

细菌凝乳酶干酪素生产工艺参数优化

张卫兵¹, 杨敏², 梁琪¹, 张炎¹,
陈历俊³, 姜铁民³, 任发政^{1,4*}

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学理学院, 兰州 730070; 3. 北京三元食品股份有限公司, 北京 100085; 4. 中国农业大学教育部功能乳品重点实验室, 北京 100083)

摘要:以新鲜牛乳为原料、细菌凝乳酶作凝固剂, 先采用单因素试验研究了凝乳温度、pH 值、CaCl₂添加量和凝乳酶添加量 4 个因素对凝乳效果的影响, 然后通过 Box-Behnken 设计进一步优化了细菌凝乳酶干酪素生产工艺参数。根据试验结果, 采用逐步回归的方法进行二次回归分析, 得到相应的回归方程式, 模型的 R² 值为 0.98%, 说明回归方程的拟合程度良好。采用 Design-Expert 软件预测得到干酪素得率的最大估计值为 3.534%, 此时因素 X₁、X₂、X₃ 的对应值分别为 0.306、0.216、0.342, 3 个因素的对应水平为: 温度 36.53℃、pH 值 6.216、凝乳酶添加量为 0.368 mL。采用上述优化条件进行验证试验时将温度设定为 36.5℃、pH 值设定为 6.2、凝乳酶添加量设定为 0.37 mL。验证试验结果表明, 在此条件下凝乳酶干酪素的得率为 3.527%±0.02%, 与理论预测值相比, 相对误差为 0.19%。分别测定了细菌凝乳酶干酪素和小牛皱胃酶干酪素的水分、灰分和蛋白质等理化指标, 结果表明细菌凝乳酶干酪素所含水分、灰分和蛋白质含量比小牛皱胃酶干酪素高, 但差异不显著 (P>0.05), 而脂肪含量比小牛皱胃酶干酪素低, 差异也不显著 (P>0.05)。将 2 种凝乳酶干酪素进行红外光谱扫描, 发现小牛皱胃酶干酪素和细菌凝乳酶干酪素的特征峰基本一致。以上结果表明, 2 种凝乳酶干酪素品质差异不显著, 说明细菌凝乳酶可作为小牛皱胃酶的替代品用于凝乳酶干酪素的生产。研究结果可为细菌凝乳酶的应用提供技术依据。

关键词: 优化, 酶, 干酪素, 细菌凝乳酶, 工艺参数

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2013.22.035

中图分类号: TS252

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2013)-22-0292-07

张卫兵, 杨敏, 梁琪, 等. 细菌凝乳酶干酪素生产工艺参数优化[J]. 农业工程学报, 2013, 29(22): 292-298.
Zhang Weibing, Yang Min, Liang Qi, et al. Optimization of technology parameters for casein production with bacteria rennet[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(22): 292-298. (in Chinese with English abstract)

0 引言

干酪素是白色或微黄色, 无臭无味的颗粒状物质, 主要成分是酪蛋白。干酪素用于造纸、皮革、乳胶、国防工业及塑料、油漆、化妆品、中草药分析、水果保鲜等行业^[1]。干酪素的种类包括乳酸干酪素、盐酸干酪素和凝乳酶干酪素。由于乳酸干酪素酸度低, 盐酸干酪素含有较多的 Cl⁻, 它们的用途受到一定的限制^[2]。凝乳酶干酪素由于具有持久的乳香味和良好的融化性、拉伸性和凝胶性, 同时具有良好的染色附着力和较强的抗挤压力, 用途越来越广泛^[3]。

凝乳酶干酪素生产中的使用的凝乳酶按其来源可分为: 动物凝乳酶(皱胃酶)、植物凝乳酶(木瓜蛋白酶)和微生物凝乳酶等。不同来源的凝乳酶对干酪素的得率、理化特性和功能特性都有一定的影响。皱胃酶是从反刍动物幼畜第四胃(皱胃)中提取出的一种凝乳酶, 具有较高的牛乳凝结能力, 利用它能得到没有苦味、组织状态适宜且得率较高的干酪素, 但其来源有一定的限制^[4-5]。微生物酶的生产则不受原料供应的影响, 生产成本较低。目前, 国外利用微小毛霉、米黑毛霉和黑曲霉等发酵生产微生物凝乳酶, 并将其成功应用于干酪和干酪素的生产中。20 世纪 80 年代后期, 中国也逐渐深入对微生物凝乳酶进行研究。张红梅等比较了数种微生物产生的凝乳酶酶活力大小和产酶能力, 认为其有良好的应用前景^[6]; 马俊等研究了微生物凝乳酶的性质, 认为多种微生物凝乳酶可以替代小牛皱胃酶^[7]。本实验室前期筛选得到了优良产凝乳酶细菌, 并对其产酶条件和酶学性质等进行了研究^[8-13]。

收稿日期: 2013-05-29 修订日期: 2013-09-22

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2011AA100903); “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD28B07); 甘肃农业大学创新基金(GAU-CX1107)

作者简介: 张卫兵(1974-), 男, 陕西岐山人, 博士, 副教授, 研究方向: 乳品微生物和酶工程。兰州 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 730070。Email: 45330301@qq.com

*通信作者: 任发政(1962-), 男, 辽宁人, 博士生导师, 教授, 研究方向: 畜产品加工。兰州 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 730070。Email: renfazheng@263.net

本研究以荷斯坦牛乳为原料,采用单因素试验和 Box-Behnken 设计优化细菌凝乳酶干酪素制备工艺,确定最佳工艺参数,同时以相同条件下采用小牛皱胃酶制备的干酪素为对照,为细菌凝乳酶的应用提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

细菌凝乳酶,由甘肃省功能乳品工程实验室用解淀粉芽孢杆菌发酵制备,酶活为 1 000 SU/mL;牛乳,甘肃农业大学奶牛场。

1.1.2 试剂

盐酸、氢氧化钠、纯溴化钾、氯化钙,均为分析纯(天津市光复精细化工研究所)。

1.2 仪器与设备

HH-SZ65 型数显恒温水浴锅(北京医疗设备厂);UV-5100 紫外-可见分光光度计(上海分析仪器有限公司);PHS-3C 型数显酸度计(上海精密科学仪器有限公司);VERTEX 70V 真空傅里叶红外光谱仪(德国布鲁克仪器有限公司);TGL-20M 型高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);TDDSM 低速离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细菌凝乳酶干酪素的生产工艺

工艺流程:牛乳→脱脂→巴氏杀菌→冷却→加酶→凝乳→洗涤→烘干→成品^[14]。

技术要点如下:

1) 脱脂:将牛乳于 25℃、3 500 r/min 下离心 20 min,去除上部的固体脂肪,分离得到的即为脱脂乳。

2) 杀菌:将脱脂乳加热到 63℃并保温 30 min。

3) 凝乳:按照试验设计,调整凝乳时的温度、pH 值、加酶量、CaCl₂添加量,适当搅拌以使酪蛋白充分凝聚沉淀,凝乳时间控制在 20~30 min。

4) 洗涤:将酪蛋白凝聚物排出乳清后,加入与脱脂乳等量的温水洗涤,再以冷水洗涤 2 次,以除去乳清蛋白和乳糖等。

5) 烘干:将得到的干酪素在 70~80℃下通风烘干,粉碎。

6) 得率按下式计算:凝乳酶干酪素得率=所得凝乳酶干酪素的质量/脱脂牛奶原料质量×100%。

1.3.2 细菌凝乳酶凝乳条件优化

1) 温度对凝乳效果的影响:取 500 mL 杀菌后

的脱脂乳,添加凝乳酶 0.4 mL(加入前在 30℃水浴中进行活化),调整 pH 值为 6.3,并加入 4% CaCl₂ 溶液 5 mL,调节水浴锅的加热温度分别为 25、30、35、40、45、50℃,适当搅拌后,保温 30 min,凝乳后洗涤、烘干,称质量并计算得率。

2) pH 值对凝乳效果的影响:取 500 mL 杀菌后的脱脂乳,添加凝乳酶 0.4 mL(加入前在 30℃水浴中进行活化),用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 将 pH 值分别调整为 5.4、5.7、6.0、6.3、6.6、6.9,并加入 4% CaCl₂ 溶液 5 mL,调节水浴锅的加热温度为 40℃,适当搅拌后,保温 30 min,凝乳后洗涤、烘干,称质量并计算得率。

3) 凝乳酶添加量对凝乳效果的影响:取 500 mL 杀菌后的脱脂乳,添加凝乳酶量分别为:0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL(加入前在 30℃水浴中进行活化),调整 pH 值为 6.3,并加入 4% CaCl₂ 溶液 5 mL,调节水浴锅的加热温度为 40℃,适当搅拌后,保温 30 min,凝乳后洗涤、烘干,称质量并计算得率。

4) CaCl₂ 添加量对凝乳效果的影响:取 500 mL 杀菌后的脱脂乳,添加凝乳酶 0.4 mL(加入前在 30℃水浴中进行活化),调整 pH 值为 6.3,并分别加入 4% CaCl₂ 溶液 1、2、3、4、5、6 mL,调节水浴锅的加热温度为 40℃,适当搅拌后,保温 30 min,凝乳后洗涤、烘干,称重并计算得率。

5) 工艺参数的综合优化:以单因素试验筛选得到的影响显著的因素作为试验因子,应用 Design-Expert 软件设计 Box-Behnken 试验并进行响应面分析,以确定各因子的最佳水平。

1.3.3 理化指标的测定

参考国标 GB5009,测定细菌凝乳酶干酪素和小牛皱胃酶干酪素的理化指标并比较。水分测定按照 GB/T 5009.3-2003 进行测定。灰分测定按照 GB/T 5009.4-2003 进行测定。总氮测定按照 GB/T5009.5-2003 进行测定。脂肪测定按照 GB/T5009.6-2003 进行测定^[15]。

1.3.4 红外光谱分析

将 1.5 mg 凝乳酶干酪素与 200 mg 纯溴化钾研细均匀,置于模具中,用 7×10^7 Pa 压力在油压机上压成透明薄片,然后用红外光谱仪进行扫描^[3]。

2 结果与分析

2.1 各工艺参数对得率的单因素试验结果

1) 温度对酶促反应的影响有两方面:一方面是当温度升高时酶促反应速度会加快;另一方面是随着温度的升高,酶逐渐变性。酶反应的最适温度就是这两种过程的平衡效果,在低于最适温度时,

前一种效应为主,因而酶的活性增加;在高于最适温度时,后一种效应为主,因而酶的活性迅速降低^[16]。本试验中随着温度升高干酪素得率先上升后下降,在 35℃时达到最大值,当温度超过 35℃时,干酪素得率随着温度的上升逐渐下降。本试验中细菌凝乳酶的处理温度比韩玲等^[17]报道微小毛霉、皱胃酶和木瓜凝乳酶在干酪素中的作用温度低,在生产中可以降低成本。

2) pH 值过高或过低都会影响酶蛋白的结构,甚至使酶变性而失活;当 pH 值变化较小时,酶虽

不变性,但活力受影响,因为会影响酶分子的解离状态,最适值与酶活中心结合底物的基因及参与催化基团有关,往往只有一种解离状态最有利于底物结合,在此条件下酶活最高^[18]。本试验中,随着 pH 值的升高干酪素得率先上升后下降,当 pH 值为 6.0 时,干酪素的得率最高,pH 值超过 6.0 时,随着 pH 值的升高得率逐渐下降。本试验中细菌凝乳酶的处理温度比韩玲等报道微小毛霉、皱胃酶和木瓜凝乳酶在干酪素生产中应用的 pH 值略低,说明细菌凝乳酶的最适 pH 值与其他几种酶都有差别^[17]。

表 1 不同凝乳条件对干酪素得率的影响

Table 1 Effect of different conditions for milk coagulation on yield of rennet casein

| 温度 Temperature/℃ | 得率 Yield /% | pH 值 pH value | 得率 Yield /% | 加酶量 Addition volume of enzyme/mL | 得率 Yield /% | 4% CaCl ₂ 添加量 Addition volume of 4%CaCl ₂ /mL | 得率 Yield /% |
|---------------------|------------------------|------------------|------------------------|--|------------------------|---|------------------------|
| 25 | 2.13±0.02 ^a | 5.4 | 2.41±0.02 ^c | 0.1 | 1.43±0.02 ^a | 1 | 2.84±0.01 ^a |
| 30 | 2.47±0.02 ^c | 5.7 | 2.59±0.02 ^d | 0.2 | 2.05±0.01 ^c | 2 | 2.85±0.03 ^a |
| 35 | 3.39±0.03 ^f | 6.0 | 2.92±0.03 ^e | 0.3 | 3.23±0.02 ^f | 3 | 2.86±0.02 ^a |
| 40 | 2.80±0.04 ^e | 6.3 | 2.90±0.02 ^e | 0.4 | 2.32±0.01 ^d | 4 | 2.87±0.03 ^a |
| 45 | 2.74±0.02 ^d | 6.6 | 1.97±0.02 ^b | 0.5 | 2.42±0.02 ^e | 5 | 2.88±0.02 ^a |
| 50 | 2.30±0.01 ^b | 6.9 | 1.83±0.01 ^a | 0.6 | 1.89±0.01 ^b | 6 | 2.85±0.01 ^a |

注:结果表示为 Mean±SD 形式,采用 SPSS19.0 统计软件用 LSD 法对最后一列数据进行显著性分析 ($P < 0.05$); 进行单因素试验时,其他条件固定为温度 40℃、pH 值 6.3、加酶量 0.4 mL、4% CaCl₂ 5 mL,添加酶的活力为 1 000 SU/mL。

Note: Data was expressed means and standard deviation, the last column data were analyzed by LSD method using SPSS19.0 software; In the single factor experiment, the other conditions were as follows: temperature 40℃, pH value 6.3, addition volume of enzyme 0.4 mL, addition volume of 4% CaCl₂ 5 mL, and the milk-clotting activity of additional enzyme was 1000 SU/mL.

3) 酶浓度过高或过低对凝乳效果均不好,酶具有凝结和分解作用,浓度过高凝结后剩余的酶会与酪蛋白结合,使凝块重新散开,酶浓度过低则凝结不完全达不到预期效果^[19]。本试验中当凝乳酶添加量增大时,干酪素得率先上升后下降,当加入 0.3 mL 凝乳酶 (300 SU/mL) 时,干酪素的得率最高,超过 0.3 mL 时,随着凝乳酶添加量的升高得率逐渐下降。

4) Ca²⁺对凝乳的影响主要是因为 Ca²⁺与酪蛋白结合使酪蛋白所带电荷减少,同时 Ca²⁺可形成磷酸钙的沉淀从而促使 H⁺的释放,导致牛乳 pH 值降低, Ca²⁺还可以保护凝酶活性,但 Ca²⁺浓度超过一定量时对凝乳效果影响较小^[19]。本试验中干酪素得率在 2.84%~2.88% 的范围内,表明 CaCl₂ 对干酪素得率的影响不显著 ($P < 0.01$)。

2.2 Box-Benhnken 试验

综合单因素试验结果,在 500 mL 杀菌后的脱脂乳中加入 4% CaCl₂ 4 mL,以对得率影响显著的因素温度、pH 值和凝乳酶添加量作为试验因子,应用 Design-Expert 软件设计 Box-Benhnken 试验,Box-Benhnken 试验因素水平见表 2, Box-Benhnken 试验设计及结果见表 3。

表 2 Box-Benhnken 试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of Box-Benhnken

| 水平 Level | 因素 Factor | | |
|-------------|----------------------|------------------|---|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ |
| | 温度 Temperature /℃ | pH 值 pH value | 酶添加量 Addition volume of enzyme/mL |
| -1 | 30 | 5.0 | 0.1 |
| 0 | 35 | 6.0 | 0.3 |
| +1 | 40 | 7.0 | 0.5 |

表 3 Box-Benhnken 试验设计及结果

Table 3 Experimental design and result of Box-Benhnken

| 试验号 Test number | 因素 Factor | | | 得率 Yield/% |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 2.46 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 2.85 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 2.71 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 3.16 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 2.65 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 2.57 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 2.74 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 3.21 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 2.63 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 2.61 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 2.78 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 3.11 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 3.48 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 3.47 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 3.45 |

根据试验结果，采用逐步回归的方法进行二次回归分析，得到相应的回归方程式如下：

$$Y=3.47+0.15X_1+0.11X_2+0.17X_3+0.02X_1X_2+0.14X_1X_3+0.09X_2X_3-0.33X_1^2-0.34X_2^2-0.34X_3^2$$

对回归模型进行方差分析，结果表明：该方程回归显著，模型的 R^2 值为 98.0%，说明回归方程的拟合程度良好。

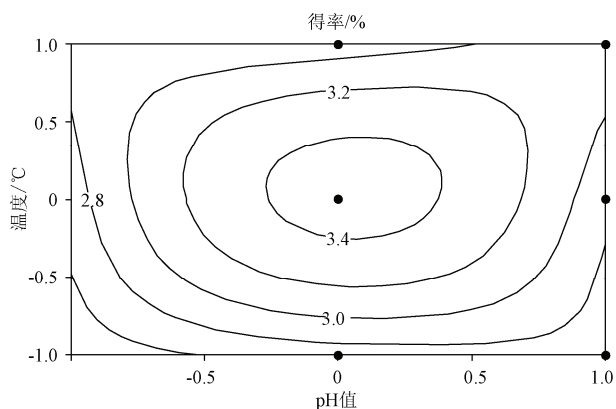
表 4 二次多项回归模型方程系数显著性检验
Table 4 Significance test of regressive coefficient of regression equation

| 变异来源 Source | 系数 Sum of squares | 自由度 df | 标准差 Mean square | F 值 F value | P 值 P value |
|-------------------|----------------------|-----------|--------------------|----------------|----------------|
| 模型 Model | 1.73 | 9 | 0.19 | 27.92 | 0.0009 |
| X_1 | 0.19 | 1 | 0.19 | 27.49 | 0.0033 |
| X_2 | 0.095 | 1 | 0.095 | 13.76 | 0.0139 |
| X_3 | 0.24 | 1 | 0.24 | 34.61 | 0.0020 |
| X_1X_2 | 0.0009 | 1 | 0.0009 | 0.13 | 0.7323 |
| X_1X_3 | 0.076 | 1 | 0.076 | 10.99 | 0.0211 |
| X_2X_3 | 0.031 | 1 | 0.031 | 4.45 | 0.0886 |
| X_1^2 | 0.40 | 1 | 0.40 | 58.75 | 0.0006 |
| X_2^2 | 0.43 | 1 | 0.43 | 62.36 | 0.0005 |
| X_3^2 | 0.44 | 1 | 0.44 | 62.28 | 0.0005 |
| 残差 Residual | 0.034 | 5 | 0.0068 | | |
| 失拟 Lack of Fit | 0.0339 | 3 | 0.0113 | 48.46 | 0.0203 |
| 纯误差 Pure Error | 0.00046 | 2 | 0.0002 | | |
| 总和 Total | 1.763 | 14 | | | |

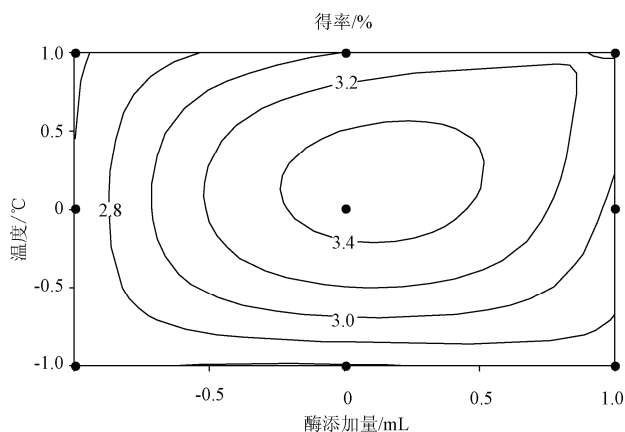
由表 4 可以看出，方程中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 对 Y 值的影响显著，表明 3 个因素温度、pH 值、凝乳酶添加量对得率都有显著影响，而且与响应值间不是简单的线性关系。

3 个因素之间的交互作用情况见图 1。图 1a 为当凝乳酶添加量位于中心水平时，凝乳温度和 pH 值对干酪素得率影响的等高线图，由图可以直观地看出凝乳温度和 pH 的交互作用不显著 ($P>0.05$)。图 1b 为当凝乳 pH 值位于中心水平时，凝乳温度和凝乳酶添加量对干酪素得率影响的等高线图，由图可以看出凝乳温度和凝乳酶添加量交互作用显著 ($P<0.05$)。图 1c 为当凝乳温度位于中心水平时，凝乳 pH 值和凝乳酶添加量对干酪素得率影响的等高线图，由图可以看出凝乳 pH 值和凝乳酶添加量的交互作用也不显著 ($P>0.05$)。

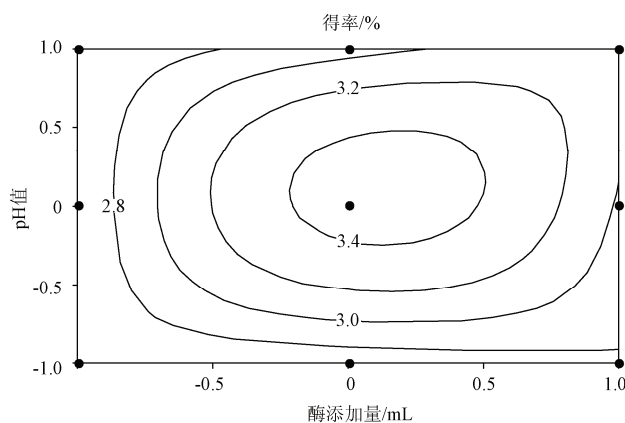
采用 Design-Expert 软件预测得到干酪素得率的最大估计值为 3.534%，此时因素 X_1 、 X_2 、 X_3 的对应值分别为 0.306、0.216、0.342，3 个因素的对应水平为：温度 36.53℃、pH 值 6.216、凝乳酶添加量为 0.368 mL。



a. 温度与 pH 值交互作用等高线图
a. Contour plot for interaction effects of temperature and pH of coagulation



b. 温度与凝乳酶添加量交互作用等高线图
b. Contour plot for interaction effects of temperature of coagulation and addition of rennet



c. pH 值与凝乳酶添加量交互作用等高线图
c. Contour plot for interaction effects of pH and addition of rennet

图 1 温度、pH 值与凝乳酶添加量交互作用等高线图
Fig.1 Interaction effects of temperature, pH of coagulation and addition of rennet

为检验预测结果的可靠性，采用上述优化条件进行验证试验。为便于实际操作，将温度设定为 36.5℃、pH 值设定为 6.2、凝乳酶添加量设定为 0.37 mL 进行 3 次平行试验，干酪素得率为 3.527%±0.02%，与理论预测值基本一致，因此，基于响应曲面法所得的干酪素制备的工艺参数准确可靠。

2.3 理化指标比较

分别测定细菌凝乳酶干酪素和小牛皱胃酶干酪素的水分、灰分和蛋白质等理化指标, 结果见表5。

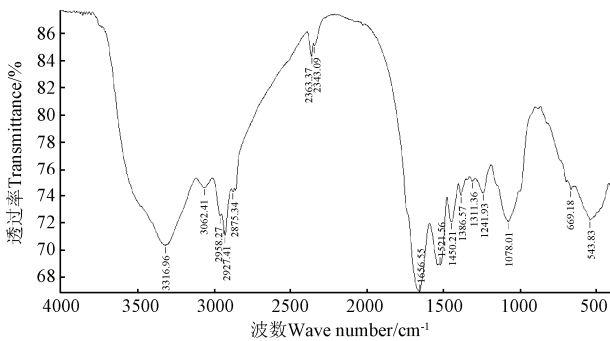
表5 产品理化指标

| 样品 Sample | 水分 Water | 灰分 Ash | 蛋白质 Protein | 脂肪 Fat |
|---|-------------|-----------|----------------|-----------|
| 细菌凝乳酶干酪素 Rennet casein produced with bacterial rennet | 6.85±0.02 | 5.73±0.03 | 86.89±0.01 | 0.96±0.02 |
| 小牛皱胃酶干酪素 Rennet casein produced with calf rennet | 6.82±0.01 | 5.68±0.02 | 86.82±0.02 | 0.99±0.01 |

由表5可以看出, 细菌凝乳酶干酪素所含水分比小牛皱胃酶干酪素高0.03%, 差异不显著 ($P>0.05$); 灰分含量比小牛皱胃酶干酪素高0.05%, 差异不显著 ($P>0.05$); 蛋白质含量比小牛皱胃酶干酪素高0.07%; 脂肪含量比小牛皱胃酶干酪素低0.03%, 差异不显著 ($P>0.05$)。总体而言, 2种干酪素的各指标含量差异均不显著, 且均符合标准要求。

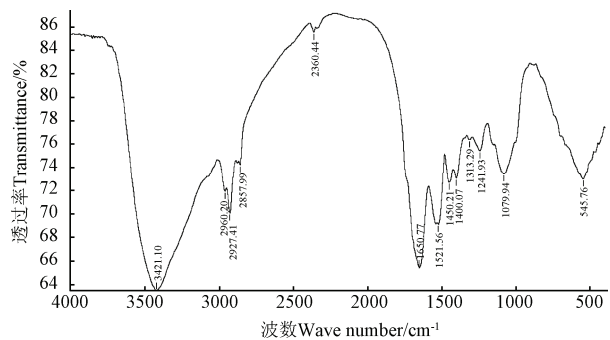
2.4 红外光谱分析

将得到细菌凝乳酶干酪素样品和小牛皱胃酶干酪素样品红外光谱仪进行扫描, 结果见图2。



a. 小牛皱胃酶干酪素红外光谱扫描图

a. Infrared spectral curve of rennet casein using calf rennet as coagulant



b. 细菌凝乳酶干酪素红外光谱扫描图

b. Infrared spectral curve of rennet casein using bacteria rennet as coagulant

图2 2种凝乳酶干酪素红外光谱比较

Fig.2 Comparison of infrared spectral curve of two kinds of rennet casein

比较图2a和图2b, 可以看出小牛皱胃酶干酪素和细菌凝乳酶干酪素的特征峰位置、峰的强弱、峰型基本一致。例如它们在 $3500\sim 3100\text{ cm}^{-1}$ 处有N-H伸缩振动吸收峰, $3000\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ 处有C-H饱和振动吸收峰, $1900\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ 处有C=O伸缩振动吸收峰, $1465\sim 1340\text{ cm}^{-1}$ 处有C-H弯曲振动吸收峰, $1350\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 处有C-N伸缩振动吸收峰, 这些都是蛋白质分子的特征吸收峰, 说明这两种干酪素都是由蛋白质分子组成的; 两者在 $690\sim 515\text{ cm}^{-1}$ 处有C-Cl伸缩振动吸收峰, 这是由于2种干酪素制备过程中加入的Cl⁻引起的。

3 讨论

凝乳酶干酪素生产中的使用的凝乳酶主要有小牛皱胃酶、木瓜蛋白酶和微生物凝乳酶。木瓜蛋白酶由于水解力过强, 因而使得在工业化生产中产品造粒困难^[17]。本试验中使用细菌凝乳酶代替了小牛皱胃酶, 从红外光谱扫描结果可以看出2种凝乳酶干酪素产品的特征峰位置、峰的强弱、峰型基本一致, 另外2种凝乳酶干酪素产品的水分、灰分、蛋白质、脂肪等理化指标测定结果差异不显著, 而且都能达到凝乳酶干酪素产品品质要求, 说明细菌凝乳酶可以作为小牛皱胃酶的替代品应用于凝乳酶干酪素的工业化生产。本试验中所使用的细菌凝乳酶, 是利用麸皮汁作为发酵培养基, 通过解淀粉芽孢杆菌液体发酵生产的凝乳酶^[8,11-12]。由于解淀粉芽孢杆菌产酶活力高、液体发酵过程容易控制、不易染菌, 因而生产成本较低。以相同活力的酶进行比较, 细菌凝乳酶的成本为小牛皱胃酶的1/7, 所以将其作为凝乳剂用于凝乳酶干酪素的工业化生产时更能节约成本, 缓解小牛皱胃酶来源不足等问题。另外由于这种细菌凝乳酶在干酪素生产中的最适作用温度比已报道微小毛霉($60\sim 65^\circ\text{C}$)、皱胃酶(60°C)和木瓜凝乳酶($70\sim 80^\circ\text{C}$)的最适作用温度低^[17], 因而在工业化生产中还可以节约能源。

4 结论

1) 以凝乳温度、pH值、CaCl₂添加量和凝乳酶添加量4个因素为试验因子, 以得率为指标, 通过单因素试验和Box-Behnken设计筛选的最佳工艺参数。经过优化得到的最优工艺参数为: 凝乳温度为 36.5°C 、pH值为6.2、每500 mL牛乳中加入4 mL 4% CaCl₂溶液、0.37 mL细菌凝乳酶。在此工艺条件下, 验证试验表明细菌凝乳酶干酪素的得率可以达到 $3.527\%\pm 0.02\%$ 。

2) 经理化检验和红外光谱分析, 制得的干酪素与相同条件下采用小牛皱胃酶制备的干酪素品

质差异不显著, 说明细菌凝乳酶可作为小牛皱胃酶的替代品用于干酪素加工。

[参 考 文 献]

- [1] 郑恒光, 陈君琛, 汤葆莎, 等. 微小毛霉凝乳酶干酪素的制备及应用性能研究[J]. 福建农业学报, 2011, 26(3): 462—465.
Zheng Henguang, Chen Junchen, Tang Baosha, et al. Optimization of process parameters for the preparation of rennet casein[J]. Fujian Journal of Agricultural Science, 2011, 26(3): 462—465. (in Chinese with English abstract)
- [2] 杨勤, 张玉珍, 林茂荣. 胃蛋白酶干酪素生产工艺研究[J]. 中国奶牛, 2009(2): 46—48.
Yang Qin, Zhang Yuzhen, Lin Maorong. Study on the production process of pepsin casein[J]. China Dairy Cattle, 2009(2): 46—48. (in Chinese with English abstract)
- [3] 甘伯中, 常海军, 余群力, 等. 牦牛“曲拉”干酪素脱色工艺优化[J]. 农业工程学报, 2006, 22(10): 203—207.
Gan Bozhong, Chang Haijun, Yu Qunli, et al. Optimization of the technology for the decoloration of yak milk casein “Qula”[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2006, 22(10): 203—207. (in Chinese with English abstract)
- [4] 卢蓉蓉, 黄艳艳. 皱胃酶酶学性质的研究[J]. 食品科技, 2002(5): 14—16.
Lu Rongrong, Huang Yanyan. Study on the enzymatic properties of calf rennet[J]. Food Science and Technology, 2002(5): 14—16. (in Chinese with English abstract)
- [5] 卢蓉蓉, 张国农, 方民, 等. 皱胃酶提取工艺的研究[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(1): 3—6.
Lu Rongrong, Zhang Guonong, Fang Ming. et al. Extraction of calf rennet[J]. China Dairy Industry, 2002, 30(1): 3—6. (in Chinese with English abstract)
- [6] 张红梅. 凝乳酶的研究进展[J]. 同济大学学报: 医学, 2004, 25(3): 254—257.
Zhang Hongmei. Research advancement of rennet[J]. Journal of Tongji University: Medical Science, 2004, 25(3): 254—257. (in Chinese with English abstract)
- [7] 马俊, 姜成林, 郭光远, 等. 微生物凝乳酶的研究 II. 酶学性质[J]. 微生物学通报, 1989, 29(6): 340—341.
Ma Jun, Jiang Chenglin, Guo Guangyuan, et al. Study on microbial rennet II. enzyme property[J]. Microbiology China, 1989, 29(6): 340—341. (in Chinese with English abstract)
- [8] Zhang Weibing, He Xiaoling, Liu Hongna, et al. Statistical optimization of medium components for milk-clotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* D4 using wheat bran-an agro-industry waste[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 23(8): 1084—1091.
- [9] 张卫兵, 甘伯中, 梁琪, 等. 一株产凝乳酶解淀粉芽孢杆菌的筛选、鉴定及酶学性质[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 172—176, 180.
Zhang Weibing, Gan Bozhong, Liang Qi, et al. Study on isolation, identification of *Bacillus amyloliquefaciens* producing chymosin and enzyme properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(7): 172—176, 180. (in Chinese with English abstract)
- [10] 宋曦, 甘伯中, 贺晓玲, 等. 天祝放牧牦牛生活环境土壤中一株产凝乳酶细菌[J]. 食品科学, 2009, 30(11): 158—162.
Song Xi, Gan Bozhong, He Xiaoling, et al. Separation and identification of a chymosin producing bacterium from soil of yak grazing district in Tianzhu country of Gansu province [J]. Food Science, 2009, 30(11): 158—162. (in Chinese with English abstract)
- [11] He Xiaoling, Ren Fazheng, Guo Huiyuan, et al. Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2010, 28(1): 203—208.
- [12] He Xiaoling, Zhang Weibing, Ren Fazheng, et al. Screening fermentation parameters of the milk-clotting enzyme produced by newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* D4 from the Tibetan Plateau in China[J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(1): 357—365.
- [13] 张卫兵, 宋曦, 贺晓玲, 等. *Bacillus licheniformis* 产凝乳酶培养基的优化[J]. 中国酿造, 2011(2): 70—73.
Zhang Weibing, Song Xi, He Xiaoling, et al. Optimization of culture media of *Bacillus licheniformis* with high yield of chymosin[J]. China Brewing, 2011(2): 70—73. (in Chinese with English abstract)
- [14] 甘伯中, 纪银莉. 凝乳酶干酪素的生产工艺及功能特性[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(5): 16—18.
Gan Bozhong, Ji Yinli. Production and function characteristics of rennet casein[J]. China Dairy Industry, 2008, 36(5): 16—18. (in Chinese with English abstract)
- [15] GB5009-2010, 食品安全国家标准[S].
- [16] 郭勇. 酶工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004: 6—12.
- [17] 韩玲, 张福娟, 甘伯中, 等. 牦牛“曲拉”干酪素凝乳酶的选择及工艺参数优化[J]. 农业工程学报, 2007, 23(7): 226—229.
Han Ling, Zhang Fujuan, Gan Bozhong, et al. Processing technology for purifying casein Made from Yak “Qula”[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2007, 23(7): 226—229. (in Chinese with English abstract)
- [18] 王鹏杰, 甘伯中, 杨敏, 等. 酸凝乳凝胶形成机理的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 420—423.
Wang Pengjie, Gan Bozhong, Yang Min, et al. Research progress in mechanism of acid-induced milk gels[J].

- Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(13): 420—423. (in Chinese with English abstract)
- [19] 宋云, 李立钊, 崔雅洁, 等. 不同因素对凝乳酶活力的影响[J]. 中国乳品工业, 1995, 23(3): 124—128.

Song Yun, Li Lizhao, Cun Yajie, et al. Influence of different factors on the activities of milk-clotting enzyme[J]. China Dairy Industry, 1995, 23(3): 124—128. (in Chinese with English abstract)

Optimization of technology parameters for casein production with bacteria rennet

Zhang Weibing¹, Yang Min², Liang Qi¹, Zhang Yan¹, Chen Lijun³, Jiang Tiemin³, Ren Fazheng^{1,4*}

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

3. Beijing Sanyuan Foods Co. Ltd., Beijing 100085, China; 4. Key Laboratory of Functional Dairy,

College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In this paper, rennet casein was prepared from fresh milk using bacteria rennet as a coagulant and the technology was optimized by a single factor test and response surface methodology. First, temperature, pH value, and an addition volume of enzyme were shown to have significant effects on the yield of rennet casein using the single factor experiment. Subsequently, three significant independent variables were selected and further optimized using the box-behnken design to determine their optimal levels. Via multiple regression analysis on the experimental data using Design-Expert software, the following second-order polynomial equation was obtained. The regression coefficients and the analysis of the variance indicated the high significance of the model. The highest R^2 value (0.98) was also in good agreement with the experimental results and theoretical values predicted by the model. From equations derived by differentiation, the optimal values of X_1 , X_2 , and X_3 in the coded units were found to be 0.306, 0.216, and 0.342, respectively. Correspondingly, we obtained the maximum point of the model, which was 36.53 °C of temperature, 6.216 of pH value, and 0.368 mL of additional volume of enzyme, respectively. The maximum predicted yield of rennet casein was 3.534%. The optimal coagulation parameters in the validated experiment were set as follows: temperature 36.5 °C, pH 6.2 and 4 mL 4% CaCl₂, 0.37 mL bacteria rennet per 500 mL milk. Under the optimized conditions, the yield of rennet casein reached 3.527% ± 0.02% and the relative error was 0.19% compared with the predicated value, showing that the response surface method are effective to optimize culture conditions. The contents of water, ash, protein, and fat of rennet casein produced with bacterial rennet and calf rennet were measured. The results showed the contents of water, ash, and protein of rennet casein produced with bacterial rennet were higher than that of calf rennet, but not significantly different ($P > 0.05$), the contents of fat of rennet casein produced with bacterial rennet were lower than that of calf rennet, but not significantly different ($P > 0.05$). The FTIR technique was used to determine and compare the rennet casein produced with bacterial rennet and calf rennet. The spectra of rennet casein produced with bacterial rennet and calf rennet were similar. The results of physical and chemical tests and infrared spectrum scan showed that there was no obvious difference between the two products, suggesting that bacteria rennet from *Bacillus amyloliquefaciens* could be used as calf rennet alternatives in the production of rennet casein. The research can provide a reference for the full utilization of bacteria rennet.

Key words: optimization, enzymes, casein, bacterial rennet, process parameters

(责任编辑: 刘丽英)