- [5] 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.
- [6] XIN L, ZHANG L W, MENG Z X, et al. Lipolytic psychrotrophic bacteria and lipase heat-resistant property in bovine raw milk of North China[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2017, 41(6): e13289.
- [7] ZHANG C, 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.
- [8] LIAO C H, MCCALLUS D E. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(3): 914-921.
- [9] D'INCECCO P, BRASCA M, ROSI V, et al. Bacterial proteolysis of casein leading to UHT milk gelation: An applicative study[J]. Food Chemistry, 2019, 292: 217-226.
- [10] ZHANG C Y, BIJL E, HETTINGA K. Destabilization of UHT milk by protease AprX from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin[J]. Food Chemistry, 2018, 263: 127-134.
- [11] ERTAN H, CASSEL C, VERMA A, et al. A new broad specificity alkaline metalloprotease from a *Pseudomonas* sp. isolated from refrigerated milk: Role of calcium in improving enzyme productivity[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2015, 113: 1-8.
- [12] 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.
- [13] DE ALCÂNTARA A L D AMICO D, BRUZAROSKI S R, LUIZ L L, et al. Antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* against *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* from raw milk[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2019, 43(9): e14082.
- [14] WANG J, SU Y J, GU L P, et al. The inhibition of cell-free supernatants of several lactic acid bacteria on the selected psychrophilic spoilage bacteria in liquid whole egg[J]. Food Control, 2020, 123: 107753.
- [15] 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]. Food Industry, 2021, 42(6): 373-377.
- [16] DUONG F, BONNET E, G'ELI V, et al. The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: A new substrate for the Apr type I secretion system[J]. Gene, 2001, 262(1/2): 147-153.
- [17] WANG G Y, LI Q, TANG W Q, et al. AprD is important for extracellular proteolytic activity, physicochemical properties and spoilage potential in meat-borne *Pseudomonas fragi*[J]. Food Control, 2021, 124: 107868.
- [18] 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.
- [19] MA Q H, ZHAI Y F, SCHNEIDER J C, et al. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*[J]. *BBA – Biomembranes*, 2003, 1611(1/2): 223–233.
- [20] BUCHON L, LAURENT P, GOUNOT A M, et al. Temperature dependence of extracellular enzymes production by psychrotrophic and psychrophilic bacteria[J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22 (19): 1577–1581.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] DUFOUR D, NICODÈME M, PERRIN C, et al. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 125(2): 188–196.
- [24] FAIRBAIRN D J, LAW B A. The effect of nitrogen and carbon sources on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1987, 62(2): 105–113.
- [25] JASPE A, PALACIOS P, MATIAS P, et al. Proteinase activity of *Pseudomonas fluorescens* grown in cold milk supplemented with nitrogen and carbon sources[J]. *Journal of Dairy Science*, 1994, 77(4): 923–929.
- [26] ZHANG D, PALMER J, TEH K H, et al. Milk fat influences proteolytic enzyme activity of dairy *Pseudomonas* species [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 320: 108543.
- [27] WANG Y, SUN J L, DENG Y W, et al. Whey protein influences the production and activity of extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* W3[J]. *LWT–Food Science and Technology*, 2021, 154: 112865.
- [28] BAI A J, RAI V R. Bacterial quorum sensing and food industry [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2011, 10(3): 184–194.
- [29] TANG R, ZHU J L, FENG L F, et al. Characterization of LuxI/LuxR and their regulation involved in biofilm formation and stress resistance in fish spoilers *Pseudomonas fluorescens*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 297: 60–71.
- [30] LIU M, WANG H, GRIFFITHS M W. Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(6): 2174–2184.
- [31] LAUE R E, JIANG Y, CHHABRA S R, et al. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy -7 -cis -tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase[J]. *Microbiology*, 2000, 146 (10): 2469 – 2480.
- [32] WEI H L, ZHANG L Q. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 89(2): 267–280.
- [33] 韩翔鹏, 上官文丹, 李尧, 等. 细菌群体感应系统调控及淬灭机制研究进展[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(2): 390–401.
- HAN X P, SHANGGUAN W D, LI Y, et al. Research progress on the regulation and quenching mechanisms of bacterial quorum sensing system[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(2): 390–401.
- [34] QUINTIERI L, CAPUTO L, BRASCA M, et al. Recent advances in the mechanisms and regulation of QS in dairy spoilage by *Pseudomonas* spp [J]. *Foods*, 2021, 10(12): 3088.
- [35] MACHADO I, SILVA L R, GIAOURIS E D, et al. Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition[J]. *Food Research International*, 2019, 127: 108754.
- [36] LIU X X, JI L, WANG X, et al. Role of RpoS in stress resistance, quorum sensing and spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 270: 31–38.
- [37] YUAN L, WANG N, SADIQ F A, et al. RNA sequencing reveals the involvement of quorum sensing in dairy spoilage caused by psychrotrophic bacteria [J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2020,

- 127: 109384.
- [38] 王娇, 张筠, 刘术明, 等. 乳和乳制品中嗜冷菌及其耐热酶的危害与控制研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(13): 143–146.
- WANG J, ZHANG Y, LIU S M, et al. Hazard analysis and control of psychrotrophic bacteria and heat resistant enzymes in raw milk and dairy products[J]. Food Research and Development, 2015, 36(13): 143–146.
- [39] ALVES M P, SALGADO R L, ELLER M R, et al. Characterization of a heat-resistant extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity[J]. Journal of Dairy Scienc, 2016, 99(10): 7842–7851.
- [40] POLÊTO M, ALVES M, LIGABUE-BRAUN R, et al. Role of structural ions on the dynamics of the *Pseudomonas fluorescens* 07A metalloprotease [J]. Food Chemistry, 2019, 286: 309–315.
- [41] 吕高婧. 荧光假单胞菌胞外蛋白酶对高钙奶品质的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
- LÜ G J. Effect of heat-stable extracellular proteases from *Pseudomonas fluorescens* on the quality of high calcium milk[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2014.
- [42] 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.
- [43] ZHANG W W, HU Y H, WANG H L, et al. Identification and characterization of a virulence-associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 139(1/2): 183–188.
- [44] MATÉOS A, GUYARD-NICODÈME M, BAGLINIÈRE F, et al. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk[J]. International Dairy Journal, 2015, 49: 78–88.
- [45] BAUR C, KREWINKEL M, KUTZLI I, et al. Isolation and characterisation of a heat-resistant peptidase from *Pseudomonas panacis* with standing general UHT processes [J]. International Dairy Journal, 2015, 49: 46–55.
- [46] 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 *Pseudomonas fluorescens* [J]. Food Science, 2012, 33(9): 206–210.
- [47] 吕高婧, 刘艳玲, 徐洪军. 冷藏原料乳中荧光假单胞菌的分离鉴定及其产蛋白酶特性研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2013, 41(11): 146–152.
- LÜ G J, LIU Y L, XU H J. Isolation and identification of *Pseudomonas fluorescens* from refrigerated raw milk and characterization of its protease [J]. Journal of Northwest A&F University, 2013, 41(11): 146–152.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] DUFOUR D, NICODÈME M, PERRIN C, et al. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(2): 188–196.
- [51] 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, 2018, 19(8): 630–642.
- [52] SCHOKKER E P, VAN BOEKEL M A J S. Mechanism and kinetics of inactivation at 40–70 degrees C of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F[J]. Journal of Dairy Research, 1998, 65(2): 261–272.
- [53] SCHOKKER E P, VAN BOEKEL M A J S. Kinetics of thermal inactivation of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F: Influence of pH, calcium, and protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(4): 1681–1686.
- [54] 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.
- [55] BAGLINIÈRE F, TANGUY G, JARDIN J, et al. Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: Implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage[J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 2593–2603.
- [56] GAUCHER I, TANGUY G, FAUQUANT J, et al. Proteolysis of casein micelles by *Pseudomonas fluorescens* CNRZ 798 contributes to the destabilisation of UHT milk during its storage[J]. Dairy Science and Technology, 2011, 91(4): 413–429.
- [57] ADAMS D M, BARACH J T, SPECK M L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment[J]. Journal of Dairy Science, 1976, 59(5): 823–827.
- [58] FOX P F, GUINEE T P, COGAN T M, et al. Fundamentals of cheese science[M]. Boston: Springer US, 2017: 533–542.
- [59] MANKAI M, BOULARES M, BEN MOUSSA O, et al. The effect of refrigerated storage of raw milk on the physicochemical and microbiological quality of Tunisian semihard Gouda - type cheese during ripening[J]. International Journal of Dairy Technology, 2012, 65(2): 250–259.
- [60] PALUDETTI L F, KELLY A L, GLEESON D. Effect of thermoresistant protease of *Pseudomonas fluorescens* on rennet coagulation properties and proteolysis of milk[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(5): 4043–4055.
- [61] SAMARZIJA D, ZAMBERLIN S, POGACIC T. Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality [J]. Mljekarstvo, 2012, 62(2): 77–95.
- [62] ANDREANI N A, CARRARO L, FASOLATO L, et al. Characterisation of the thermostable protease AprX in strains of *Pseudomonas fluorescens* and impact on the shelf-life of dairy products: Preliminary results[J]. Italian Journal of Food Safety, 2016, 5(4): 6175.
- [63] D'INCECCO P, BRASCA M, ROSI V, et al. Bacterial proteolysis of casein leading to UHT milk gelation: An applicative study[J]. Food Chemistry, 2019, 292: 217–226.
- [64] PALMER D S, CHRISTENSEN A U, SØRENSEN J, et al. Bovine Chymosin: A Computational Study of Recognition and Binding of Bovine κ -Casein[J]. Biochemistry, 2010, 49(11): 2563–2573.
- [65] 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.
- [66] BOULARES M, MANKAI M, HASSOUNA M. Effect of activating lactoperoxidase system in cheese milk on the quality of Saint-Paulin cheese[J]. International Journal of Dairy Technology, 2011, 64(1): 75–83.
- [67] 韩秋红, 李琴, 李凯锋. 嗜冷菌对乳制品加工及贮存的影响和控制措施[J]. 现代食品, 2018, 15: 73–75.
- HAN Q H, LI Q, LI K F. Effects and control measures of psychrophilic bacteria on processing and storage of dairy products[J]. Modern Food, 2018, 15: 73–75.
- [68] DONSI F, FERRARI G, LENZA E, et al. Main factors regulating microbial inactivation by high-pressure homogenization: Operating parameters and scale of operation[J]. Chemical Engineering Science, 2009, 64(3): 520–532.
- [69] DE OLIVEIRA M M, LEITE B R D, 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.
- [70] 范珺. 二氧化碳抑菌技术在乳制品保鲜中的应用[J]. 食品安全导刊, 2017, 31: 52–54.
- FAN J. Application of carbon dioxide antibacterial technology in the preservation of dairy products[J]. China Food Safety Magazine, 2017, 31: 52–54.
- [71] 张树飞, 薛玉玲, 崔玥, 等. 牛乳中嗜冷菌及其耐热酶研究进展[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(11): 35–44.
- ZHANG S F, XUE Y L, CUI Y, et al. Research progress of psychrophilic bacteria and thermostable enzymes in milk[J]. China Dairy Industry, 2020, 48(11): 35–44.
- [72] 刘美凤, 付瑞东, 姚春艳, 等. 加压 CO₂ 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 CO₂ on *Pseudomonas fluorescens* in milk[J]. China Dairy Industry, 2012, 40(6): 39–42.
- [73] MUNSCH-ALATOSSAVA P, GURSOY O, ALATOSSAVA T. Exclusion of phospholipases (PLs)-producing bacteria in raw milk flushed with nitrogen gas (N₂)[J]. Microbiological Research, 2010, 165(1): 61–65.
- [74] LIU G R, GRIFFITHS M W, SHANG N, et al. Applicability of bacteriocinogenic *Lactobacillus pentosus* 31-1 as a novel functional starter culture or coculture for fermented sausage manufacture[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(2): 292–298.
- [75] GÁLVEZ A, ABRIOUEL H, LÓPEZ R L, et al. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120(1/2): 51–70.
- [76] 刘辉. 抑制耐冷菌的乳酸菌抗菌肽筛选及其结构和抗菌机理研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.
- LIU H. Screening, structure and mode of action of antimicrobial peptides inhibited psychrotrophs from lactic acid bacteria[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2016.
- [77] O'SULLIVAN L, BOLTON D, MCAULIFFE O, et al. Bacteriophages in food applications: From foe to friend[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2019, 10: 151–172.
- [78] TANAKA C, YAMADA K, TAKEUCHI H, et al. Characterization of a lytic bacteriophage for controlling *Pseudomonas lactis* in raw cow's milk[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(18): e00111.
- [79] DO NASCIMENTO E C, SABINO M C, CORGUINHA L D, et al. Lytic bacteriophages UFJF_PFDIW6 and UFJF_PFSW6 prevent *Pseudomonas fluorescens* growth *in vitro* and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage[J]. Food Microbiology, 2021, 101: 103892.
- [80] GIANCRISTOFARO A, BARBOSA A J M, AMMAZZALORSO A, et al. Discovery of new FXR agonists based on 6-ECDCA binding properties by virtual screening and molecular docking [J]. Medchemcomm, 2018, 9(10): 1630–1638.
- [81] DING T, LI T, LI J. Virtual screening for quorum-sensing inhibitors of *Pseudomonas fluorescens* P07 from a food-derived compound database[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(3): 763–777.
- [82] CEN C N, CHEN J, WU X C, et al. Screening inhibitor to prevent the psychrotrophic growth of *Pseudomonas fluorescens* by using molecular simulation[J]. Food Control, 2021, 134: 108557.

Harm and Control of Heat-stable Protease AprX Produced by Psychrophilic Bacteria on Dairy Products

Wang Yu, Han Xue*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001)

Abstract Heat-resistant protease secreted by psychrophilic bacteria can reduce the quality of dairy products and has attracted extensive attention. The protease secreted by psychrophiles is heat resistant and can even retain partial activity after UHT treatment. The common exogenous thermostable protease in raw milk is the extracellular protease AprX secreted by *Pseudomonas*, so a comprehensive understanding of the biological properties, proteolytic potential and regulation of the protease AprX will help to find ways to control psychrophilic protease. In this paper, the latest research progress and control methods of protease AprX are reviewed, and new ideas for the control of protease AprX are provided.

Keywords psychrophilic bacteria; protease AprX; spoilage potential; control strategy