

小牛皱胃酶提取技术的研究^{*}

张富新

(陕西师范大学 食品工程系, 陕西 西安 710062)

[摘 要] 以小牛皱胃为原料, 研究了食盐浓度、酒精浓度、提取温度和 pH 对小牛皱胃酶提取效果的影响。结果表明, 用 50 g/L 的食盐在 pH 4.0~3.0 下提取时, 小牛皱胃酶凝乳活性最高。

[关键词] 小牛皱胃酶; 凝乳活性; 提取技术

[中图分类号] S823; S879.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)01-0103-04

小牛皱胃酶(calf rennet)是从幼小吮乳小牛第四胃(皱胃)中提取的一种凝乳酶, 含有质量分数为 90% 的凝乳酶(rennin)和质量分数 10% 的胃蛋白酶(pepsin)^[1], 其作用是水解 κ -酪蛋白的 phe105-Met106 肽键, 生成副 κ -酪蛋白和糖巨肽, 在 Ca^{2+} 存在下使乳凝固, 形成凝块^[2,3]。由于小牛皱胃酶具有性质稳定、凝乳活力与蛋白水解活力之比较高、干酪出品率较高及风味良好的特点, 至今仍是干酪生产中使用最多、质量最好的凝乳酶, 适宜于生产各种类型的干酪。

小牛皱胃酶在国外开发利用较早^[4], 但由于干酪产量逐年上升, 对酶的需求量不断增大, 可供利用的小牛因要经肥育生产肉类, 数量逐年减少, 目前的研究主要集中在微生物凝乳酶以及重组凝乳酶的开发利用上。我国干酪生产正处于起步阶段, 干酪生产所需的凝乳酶主要依靠进口, 且价格昂贵, 限制了我国干酪生产发展。因此, 本研究依靠我国充足的原料资源, 利用屠宰小牛(制血清)的下脚料——皱胃为原料, 提取小牛皱胃酶, 以代替进口凝乳酶, 具有十分重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

选用 2 周龄的 5 头吮乳小牛, 屠宰后取出皱胃, 清除内容物, 剥去脂肪及结缔组织, 悬挂于阴凉通风处干燥。使用时, 用粉碎机粉成粉末, 置于棕色瓶中备用。

1.2 提取方法

取干燥皱胃粉, 加 15 倍的蒸馏水, 用不同浓度的食盐、酒精在不同 pH 下提取 5 d, 然后在 3 000 r/min 下离心 15 min, 除去杂质, 用 1 mol/L 的 HCl 调整 pH 至 4.6, 在室温下激活 12 h, 测定其凝乳活性。

1.3 酶活性测定

采用 Arima 方法^[5], 取 5 mL 100 g/L 的脱脂乳, 在 35℃ 下保温 10 min, 加入 5 mL 皱胃酶溶液, 迅速混合均匀, 准确记录从酶液加入到乳凝固时间(s), 把 40 min 凝结 1 mL 100 g/L 脱脂乳的酶量定义为一个索氏单位(Soxhlet unit, SU)^[6]。

$$\text{Soxhlet unit (SU)} = \frac{2.400}{T} \times \frac{50}{5} \times D$$

式中, T 为凝乳时间(s); D 为稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 浸提液中食盐浓度的选择

在浸提液中加入食盐, 使其质量浓度为 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 g/L, 其浸提结果见表 1。

由表 1 可以看出, 食盐质量浓度对提取皱胃酶凝乳活性有很大的影响。当食盐质量浓度小于 40 g/L 时, 随着质量浓度的增加, 皱胃酶凝乳活性也随之增大; 食盐质量浓度在 40~60 g/L 时, 皱胃酶凝乳活性最高为 1.01~1.12 万 SU, 之后随食盐质

* [收稿日期] 2001-07-12

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目资助(691043)

[作者简介] 张富新(1962-), 男, 陕西武功人, 副教授, 博士, 主要从事乳制品研究与开发工作。

量浓度增加,酶活性又逐渐降低,这主要与皱胃酶在 盐液中的溶解度有关。

表 1 食盐质量浓度对皱胃酶提取效果的影响

Table 1 Influence of salt concentration on the effect of extracting calf rennet

食盐质量浓度/(g · L ⁻¹) Salt concentration	0	20	40	60	80	100	120
酶活性/万 SU Enzyme activity	0.30	0.81	1.12	1.01	0.70	0.59	0.55

注:重复数 $n=5$, 下表同。

Note: Repeation number $n=5$ The "n" in the following table is the same

2.2 浸提液中酒精浓度的选择

6%, 9%, 12%, 15% 的酒精溶液对皱胃进行浸提, 结

用无水乙醇将浸提液配成体积分数为 0, 3%, 果见表 2。

表 2 酒精浓度对皱胃酶提取效果的影响

Table 2 Influence of alcohol concentration on the effect of extracting calf rennet

酒精体积分数/% Alcohol concentration	0	3	6	9	12	15
酶活性/万 SU Enzyme activity	0.30	0.28	0.26	0.26	0.25	0.24

从表 2 可知, 酒精浓度对提取皱胃酶的凝乳活性影响不大, 随着酒精浓度的增大, 提取皱胃酶活性有下降趋势。并且与对照组(不加酒精)相比, 酶凝乳活性有所降低, 这一结果与李立钊等^[7]报道结果不一致, 与武永厚^[8]报道羔羊皱胃酶提取结果一致。

2.3 浸提液 pH 的选择

用 0.1 mol/L HCl 将浸提液配成 pH 为 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 进行浸提试验。结果见表 3。

表 3 pH 对皱胃酶提取效果的影响

Table 3 Influence of pH on the effect of extracting calf rennet

pH	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
酶活性/万 SU Enzyme activity	0.79	1.02	1.20	0.91	0.42	0.35	0.33

表 3 显示了浸提液 pH 与浸提皱胃酶凝乳活性的关系。当浸提液 pH 为 3 时, 提取皱胃酶液的凝乳活性最高为 1.20 万 SU; 浸提液 pH 小于 3 时, 随 pH 增大, 酶凝乳活性随之提高; 而当 pH 大于 3 时, 酶凝乳活性下降较快。说明在较低 pH 下提取皱胃

酶可获得较高的收率, 但 pH 也不宜过低, 否则会引起酶蛋白变性, 丧失活力。

2.4 浸提温度对皱胃酶活性的影响

将皱胃在 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 下用 50 g/L 的食盐进行浸提, 结果见表 4。

表 4 温度对皱胃酶提取效果的影响

Table 4 Influence of temperature on the effect of extracting calf rennet

温度/ Temperature	15	20	25	30	35	40	45
酶活性/万 SU Enzyme activity	1.01	1.05	1.12	1.21	1.10	0.93	0.81

由表 4 可以看出, 当在 30 浸提时, 皱胃酶活性最高; 浸提温度低于 30 时, 随着浸提温度升高, 由于酶分子扩散速度加快, 酶的溶解性增加, 从而使浸提皱胃酶的凝乳活性提高; 但当浸提温度大于 30 时, 酶活性又逐渐降低, 这可能与酶长时间在较高温度下变性有关。

2.5 提取技术参数的确定

在以上提取试验的基础上, 为了考察多因素的综合效应, 以食盐质量浓度、酒精浓度、浸提液 pH、浸提温度为因素, 提取皱胃酶凝乳活性为试验指标, 进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验, 结果见表 5。

表 5 小牛皱胃酶提取试验

Table 5 The extraction experiment of calf rennet

试验号 Test No.	食盐质量浓度/(g · L ⁻¹) Salt concentration	pH	温度/ Temperature	酒精体积分数/% Alcohol concentration	酶活性/万 SU Enzyme activity
	A	B	C	D	
1	1(40)	1(2)	1(25)	1(0)	1.02
2	1	2(3)	2(30)	2(3)	0.98
3	1	3(4)	3(35)	3(6)	0.82
4	2(50)	1	2	3	1.35
5	2	2	3	1	1.52
6	2	3	1	2	1.13
7	3(60)	1	3	2	1.00
8	3	2	1	3	0.88
9	3	3	2	1	1.10
k ₁	0.94	1.12	1.01	1.21	
k ₂	1.33	1.13	1.14	1.04	
k ₃	0.99	1.20	1.11	1.02	
R	0.39	0.08	0.13	0.19	

试验结果(表 5)表明, 提取因素对小牛皱胃酶凝乳活性有明显影响, 在试验取值范围内, 食盐质量浓度极差最大为 0.39, 其次为浸提温度和酒精浓度, pH 值影响最小, 其顺序为食盐浓度> 酒精浓度> 浸提温度> 浸提液 pH。

为了更直观地观察各种因素对小牛皱胃酶浸提效果的影响, 以试验因素为横坐标, 提取小牛皱胃酶平均凝乳活性为纵坐标作因素与试验指标关系图。

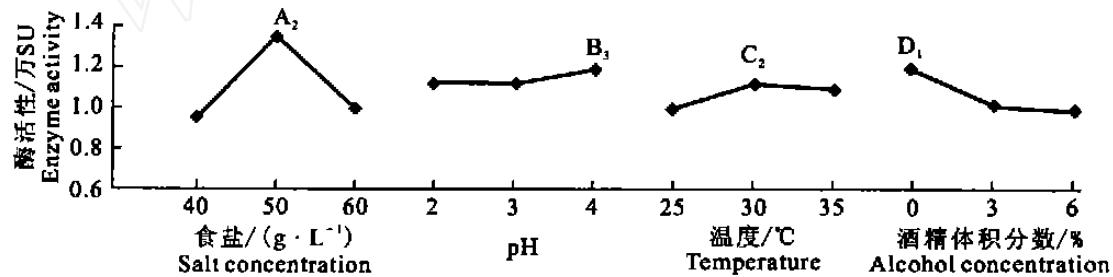


图 1 提取因素与小牛皱胃酶活性间的关系

Fig. 1 Relationship between extraction factors and calf rennet activity

由图 1 可以看出, 小牛皱胃酶提取最佳技术参数为 A₂B₃C₂D₁, 即浸提液食盐质量浓度为 50 g/L, pH 为 4, 浸提温度为 30℃, 浸提液中不加酒精时, 提取小牛皱胃酶凝乳活性最高。为验证此结果, 用 50 g/L 食盐, 调节 pH 到 4.0, 在 30℃ 下对小牛皱胃进行浸提, 获取皱胃酶的凝乳活性为 1.61 万 SU, 证明提取技术参数合理可行, 可在实际生产中应用。

3 讨 论

浸提液食盐质量浓度是影响提取效果的主要因素之一。皱胃酶的浸提效果依赖于其在溶液中的溶解性, 而溶解性大小取决于溶液中的离子强度, 当浸提液中食盐质量浓度在 50 g/L 以内时, 在低质量浓度中性盐溶液中, 离子与酶分子表面的电荷相互作用形成离子层, 增大了酶的溶解性, 但当盐质量浓度过高时, 酶分子与离子间争夺水分子, 导致酶分子表

面的水化层破坏, 从而降低酶的溶解性, 出现盐析现象^[9]。因此只有控制在适当的盐质量浓度条件下, 才能最大程度地溶解酶, 提高提取效率。

关于提取液中酒精浓度对提取效果的影响有很大争议。一些资料报道^[10], 在提取液中添加酒精可提高凝乳酶收率, 但从本研究结果来看, 随着酒精添加量的增大, 提取液中酶凝乳活性反而降低, 这可能是由于有机溶剂使酶失活所致。Kleiner^[11]认为凝乳酶易被乙醇修饰, 用乙醇作为有机溶剂沉淀凝乳酶, 可使酶永久失活。Friedenthal^[12]也认为有机溶剂特别是在高浓度和高温条件下更易使酶失活。

浸提液的 pH 主要影响酶的溶解性和稳定性。当酶处于其等电点时酶分子净电荷数为零, 此时酶的溶解性最低, 不易被溶液浸提出来, 但提取液 pH 也不宜过低, 否则酶蛋白在低 pH 下稳定性降低, 特别是在 NaCl 存在条件下, 易发生自溶^[12], 使酶活性

降低。因此提取皱胃酶时在考虑到远离酶等电点的同时,也要注意在不同 pH 下酶的稳定性。提取温度主要影响酶的扩散速度,当提取温度

较高时,酶的扩散速度加快,酶溶解度增大,但提取温度不宜过高,否则酶在长时间高温条件下易变性失活。

[参考文献]

- [1] Staff A. Rennet containing 100% chymosin increases cheese quality and yield[J]. Food Technology, 1989, 43: 88- 89
- [2] Bingham E W. Action of rennet on κ -casein[J]. J Dairy Sci, 1975, 58: 13- 18
- [3] Braun. Investigations on biochemical properties of milk-clotting enzymes[J]. Die Nahrung, 1988, 32: 357- 381
- [4] Folmann B. A review on prorennin and rennin[J]. Compt Rend Trav Lab Carlsberg, 1966, 35: 143- 167
- [5] Arima K. Milk-clotting enzyme from microorganism, part I, Screening test and identification of the potent fungus[J]. Agric Biol Chem, 1967, 31: 540- 545
- [6] Hideyuki K. Rapid and large scale isolation of chymosin by pepstatin-aminohexylagarose[J]. Agric Biol Chem, 1987, 42: 2227- 2231
- [7] 李立钊, 冀娟, 吴限, 等. 凝乳酶研究与生产[A]. 中国畜牧兽医学会 1997 年畜牧科技与畜产品加工年会论文集[C]. 北京: 中国科技出版社, 1996
- [8] 武永厚. 山羊凝乳酶提取技术及部分特性的研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学畜牧兽医学院, 1999
- [9] 郭勇. 酶工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997
- [10] Veringa H A. Rennet Substitutes-a review[J]. Dairy Sci, 1961, 23: 197- 199
- [11] Kleiner I S. Studies on rennin II, the isolation of prorennin[J]. J Biol Chem, 1932, 96: 745- 758
- [12] Friedenthal M K. Enzyme adsorption and loss of activity in dilute solutions of chymosin and pepsin[J]. Neth Milk Dairy J, 1985, 39: 63- 70

Studies on extraction technology of calf rennet

ZHANG Fu-xin

(Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: Using calf abomasum as material, the concentration of salt and alcohol, pH values of extraction solution and time of extraction on the effect of calf rennet extraction were studied. The experimental results showed that the milk-clotting activity of calf rennet reached peak with 5% salt concentration extraction in pH 4.0 at 30 °C.

Key words: calf rennet; milk-clotting activity; extraction technology