

利用超声处理提取皱胃酶的试验研究

张富新, 陈锦屏, 李林强

(陕西师范大学食品工程系, 西安 710062)

摘要: 以1~2周龄小牛皱胃为原料, 利用超声提取法研究了超声强度、提取时间、提取液NaCl浓度、皱胃与提取液比例以及提取液pH值对皱胃酶(rennet)提取活性的影响。试验结果表明, 与传统提取法相比较, 超声提取法可显著缩短提取时间和提高皱胃酶的活性, 其最佳工艺参数为: 超声强度40 W/cm², 提取时间70 min, 提取液NaCl浓度10%, 提取液pH值5.0; 皱胃与提取液比例为1:20。

关键词: 超声处理; 皱胃酶; 提取; 酶活性; 超声强度

中图分类号: S823; S879.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2004)03-0153-04

0 引言

皱胃酶(rennet)是从反刍动物幼畜第4胃(皱胃)中提取的一种凝乳酶(milk-clotting enzymes), 是干酪生产中起凝乳作用的关键性酶, 其作用是水解K-casein的Phe105-Met106肽键, 形成para-K-casein和糖巨肽(glycomacropeptide), 使酪蛋白胶粒丧失稳定性, 在Ca²⁺参与下使乳凝固形成凝乳(curd)^[1,2]。小牛皱胃酶在国外开发利用较早^[3], 用其生产的干酪在品质及风味方面均优于其他酶类, 至今仍是干酪生产中使用最多、质量最好的凝乳酶。近年来, 由于世界干酪产量逐年增加, 对皱胃酶需求量不断增大, 皱胃酶供应日益短缺, 可供利用的小牛因要经肥育生产肉类, 数量逐年减少, 造成皱胃酶供应日益短缺, 价格上涨。人们在不断研究开发新型皱胃酶代用品的同时, 对传统提取方法进行提高和改进也是目前研究的主要课题^[3]。超声在生物活性物质的提取方面已广泛应用, 利用超声提取具有提取时间短, 原料提取充分, 微生物污染小的特点^[4], 与传统提取方法相比, 提取效率明显提高^[5,6]。因此, 本研究依靠中国充足的原料资源, 利用屠宰小牛(制血清)的下脚料——皱胃为原料, 探讨超声提取皱胃酶的工艺参数, 这对缓解目前皱胃酶供应紧张状况具有十分重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

选用被屠宰的1~2周龄小牛的皱胃, 用流水冲洗1~2 min, 除去内容物, 然后剥除皱胃外部的脂肪及结缔组织, 在-20℃下冷冻保存。使用前轻微解冻后, 切成碎片, 混合均匀待用。

1.2 提取方法

取解冻后的小牛皱胃, 用超声波提取仪(陕西翔达

超声技术工程部生产), 在20 kHz下, 在不同超声强度、提取时间、NaCl浓度、皱胃与提取液比例、提取液pH值等因素下进行提取, 然后在3000 g下离心15 min, 除去杂质, 上清液用0.1 mol/L HCl调整pH值至4.6, 在室温下激活12 h, 分别测定激活前后皱胃酶活性。同时以不用超声处理的传统提取方法对照^[9]。其提取工艺流程见图1。

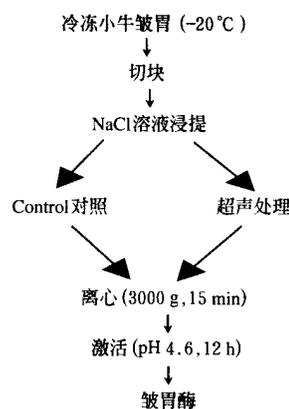


图1 皱胃酶提取工艺流程图

Fig 1 Flow chart for rennet extraction

1.3 酶活性测定

酶活性测定采用Arima方法^[10]。取10 mL 100 g/L的脱脂乳, 在35℃下保温10 min, 加入0.5 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的时间(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)^[11]。

$$SU = \frac{2400}{T} \times \frac{10}{0.5} \times D$$

式中 T——凝乳时间, s; D——稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 超声处理强度和um时间对皱胃酶提取活性的影响

在浸提液中加入10% NaCl, 以皱胃与提取液之比为1:10, 在不同超声强度下进行提取, 测定不同提取时间酶活性, 结果见表1。

收稿日期: 2003-08-26 修订日期: 2004-01-20

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目(2003C134); 陕西师范大学重点课题项目(2002-12)

作者简介: 张富新(1962-), 男, 陕西武功人, 副教授, 博士, 主要从事动物产品开发利用研究。西安市师大路1号 陕西师范大学食品工程系, 710062。Email: zhufuxin@hotmail.com

表 1 超声处理时间和强度对皱胃酶提取活性的影响

Table 1 Influence of the time and intensity of ultrasound treatment on the extracting activity of rennet		SU /g					
超声处理时间 /min	超声强度/W · cm ⁻²						
	对照	10	20	30	40	50	
10	21315 g	23834 e	31356 g	35245 g	38289 f	41250 h	45360 d
20	22380 g	28900 d	32978 f	37486 f	39877 f	47564g	49865 c
30	25874 f	30435 d	33164 ef	40134 e	48534 e	49630 g	52678 b
40	27453 e	32338 cd	33957 e	41653 e	50345 d	52554 f	56812 a
50	28087 e	33850 c	34986 d	42168 e	55479 c	56852 e	53245 b
60	30456 d	34645 c	35365 d	45634 d	56825 c	59855 b	49860 c
70	32198 cd	34985 c	38643 c	48245 c	58765 b	62768 a	46554 d
80	33925 c	35868 bc	39137 c	49125 c	59650 b	61045b	43458 e
90	34876 c	38546 a	41256 b	52579 b	61056 a	58786 c	41225 f
120	38456 b	41678 a	48655 a	53698 a	58765 b	56865 d	38690 g
2d	54368 a	—	—	—	—	—	—
3d	54215a	—	—	—	—	—	—

注:表中数据系 5 次测定平均值。相同字母表示 P> 0.05,不同字母表示 P< 0.01,纵向比较。

由表 1 可以看出,超声处理强度和提取时间对皱胃酶提取活性有很大的影响。从提取时间看,利用超声提取可明显缩短提取时间,传统提取方法提取 2 d 时,酶提取活性最大为 54368 SU/g (P< 0.01),在 40W/cm² 超声强度下,仅需 70 min 提取活性可达 62768 SU/g,并显著高于 60 min 和 80 min 提取活性(P< 0.01)。当超声强度小于 40W/cm² 时,皱胃酶提取活性随提取时间延长逐渐增大;当超声强度大于 40W/cm² 时,提取活性在较短时间内达到最大,在超声强度 50W/cm² 下提取时间超过 40 min 后,酶活性不仅未升高,反而有下降的趋势,这可能与超声处理时间过长、强度过大时,使已提取的酶部分失活^[9]。

从超声处理强度看,在提取时间较短时,随着超声强度的增加,皱胃酶提取活性逐渐升高。在较高的超声处理强度下,皱胃中酶的扩散速度加快,在较短时间内几乎完全提出,若继续提高超声强度,不仅不会增加酶的提取活性,反而会造成酶活性损失。

2.2 NaCl 浓度对皱胃酶提取活性的影响

在提取液中加入 NaCl,使其浓度为 0、2%、4%、6%、8%、10% 和 12%,在 40W/cm² 超声强度下提取 70 min,结果见图 2。

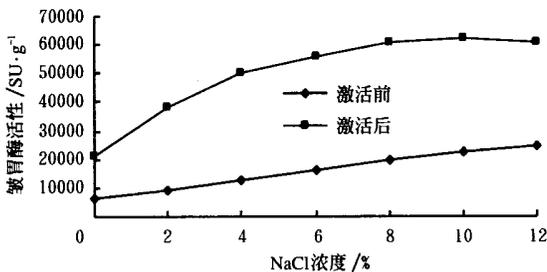


图 2 NaCl 浓度对皱胃酶提取活性的影响

Fig 2 Influence of NaCl concentration on the extracting activity of rennet

由图 2 可知,皱胃酶在激活前后提取活性差别较大,激活后活性比激活前活性明显提高(P< 0.01)。在

较低 NaCl 浓度下,激活后提取活性随 NaCl 浓度增加迅速提高,但在 NaCl 浓度大于 8% 时,提取后活性变化不大(P> 0.05)。激活前皱胃酶提取活性随 NaCl 浓度增加明显增大(P< 0.01),说明在 NaCl 存在下,超声处理对皱胃酶具有一定的激活作用,可使原来无活性酶原转变为活性的皱胃酶^[11]。

2.3 皱胃与提取液比例对皱胃酶提取活性的影响

在 60 g 皱胃中加入 10% 的 NaCl 提取液,使其比例为 1:5,1:10,1:15,1:20,1:25 和 1:30,在 40W/cm² 超声强度下提取 70 min。结果见图 3。

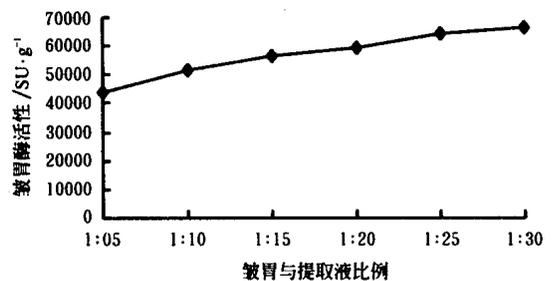


图 3 皱胃与提取液比例对皱胃酶提取活性的影响

Fig 3 Influence of the ratio of abomasum to extracting solution on extracting activity of rennet

由图 3 可以看出,随着皱胃与提取液比例增大,皱胃酶提取活性逐渐增加,但当提取比例大于 1:20 时,提取活性增加缓慢(P< 0.05);当提取比例为 1:20 时,提取活性占总活性的 95%,说明皱胃中绝大部分皱胃酶已被提出。此外,当提取比例过大时,虽然提取总活性有,提取较充分,但单位体积皱胃酶活性较低,不利于产品的保存及干燥。

2.4 提取液 pH 值对皱胃酶提取活性的影响

用 0.1mol/L HCl 和 0.1mol/L NaOH 将提取液 pH 值调至 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,在 40W/cm² 超声强度下提取 70 min,结果见图 4。

由图 4 可知,当提取液 pH 值为 5.0 时,皱胃酶提取活性最高为 63 300 SU/g;提取液 pH 值小于 5.0 时,

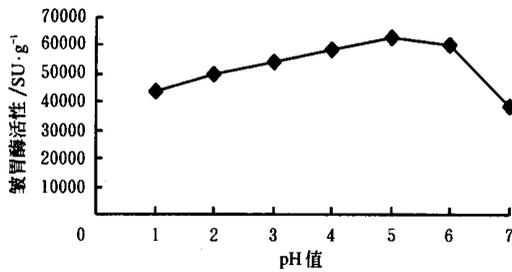


图 4 提取液 pH 值对皱胃酶提取活性的影响

Fig 4 Influence of extracting solution pH value on extracting activity of rennet

随着 pH 值提高, 提取活性逐渐增大 ($P < 0.01$), 而当提取液 pH 值大于 5.0 时, 提取活性逐渐下降, 特别是 pH 值大于 6.0 时提取活性迅速下降 ($P < 0.01$)。说明用超声提取皱胃酶时只有在一定 pH 值范围内才能获得较高的收率, pH 值过低或过高, 都会引起酶蛋白变性丧失活性。

2.5 超声提取工艺参数的优化

在以上单因素提取试验的基础上, 为了考察多因素的综合效应, 以超声提取时间, 超声强度, NaCl 浓度和皱胃与提取液比例为因素, 提取活性为试验指标, 进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验, 结果见表 2。

由表 2 可以看出, 超声处理因素对皱胃酶提取活性有明显的影 响。超声强度极差最大为 16 882, 其次为提取时间和 NaCl 浓度, 皱胃与提取液比例影响最小。方

差分析表明, 超声强度和提取时间两因素达到极显著水平 ($P < 0.01$), NaCl 浓度和皱胃与提取液比例达到显著水平 ($P < 0.05$), 说明在试验取值范围内, 超声强度和提取时间是影响皱胃酶提取的主要因素, NaCl 浓度和皱胃与提取液比例影响较小。

表 2 皱胃酶超声提取试验

Table 2 Extracting experiment of ultrasound for rennet

试验号	提取时间 /min A	超声强度 /W·cm ⁻² B	NaCl 浓度 /% C	皱胃/提取液之比 D	皱胃酶活性 /SU·g ⁻¹
1	1(60)	1(30)	1(6)	1(1:15)	41288 ± 264
2	1(60)	2(40)	2(8)	2(1:20)	68650 ± 257
3	1(60)	3(50)	3(10)	3(1:25)	62355 ± 316
4	2(70)	1(30)	2(8)	3(1:25)	51086 ± 265
5	2(70)	2(40)	3(10)	1(1:15)	70658 ± 308
6	2(70)	3(50)	1(6)	2(1:20)	65865 ± 215
7	3(80)	1(30)	3(10)	2(1:20)	50856 ± 267
8	3(80)	2(40)	1(6)	3(1:25)	54568 ± 225
9	3(80)	3(50)	2(8)	1(1:15)	57860 ± 189
<i>k</i> ₁	57431	47743	53907	56602	
<i>k</i> ₂	62536	64625	59199	61790	
<i>k</i> ₃	54361	62027	61290	56003	
<i>R</i>	8175	16882	7383	5787	

注: 提取液 pH 值为 5.0。表中数据系 4 次测定平均值。

为了更直观地观察各因素对皱胃酶提取效果的影响, 以试验因素为横坐标, 超声提取皱胃酶活性为纵坐标作因素与试验指标关系图。

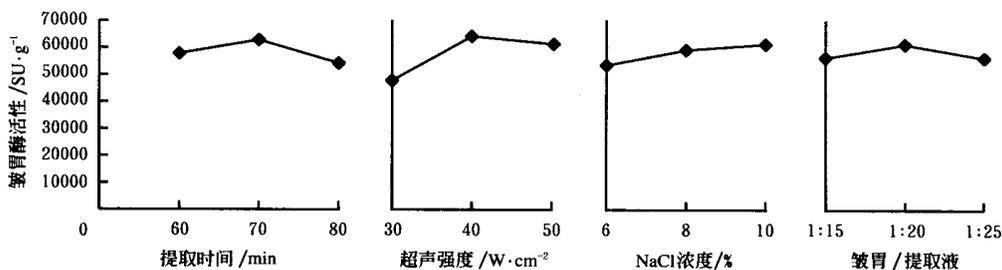


图 5 超声提取因素与皱胃酶提取活性关系图

Fig 5 Relationship between ultrasound extraction factors and rennet activity

由图 5 可以看出, 超声提取皱胃酶最优组合为 $A_2B_2C_3D_2$, 即超声提取时间为 70 min, 超声强度为 40 W/cm², NaCl 浓度为 10%, 皱胃与提取液比例为 1:20 时, 提取皱胃酶活性最高, 为验证此结果, 以 10% NaCl 溶液, 皱胃与提取液比例为 1:20, 在 40 W/cm² 超声强度下, 提取 70 min, 获得皱胃酶活性为 72000 SU/g, 证明提取技术参数合理可行, 可在实际生产中应用。

3 讨论

超声在生物活性物质的提取方面已广泛应用^[3-6]。超声提取作用主要是利用超声波在溶液中产生的空穴作用实现的。在提取过程中, 提取液中产生大量气泡并在瞬间破裂, 产生强烈的振动波, 使动植物组织软化, 损伤, 加快提取液在组织中的渗透和扩散, 使提取速度提高^[3]。这些作用与超声处理强度密切相关, 通常超声强

度越大, 提取速度越快, 但利用超声提取的物质, 尤其是象酶类具有一定的活性的物质, 易受环境因素的影响而失活。当超声处理强度过大时, 可使提取液温度升高, 特别是当超声产生的气泡破裂时局部温度更高, 造成酶热变性丧失活性, 同时气泡破裂时产生的强大压力, 也是影响酶活性的重要因素^[12]。Kim^[4,12]首次应用超声提取皱胃酶时发现, 超声强度和提取时间是影响皱胃酶提取的主要因素, 应用超声提取可大大缩短提取时间, 提高皱胃酶的提取效率。本试验中, 皱胃酶在超声强度为 40 W/cm² 下提取 70 min, 可达到最高活性, 同时发现超声对皱胃酶原具有一定的激活作用, 其激活机理有待进一步研究。

在超声提取中, 提取液 NaCl 含量, 皱胃与提取液比例以及提取液 pH 值也是影响提取效果的重要因素。

据 Zayas^[13]报道,在提取液 NaCl 浓度较低、皱胃与提取液比例较小时,可使超声波产生的空穴作用加强,NaCl 进入细胞的速度加快,提高酶的溶解性。但皱胃酶必须在一定的 NaCl 浓度及 pH 值下,才能达到最大限度的溶解^[9,14]。同时,皱胃与提取液比例也不宜过大,虽然其比例增大时,由于细胞内外的渗透压加大,酶的溶出速度加快,但所提取的皱胃酶单位体积活性较低。因此,在实际生产中,只有控制好影响提取因素的重要参数,才能取得较为理想的提取效果。

4 结 论

利用超声波提取皱胃酶可大大缩短提取时间,提取效率明显提高,其最佳工艺参数为:超声强度 40 W/cm²;提取时间 70 min;提取液 NaCl 浓度 10%;提取液 pH 值 5.0;皱胃与提取液比例 1:20。

[参 考 文 献]

- [1] Servaas V. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor, an overview [J]. *J Dairy Sci*, 1993, 76(1): 329- 350
- [2] Kovacs Proszk G. Comparison of the specificity and kinetic properties of 3 milk-clotting enzymes [J]. *J Dairy Res*, 1973, 40: 263- 272
- [3] Kim SM, Zayas J F. Comparative quality characteristics of chymosin extracts obtained by ultrasound treatment [J]. *J Food Sci*, 1991, 56(2): 406- 410
- [4] Kim SM, Zayas J F. Processing parameters of chymosin extraction by ultrasound [J]. *J Food Sci*, 1989, 54(3): 700 - 703
- [5] Zayas J F. Effect of ultrasonic treatment on the extraction of chymosin [J]. *J Dairy Sci*, 1986, 69: 1767- 1775
- [6] Kim SM, Zayas J F. Effects of ultrasound treatment on the properties of chymosin [J]. *J Food Sci*, 1991, 56(4): 926- 930
- [7] Wu Y H. studies on the extraction procedure and partial characterization of kid rennet [D]. Master Degree Thesis for North West Agricultural University, Shaanxi, 1999 (in Chinese).
武永厚 山羊凝乳酶提取技术及部分特性的研究 [D]. 杨凌: 西北农业大学硕士学位论文, 1999
- [8] Zhang F X. Influences of different factors on the coagulating activity of kid rennet [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2001, 17(14): 111- 114
张富新 不同因素对羔羊皱胃酶凝乳活性的影响 [J]. *农业工程学报*, 2001, 17(4): 111- 114
- [9] Zhang F X. studies on extraction technology of calf rennet [J]. *J Northwest Sic-Tech Univ of Agri and For (Nat. Sci. Ed)*, 2002, 30(1): 103- 106
张富新 小牛皱胃酶提取技术的研究 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2002, 30(1): 103- 106
- [10] Arima K, Shinier I, Gakuzo T. Milk-clotting enzymes from microorganism, part I. Screening test and identification of potent fungus [J]. *Agric Biol Chem*, 1967, 31(5): 540- 545
- [11] Foltmann B. Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin) [J]. *J Biochem*, 1969, 115(3): 39- 49
- [12] Kim SM, Zayas J F. Influence of ultrasound on the properties of chymosin and the ultrastructure of abomasum during chymosin extraction [J]. *J Food Processing and Preservation*, 1991, 15: 89- 100
- [13] Zayas J F. Properties and quality characteristics of rennin extracted by ultrasound [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, XXIX: 969- 975
- [14] Guo Y. Enzyme engineering [M]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1997 (in Chinese).

Experimental study on extracting rennet by ultrasound treatment

Zhang Fuxin, Chen Jinping, Li Linqiang

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

Abstract: Using 1~2 weeks calf abomasum as material, influences of such factors as ultrasound intensity, extraction time, NaCl concentration, pH value of extraction solution and ratio of abomasum to extraction solution on extracting activity were studied by ultrasound treatment. The experimental results showed that as compared with the traditional method, the ultrasound treatment method resulted in a significant reduction of extraction time and increases in rennet activity. The optimal parameters for the extraction of rennet by ultrasound treatment were as follows: ultrasound intensity 40 W/cm², extraction time 70 min, NaCl concentration 10%, pH value of extraction solution 5.0, the ratio of abomasum to extraction solution 1:20.

Key words: ultrasound treatment; rennet; extraction; enzyme activity; ultrasound intensity