

凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪蛋白质降解的影响

宋雪梅, 梁琪, 张炎, 张卫兵, 文鹏程

(甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃省功能乳品实验室, 甘肃兰州 730070)

摘要: 通过测定不同可溶性氮含量以及采用尿素凝胶电泳法, 研究了不同小牛皱胃酶添加量对牦牛乳硬质干酪3个月成熟过程中蛋白质降解的影响, 并对干酪苦味进行了感官评价。研究表明: 凝乳酶添加量对干酪pH4.6SN和12%TCASN影响显著 ($P < 0.05$), 在成熟1个月时, 不同凝乳酶添加量干酪pH4.6SN之间差距较大, 且凝乳酶添加量与干酪pH4.6SN间存在较强线性关系。凝乳酶添加量对5%PTASN和游离氨基酸影响不显著 ($P > 0.05$)。尿素凝胶电泳显示: 干酪中 α_s -酪蛋白降解依赖于凝乳酶添加量, 且降解程度大于 β -酪蛋白。凝乳酶添加量对干酪苦味影响显著 ($P < 0.05$), 且随着凝乳酶添加量的增多, 其苦味程度逐渐加重, 但是大部分干酪苦味属于轻微苦味和中等程度苦味之间。干酪苦味与12%TCASN、 α_s -酪蛋白和 β -酪蛋白降解率之间具有较强相关性 (Spearman相关系数 > 0.7 , $P < 0.01$)。

关键词: 凝乳酶添加量; 牦牛乳; 硬质干酪; 蛋白质降解; 苦味

文章编号: 1673-9078(2015)5-199-205

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.032

Effect of Calf Chymosin Dose on Protein Degradation in Hard Cheese Made from Yak Milk

SONG Xue-mei, LIANG Qi, ZHANG Yan, ZHANG Wei-bing, WEN Peng-cheng

(College of Food Science and Engineering, Laboratory of Functional Dairy of Gansu Province, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The effect of calf chymosin supplementation on degradation of protein in hard cheese made from yak milk during the three-month ripening process was studied by measuring content of various types of soluble nitrogen. Additionally, urea-polyacrylamide gel electrophoresis and sensory evaluation regarding bitterness in the cheese was conducted. The results showed that chymosin dosage had significant impact on content of soluble nitrogen in pH 4.6 acetate buffer and 12% trichloroacetic acid ($p < 0.05$). After one month of ripening, there were significant differences in soluble nitrogen content in pH 4.6 acetate buffer between samples with different chymosin dosages, and a strong linear correlation was found between chymosin dosage and soluble nitrogen content. However, chymosin dose had no significant effect on the content of soluble nitrogen in 5% phosphotungstic acid and free amino acid content ($p > 0.05$). Results of urea-polyacrylamide gel electrophoresis showed that degradation of α_s -casein in cheese was dependent on chymosin dosage and was more extensive than that of β -casein. Chymosin dosage had a significant impact on cheese bitterness as well, which increased in intensity with increasing amount of chymosin, with most cheeses ranging from slightly to moderately bitter. The degree of cheese bitterness strongly correlated with soluble nitrogen content in 12% trichloroacetic acid as well as degree of α_s -casein and β -casein degradation (Spearman correlation coefficient > 0.7 , $p < 0.01$).

Key words: chymosin dosage; yak milk; hard cheese; protein degradation; bitterness

凝乳酶是干酪生产中的关键性酶, 除了能够专一性地切割 κ -酪蛋白 Phe₁₀₅-Met₁₀₆ 之间肽键, 破坏酪蛋白胶束稳定性使乳凝结之外, 残余凝乳酶具有蛋白质分解活性, 在大多数干酪成熟过程中, 与乳内源性蛋白酶、发酵剂等不断协同降解 α_s -酪蛋白、 α_2 -酪蛋白、 β -酪蛋白等产生中长肽, 进而被微生物肽酶降解成小肽、游离氨基酸, 对干酪质地和风味形成具有重要作用^[1]。凝乳酶在干酪生产过程中大部分随乳清排出, 残留凝乳酶数量随干酪品种和生产工艺而异。

收稿日期: 2014-09-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31260383)

作者简介: 宋雪梅 (1980-), 博士研究生, 研究方向: 乳品科学与技术

通讯作者: 梁琪 (1969-), 女, 教授, 博士, 研究方向: 食品品质, 乳品科学

干酪中凝乳酶残余量与凝乳酶添加量具有直接关系, 因此, 凝乳酶添加量对干酪蛋白质降解具有重要影响。0.8 和 0.6 倍正常凝乳酶添加量的低水分脱脂乳 Mozzarella 干酪蛋白质降解程度明显降低^[2]。软质干酪 α_s -酪蛋白降解程度与干酪凝乳酶添加量有关^[3]。0.25 和 4 倍正常凝乳酶添加量与 Mozzarella 干酪 12% 三氯

乙酸可溶性氮含量之间具有一定比例关系^[4]。经 RP-HPLC 分析的干酪水溶性氮部分的中间肽片段特性与残余凝乳酶活力呈现正相关^[5]。Cheddar 干酪中残余凝乳酶活力增加时,干酪苦味呈现加重趋势^[6]。但是凝乳酶添加量的增加使得 Feta 干酪酸味发生变化之外,并没有产生特别的苦味^[7]。因此,就不同干酪品种而言,凝乳酶添加量对于干酪蛋白质降解程度和品质影响不同。

牦牛主要分布于海拔 3000 米以上的青藏高原地区,所产牦牛乳干物质含量较高,且与普通牛乳相比,牦牛乳含有较高蛋白质、酪蛋白,且 β -酪蛋白占总酪蛋白的 45% 左右^[8],大多数乳酪蛋白胶束粒径在 100nm 以下^[9]。再以牦牛乳、牛乳、山羊乳、等不同特性原料乳生产干酪时,为了有效控制干酪流变特性及获得良好感官品质,常选用不同类型凝乳酶^[10]。小牛皱胃酶具有良好凝乳特性,在干酪行业中得到了广泛应用。牦牛乳硬质干酪采用小牛皱胃酶为凝乳酶,通过凝乳、切割、排乳清、升温、堆酿、压榨等环节制作而成,营养价值高,但是成熟期长,干酪品质不稳定,易于产生苦味。因此,本项目通过研究不同小牛皱胃酶添加量对牦牛乳硬质干酪蛋白质降解的影响,一方面揭示出不同凝乳酶添加量的牦牛乳硬质干酪在成熟期间蛋白质降解和苦味程度的变化规律,另一方面通过改变凝乳酶添加量间接反映出残留凝乳酶对干酪成熟特性的影响,从而为进一步优化和规范牦牛乳硬质干酪生产工艺提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 材料

牦牛乳,采自天祝藏族自治县,收集的原料乳储藏在 4 °C 下带回实验室。乳密度 1.027 kg/m³,蛋白质含量 5.0%,脂肪含量 5.4%,干物质含量 16.95%。

乳酸菌发酵剂(保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌),丹麦丹尼斯克公司 CHOOZIT 型;精制小牛凝乳酶(酶活力为 10 万单位/g,兰州百灵生物技术有限公司)。

1.1.2 试剂

醋酸钠、冰乙酸、三氯乙酸、盐酸、硼酸、氢氧化钠、硫酸钾、氯化钙、氯化钠、硫酸、磷钨酸、氯化镉、L-亮氨酸、硫酸奎宁、硫酸铜、丙烯酰胺、氮,氮的亚甲基双丙烯酰胺、Tris、溴酚蓝、四甲基乙二胺、考马斯亮蓝 G-250、过硫酸铵、甘氨酸、尿素、氢氧化钾等试剂均为分析纯; α -酪蛋白(≥ 70)、 β -酪蛋白(≥ 98)标准品购自 sigma 公司。

1.2 仪器与设备

干酪槽(自制)、TGL-20 高速台式冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)、AL104 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)、真空包装机(广东中山市名康包装机械厂)、LRH-300GS 人工气候箱(广东省医疗器械厂)、722S 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)、PHS-3C 型酸度计(上海仪电科学仪器股份有限公司)、BIO-RAD 型电泳仪(上海伯尔科技有限公司)、凯氏定氮仪(上海沛欧仪器有限公司)、凝胶成像仪(北京五洲东方科技发展有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 牦牛乳硬质干酪的制作工艺流程和试验设计

原料乳→检验→巴氏杀菌(62 °C、30min)→冷却(至 32 °C)→添加发酵剂(添加体积分数 1% 发酵剂)→添加 CaCl₂(添加体积分数 1% 的 3%CaCl₂)→添加凝乳酶→凝乳→切割→排乳清→二次加热(温度缓慢从 35 °C 升到 45 °C)→排乳清→搅拌、加盐(加盐量为 2%)→堆酿(2h)→压榨成型→真空包装→成熟^[11]

按照凝乳酶添加量分别为 0.5%、1%、1.5% 和 2% 进行干酪制作。在 10 °C 条件下分别成熟 1、2、3 个月,然后将各成熟段的干酪贮藏在 -18 °C,统一测定干酪蛋白质降解指标,并对其苦味进行感官评定。设定凝乳酶添加量 1% 为 X,依次类推,凝乳酶添加量分别缩写为 0.5X、1.5X 和 2X。

1.3.2 可溶性氮含量的测定

参考刘会平^[12]方法提取 pH 4.6 可溶性氮和 12% 三氯乙酸可溶性氮。5% 磷钨酸可溶性氮提取: 10 mL 水溶性氮提取物中加入 7 mL、3.95 mol/mL 硫酸和 3 mL、33% 磷钨酸,最终磷钨酸浓度为 5%,混合液在 4 °C 下平衡过夜,利用 Whatman No.40 滤纸过滤即可^[13]。参考 GB 5009.5-2010 方法分别测定干酪总氮(简称 TN)和可溶性氮含量。pH 4.6 可溶性氮含量(简称 pH 4.6SN)、12% 三氯乙酸可溶性氮含量(简称 12% TCASN)、5% 磷钨酸可溶性氮含量(简称 5% PTASN)分别以占干酪总氮的百分含量计算。

1.3.3 游离氨基酸总量的测定

依据干酪水溶性氮提取物中游离氨基酸的浓度,将其用蒸馏水稀释到 1 mL,加入 2 mL 镉-茚三酮溶液,混合物在 84 °C 加热 5 min,冷却后,在 507 nm 处测定吸光度^[14]。以 L-亮氨酸为标准物,制作标准曲线。

1.3.4 pH 4.6 不溶性酪蛋白的制备

称取干酪 5 g, 加入蒸馏水 15 mL, 在研钵中研磨, 将混合物在 40 °C 水浴锅中放置 1 h 后, 再在室温下放置 15 min, 之后, 在磁力搅拌的作用下, 用 1 mol/L 盐酸将混合物 pH 值缓慢调节到 4.6, 混合物在 4 °C、4000 g 下离心 20 min, 然后收集沉淀部分, 真空冷冻干燥后研磨成粉末, 在 -18 °C 储藏, 备用^[3]。

1.3.5 尿素凝胶电泳

参考 Andrews 方法, 略加修改进行^[15]。分离胶和浓缩胶浓度分别为 12.5% 和 4%。电泳条件为浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V。样品预处理: 将真空冷冻干燥的 pH 4.6 沉淀部分溶解在样品缓冲液中, 充分混匀, 于沸水中加热 5 min, 待冷却后上样。采用考马斯亮蓝 G-250 对胶条染色^[16]。染色后的胶条用凝胶成像仪进行拍照, 并用自带 Quantity one 密度定量分析软件对电泳条带进行定量分析。酪蛋白完整率即为每个条带光密度占整个标准样品光密度的百分比。酪蛋白分解率即为 100% 减去酪蛋白完整率。

1.3.6 干酪苦味的感官评价

经过培训和感官能力测试后, 筛选出 7 人组成评价小组, 以硫酸奎宁不同浓度 0 、 2.9×10^{-3} 、 5.8×10^{-3} 、 1.2×10^{-2} 和 2.4×10^{-2} mmol/L 作为参比溶液, 评定员由弱到强的品尝参比溶液, 记住每种溶液的苦味程度, 采用五分制进行评定、打分, 1~5 分表示干酪苦味程度为几乎检测不到苦味、轻微苦味、中等苦味、非常强的苦味、令人难以接受的苦味。评定员用蒸馏水漱口后, 将 1.5 cm^3 干酪含在嘴里进行品尝打分。

1.4 数据的统计分析

采用 SPSS16.0 对试验数据进行处理, 相关性分析采用 Pearson 法和 Spearman 法, 采用主成分分析对数据进行降维分析。

2 结果与分析

2.1 凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪 pH 4.6SN 的影响

pH 4.6SN 反映了源自干酪酪蛋白的肽含量, 是干酪成熟的标志, 主要由残留凝乳酶作用于酪蛋白所产生^[17]。凝乳酶残留数量取决于凝乳酶添加量、凝乳 pH 值、排乳清时 pH 值等工艺参数和原料乳中酪蛋白浓度、酪蛋白胶束粒径等。不同凝乳酶添加量的牦牛乳硬质干酪 pH 4.6SN 在 1~3 个月成熟过程中的变化趋势如图 1 所示。

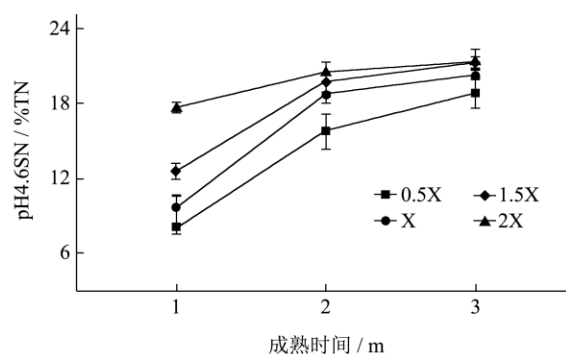


图 1 凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪 pH 4.6 可溶性氮含量的影响

Fig.1 Impact of chymosin dose on the soluble nitrogen content in hard cheese made from yak milk at pH 4.6

从图 1 可知, 不同凝乳酶添加量的干酪在成熟 1 个月时 pH 4.6SN 差距较大, 0.5X 和 2X 凝乳酶添加量干酪的 pH 4.6SN 相差 9.73%, 随着成熟时间的延长, 不同干酪 pH 4.6SN 之间差距减小。这是因为一方面凝乳酶与干酪蛋白胶束之间存在饱和作用^[18], 另一方面随着成熟时间延长, 干酪酪蛋白数量减少, 且干酪水分、pH 值、盐分发生变化, 影响了凝乳酶活性。当凝乳酶添加量从 0.5X 增加到 2X 时, 干酪 pH 4.6SN 依次呈现增加趋势, 这与干酪中凝乳酶残留量有关。Bansal 发现凝乳 pH 值低于 6.1 和酪蛋白胶束粒径小于 150 nm 时, 凝乳酶残留量增多^[18]。生产牦牛乳硬质干酪的凝乳 pH 值为 6.1, 且大多数牦牛乳酪蛋白粒径在 100 nm 以下, 因此, 凝乳酶添加量较高的干酪中其残留量也较多。2X 凝乳酶添加量干酪在 1~3 个月成熟过程中 pH 4.6SN 最高。李开雄等也发现凝乳酶添加量对 pH 4.6SN 影响较大, 随着凝乳酶添加量的增大, 其 pH 4.6SN 也越来越高^[9]。凝乳酶添加量和成熟时间显著影响干酪 pH 4.6SN ($P < 0.05$)。相关分析显示干酪凝乳酶添加量与 pH 4.6SN 具有较强相关性, 但是随着成熟时间延长, 其 Pearson 相关系数 ($r = 0.960, P < 0.01$, $r = 0.859, P < 0.05$, $r = 0.8, P < 0.05$) 呈现减小趋势。

2.2 凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪 12% TCASN 的影响

12% TCASN 体现了干酪成熟的深度, 所提取肽分子量为 600~15,000Da^[13], 主要由发酵剂和其它酶催化产生。不同凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪 12% TCASN 影响的变化趋势如图 2 所示。

从图 2 可知, 在 1~3 个月成熟过程中, 0.5X、X、1.5X 和 2X 凝乳酶添加量的干酪 12% TCASN 分别呈现增加

趋势。0.5X和X凝乳酶添加量干酪的12%TCASN相近,而1.5X和2X凝乳酶添加量干酪的12% TCASN相近,且前后两者具有较大差距。在2~3个月成熟过程中,0.5X和X凝乳酶添加量干酪12% TCASN增长加快,而1.5X和2X凝乳酶添加量干酪12% TCASN增长变缓。就凝乳酶添加量而言,2X凝乳酶添加量干酪12% TCASN最高。这是由于凝乳酶添加量的增多在成熟早期能协同发酵剂使干酪具有较高12% TCASN。正如所报道的,植物性凝乳酶生产的干酪由于其具有较高蛋白质降解活性,产生了更多能够被乳酸菌和其它酶作用的底物如酪蛋白肽,使得干酪含有较高12% TCASN^[20-21]。在成熟后期,由于发酵剂的大量繁殖和自溶作用加强,释放出较多蛋白酶和肽酶,使得不同凝乳酶制作的干酪12% TCASN的差距减少。方差分析显示,凝乳酶添加量和成熟时间显著影响干酪12% TCASN ($P < 0.05$)。

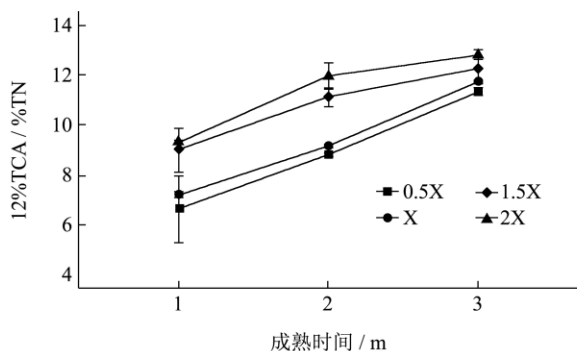


图2 凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪 12%TCASN 的影响

Fig.2 Impact of chymosin dose on the soluble nitrogen content in hard cheese made from yak milk in 12% trichloroacetic acid

2.3 凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪 5%PTASN 的影响

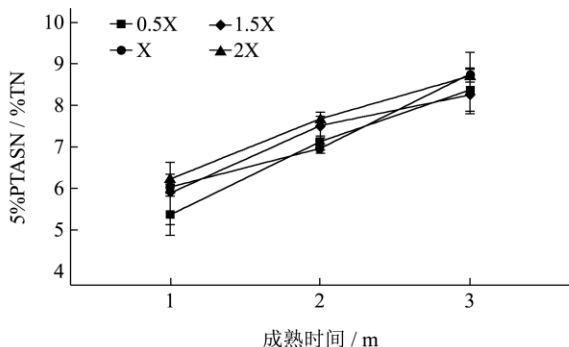


图3 凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪 5%PTASN 的影响

Fig.3 Impact of chymosin dose on soluble nitrogen content in hard cheese made from yak milk in 5% phosphotungstic acid

5%PTA 只提取一些分子量小于 600 Da 的小肽和游离氨基酸^[21], 其含量占水溶性氮含量的 5%, 主要

由发酵剂肽酶作用于多肽产生^[22], 不同凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪 5%PTA 影响的结果如图 3 所示。

从图 3 可知,不同凝乳酶添加量的干酪 5%PTASN 在 1~3 个月成熟过程中分别呈现增加趋势,成熟时间对干酪 5%PTASN 影响显著 ($P < 0.05$),但是凝乳酶添加量对干酪 5%PTASN 影响不显著 ($P > 0.05$)。这是因为凝乳酶对包含几个氨基酸残基的小肽几乎没有作用^[23]。

2.4 凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪游离氨基酸含量的影响

以亮氨酸为标准物,对游离氨基酸进行了测定,其标准曲线为 $y=0.0325x-0.0075$ ($R^2=0.9989$)。其不同凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪游离氨基酸影响的结果如图 4 所示。

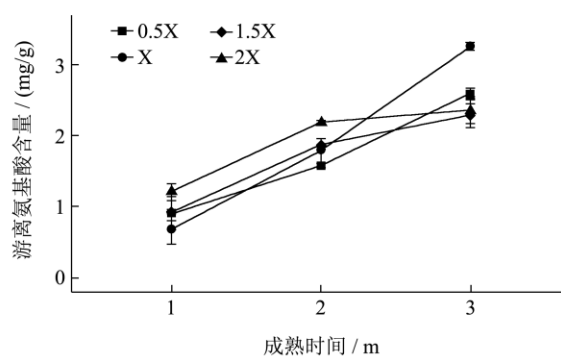


图4 凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪游离氨基酸含量的影响

Fig.4 Impact of chymosin dose on free amino acid content in hard cheese made from yak milk

从图4可知,在1~3个月的成熟过程中,不同凝乳酶添加量的干酪中游离氨基酸含量分别呈现增加趋势,成熟时间对干酪游离氨基酸影响显著 ($P < 0.05$),但是凝乳酶添加量对干酪游离氨基酸影响不显著 ($P > 0.05$)。干酪中游离氨基酸含量和5%PTASN变化趋势进一步说明凝乳酶添加量对干酪中游离氨基酸含量影响较小。

2.5 凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪 pH 4.6 不溶性酪蛋白降解的影响

凝乳酶添加量和成熟时间显著影响 α_s -酪蛋白 (α_s -casein, α_s -CN)和 β -酪蛋白(β -casein, β -CN)完整率 ($P < 0.05$)从图 5 可知,随着成熟时间的延长,干酪 α_s -CN 和 β -CN 完整率呈现下降趋势。不同凝乳酶添加量干酪中存在 γ -酪蛋白。1.5X 和 2X 凝乳酶添加量干酪中 α_{s1} - I -CN 明显增加。

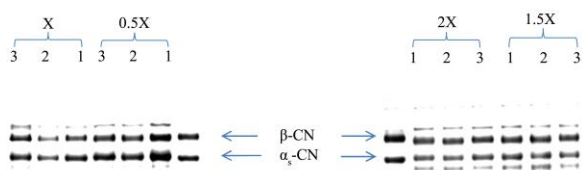


图5 不同凝乳酶添加量的牦牛乳硬质干酪在成熟1、2、3个月的pH4.6不溶性酪蛋白尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.5 Urea-polyacrylamide gel electrophoresis patterns for insoluble fractions of hard cheese made from yak milk with different chymosin doses after one, two, and three months of ripening at pH 4.6

图6显示,在成熟1个月时,随着凝乳酶添加量从0.5X增加到2X,干酪 α_s -CN完整率从54.63%降低到23.23%,成熟到3个月时,干酪 α_s -CN完整率从37.95%降低到21.7%,这表明增加凝乳酶添加量能加快 α_s -CN降解,但是随着成熟时间的延长, α_s -CN降解依赖凝乳酶添加量的程度减弱。从1~3个月的成熟过程中, α_s -CN降解比 β -CN快,这是由于凝块中凝乳酶对 α_s -CN具有较强特异性,而对 β -CN具有较弱特异性^[24]。0.5X凝乳酶添加量干酪成熟1个月时,44.72% β -CN发生降解,而1X、1.5X、2X凝乳酶添加量干酪的 β -CN降解率分别为59.32%、58.56%、62.66%,这表明凝乳酶添加量对 β -CN降解具有一定贡献。Dave等发现凝乳酶添加量也能加快无脂(0%)、低脂(11%)、正常脂(19%)Mozzarella干酪 β -CN降解^[4]。Bansal等也指出 β -CN能被小牛皱胃酶轻度水解,产生 β -CN(f1-189/192)^[25],而 β -CN(f1-189/192)、 β -CN(f193-209)和 β -CN(f190-209)具有较强疏水性,易于使干酪产生苦味缺陷,因此,凝乳酶添加量增多时,增大了干酪产生苦味的风险。另外,在1-3个月的成熟过程中, β -CN降解程度变化较小。Bogenrief等发现成熟45天的Cheddar干酪只有17% β -CN降解^[26]。Farkye等研究表明凝乳酶制作的

表1 不同凝乳酶添加量的牦牛乳硬质干酪中蛋白质降解指标之间的Spearman相关性分析

Table 1 Spearman correlation analysis of different indices for protein degradation in hard cheese made from yak milk with different chymosin doses

指标	pH 4.6SN	12% TCASN	5% PTASN	β -CN 降解率	α_s -CN 降解率	游离氨基酸总量
pH4.6SN	1					
12%TCASN	0.925**	1				
5%PTASN	0.728**	0.719**	1			
β -CN 降解率	0.694**	0.688**	0.529**	1		
α_s -CN 降解率	0.650**	0.668**	0.227	0.621**	1	
游离氨基酸总量	0.820**	0.823**	0.848**	0.554**	0.284	1

注: *表示spearman相关系数双尾检测 $P < 0.01$ 。

从表1可知,除 α_s -CN降解率和5%PTASN、游离氨基酸总量之间具有较弱相关性之外,其它被研究的各

Cheddar干酪在成熟9个月后,90% α_s -CN降解,而70% β -CN没有降解^[27],说明不同凝乳酶添加量的牦牛乳硬质干酪中 β -CN降解程度比所报道的Cheddar干酪中的高。

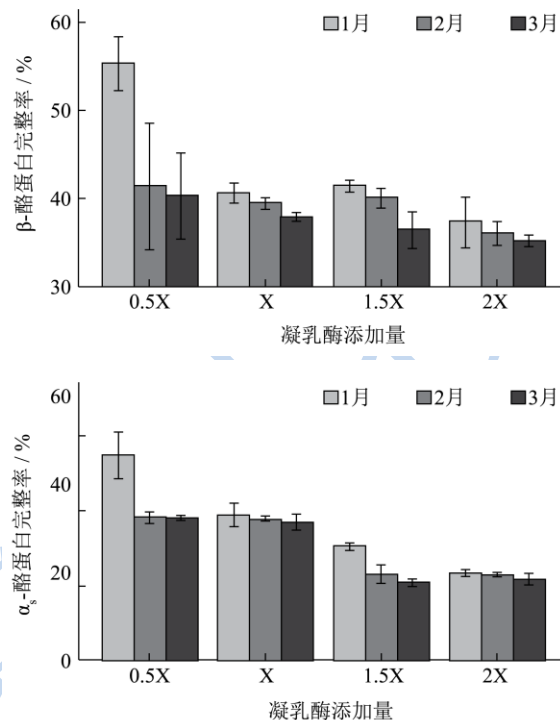


图6 不同凝乳酶添加量的牦牛乳硬质干酪 α_s -酪蛋白和 β -酪蛋白完整率

Fig.6 Percentage of intact α_s -CN and β -CN persisting in hard cheese made from yak milk with different chymosin doses

2.6 不同蛋白质降解指标之间的多元分析

对不同凝乳酶添加量的牦牛乳硬质干酪中体现蛋白质降解程度的各指标进行了相关性分析,其结果见表1。

蛋白质降解指标之间具有较强正相关性($P < 0.01$)且Spearman相关系数 > 0.53 ,因此,采用主成分分析法进

行进一步降维分析。源自不同凝乳酶添加量的牦牛乳硬质干酪的pH 4.6SN、12% TCASN、5% PTASN、 β -CN降解率、 α_s -CN降解率、游离氨基酸总量的主成分得分分布情况如图7所示。

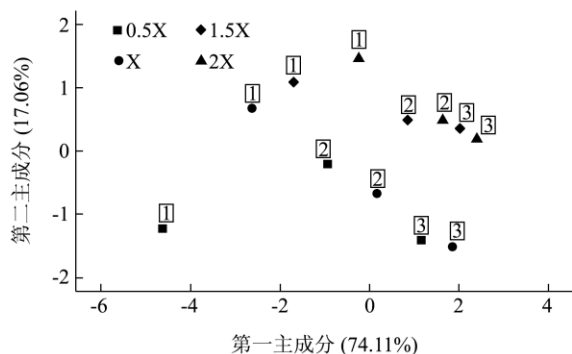


图7 不同凝乳酶添加量的牦牛乳硬质干酪在1、2、3个月成熟过程中蛋白质降解主成分载荷图

Fig.7 Score plots obtained from principal components of protein degradation of hard cheese made from yak milk with chymosin during one, two, and three months of ripening

从图7可知，第一主成分占74.11%，代表了原始变量中的大部分信息，主要与成熟时间有关，第二主成分占17.06%，主要与凝乳酶添加量有关，且成熟时间对蛋白质降解程度的影响大于凝乳酶添加量的影响。随着成熟时间延长，干酪蛋白质降解程度不断增加。在成熟1个月时，干酪蛋白质降解程度间存在较大差别，但是，随着凝乳酶添加量的增加，干酪蛋白质降解程度之间的差距减少。

2.7 凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪苦味程度的影响

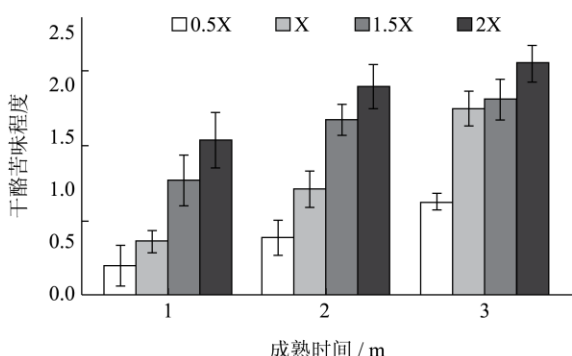


图8 凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪苦味程度的影响

Fig.8 Impact of chymosin dose on bitterness of hard cheese made from yak milk

图8显示，当凝乳酶添加量从0.5X增加到2X时，牦牛乳硬质干酪苦味程度逐渐加重。凝乳酶添加量多的干酪苦味程度变化幅度较大，0.5X凝乳酶添加量干酪

苦味程度变化幅度较小。除成熟3个月、凝乳酶添加量为2X的干酪具有中等偏弱苦味之外，其它干酪具有不同程度的轻微苦味。凝乳酶添加量和成熟时间对干酪苦味影响显著 ($P < 0.05$)。在小牛凝乳酶残余量增加的Cheddar干酪中也检测出苦味^[6]。相关性分析表明，凝乳酶添加量与干酪苦味之间具有较强相关性，且Pearson相关系数 > 0.9 ($P < 0.01$)。通过对干酪苦味、所研究的蛋白质降解指标 (pH 4.6SN、12% TCASN、5% PTASN、 β -CN降解率、 α_s -CN降解率、游离氨基酸总量) 进行相关性分析，发现干酪苦味与 α_s -CN降解率、12% TCASN具有强相关性，其Spearman相关系数 > 0.8 ，与 β -CN降解率之间具有较强相关性，其Spearman相关系数大于0.7而小于0.8，与5% PTASN和游离氨基酸具有较弱相关性，这进一步表明，干酪苦味与蛋白质降解程度有关，同时与12% TCASN、 α_s -CN降解率关系密切。刘忠成等发现夸克干酪的苦味和水溶性氮含量随着贮存期的延长和凝乳酶用量的增加而增大^[28]。

干酪苦味与蛋白质降解关系密切，研究表明：酪蛋白的降解产物—苦味肽对Cheddar干酪、Gouda干酪、Ragusano干酪等苦味的形成起了重要作用。苦味肽主要源自 α_s -CN和 β -CN，其分子量在100~6000 Da。牦牛乳与荷斯坦牛乳相比区别较大，牦牛乳干物质含量为17.86%~18.36%，比荷斯坦牛乳高53%；牦牛乳蛋白质含量平均值为5.11%，是荷斯坦牛乳蛋白质平均含量的1.5倍^[29]，总酪蛋白含量和各酪蛋白在总酪蛋白所占比例方面也都存在较大差异，牦牛乳 β -CN在总酪蛋白中含量很高(大于45%)，而 α_s -CN约占总酪蛋白含量的40%^[8]。Glantz等发现酪蛋白胶束和原料乳组成对乳形成凝胶很重要^[30]，因此，凝乳酶添加量的增多对牦牛乳干酪蛋白质降解的影响较大。

3 结论

凝乳酶添加量对牦牛乳硬质干酪中的主要蛋白质降解如pH4.6SN和12%TCASN影响显著 ($P < 0.05$)，在成熟1个月时，0.5X和2X凝乳酶添加量干酪pH4.6SN之间相差9.73%，且凝乳酶添加量与干酪pH4.6SN之间存在较强线性关系。凝乳酶添加量对次要蛋白质降解如5%PTASN和游离氨基酸含量的影响不显著 ($P < 0.05$)。干酪中 α_s -酪蛋白降解程度依赖于凝乳酶添加量，且 α_s -酪蛋白的降解程度大于 β -酪蛋白。凝乳酶添加量对干酪苦味影响显著 ($P < 0.05$)，且随着凝乳酶添加量的增多，其苦味程度增强，但是大部分干酪苦味属于轻微苦味和中等程度苦味之间。干酪苦味与12%TCASN、 α_s -CN降解率、 β -CN降解率之间关系密切。因此，在牦牛乳硬质干酪生产过程中，需要严格控制凝乳酶添加量和

其它影响其残留的工艺参数。

参考文献

- [1] Igoshi K, Kaminogawa S, Yamauchi K. Profiles of proteinases in Gouda-type cheese [J]. Journal of Dairy Science, 1986, 69(8):2018-2026
- [2] Kindstedt P S, Yun J J, Barbano D M, et al. Mozzarella Cheese: impact of coagulant concentration on chemical composition, proteolysis, and functional properties [J]. Journal of Dairy Science, 1995, 78(12): 2591-2597
- [3] Hynes E R, Aparo L, Candiotti M C. Influence of residual milk-clotting enzyme on α_{s1} casein hydrolysis during ripening of Reggiano Argentino cheese [J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(3):565-573
- [4] Dave R I, McMahon D J, Oberg C J, et al. Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of Mozzarella cheeses made using direct acidification [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(1): 114-126
- [5] Nega A, Moatsou G. Proteolysis and related enzymatic activities in ten greek cheese varieties [J]. Dairy science & technology, 2012, 92:57-73
- [6] Creamer L K, Lawrence R C, Gilles J. Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese [J]. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 1985, 20:185-203
- [7] Samal P K, Pearce K N, Bennett R J, et al. Influence of residual rennet and proteolysis on the exudation of whey from Feta cheese during storage [J]. International Dairy Journal, 1993, 3(8):729-745
- [8] LI Haimei, MA Ying, DONG Ai jun, et al. Protein composition of yak milk [J]. Dairy Science & Technology, 2010, 90(1): 111-117
- [9] Yang Li, Shu Liang, Dejuan Zhi, et al. Purification and characterization of *Bacillus subtilis* milk-clotting enzyme from Tibet Plateau and its potential use in yak dairy industry [J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(4): 733-741
- [10] Sampaio P N, Calado C R C, Sousa L, et al. Optimization of the culture medium composition using response surface methodology for new recombinant cyprosin B production in bioreactor for cheese production [J]. European Food Research and Technology, 2010, 231(2):339-346
- [11] 刘兴龙,甘伯中,李帆,等.白牦牛乳硬质干酪加工工艺技术研究[J].食品科学,2009,30(14):94-98
LIU Xing-long, GAN Bo-zhong, LI Fan, et al. Processing technology of hard cheese from milk of white yak [J]. Food Science, 2009, 30(14):94-98
- [12] 刘会平, 南庆贤, 马长伟. Mozzarella 干酪成熟中蛋白水解与功能特性的变化[J]. 农业工程学报, 2006, 22(6):182-187
LIU hui-ping, NAN Qing-xian, MA Chang-wei. Changes of proteolysis and functional properties during ripening of Mozzarella cheese [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2006, 22(6):182-187
- [13] Ardö Y. Evaluating proteolysis by analyzing the N content of cheese fractions [J]. Bulletin of the International Dairy Federation, 1999, 337: 4-9
- [14] Folkertsma B, Fox P F. Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis cheese during ripening [J]. Journal of Dairy Research, 1992, 59(2): 217-224
- [15] Andrews A T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins [J]. Journal of Dairy Research, 1983, 50, 45-55
- [16] Blakesley R W, Boezi J A. A new staining technique for proteolysis in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250 [J]. Analytical Biochemistry, 1977, 82, 580-581
- [17] O'Keeffe AM, Fox P F, Charles Daly. Proteolysis in Cheddar cheese: role of coagulant and starter bacteria [J]. Journal of Dairy Research, 1978, 45(3):465-477
- [18] Bansal N, Fox P F, McSweeney P L H. Factors Affecting the Retention of Rennet in Cheese Curd [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(22): 9219-9225
- [19] 李开雄,李星科,李应彪,等.半硬干酪加工工艺研究[J]. 现代食品科技,2007,23(10):62-65
LI Kai-xiong, LI Xing-ke, LI Ying-biao, et al. Study on the processing technology of semi-hard cheese [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(10):62-65
- [20] Prados F, Pino A, Fernández-Salguero J. Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2007, 42(5): 556-561
- [21] Sousa M J, Malcata F X. Influence of pasteurization of milk and addition of starter cultures on protein breakdown in ovine cheeses manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* [J]. Food Chemistry, 1996, 57(4):549-556
- [22] Fox P F, Law J, McSweeney P H, et al. Biochemistry of cheese ripening. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 2nd edn, General aspects, Vol. 1 (edited by P.F. Fox). 1999, Pp. 389-438. London: Chapman & Hall
- [23] Pereira C I, Gomes E O, Gomes A M P, et al. Proteolysis in

- model Portuguese cheeses: effects of rennet and starter culture [J]. Food Chemistry, 2008,108 (36):862-868
- [24] Fox P F. Cheese: An overview. cheese: Chemistry, physics and microbiology ,1993(Vol. 1, pp. 1-36). London: Chapman and Hall
- [25] Bansal N, Drake M A, Piraino P, et al. Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese [J]. International Dairy Journal, 2009, 19 (9):510-517
- [26] Bogenrief D D, Olson N F. Hydrolysis of β -casein increases cheddar cheese meltability [J]. Milchwissenschaft, 1995, 50:678-682
- [27] Farkye NY. Contribution of milk-clotting enzymes and plasmin to cheese ripening [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1995, 367:195-207
- [28] 刘忠成, 刘艳平, 霍贵成. 凝乳酶对超滤浓缩乳生产 Quark 干酪的影响[J].食品工业科技, 2009,30(12): 120-122
- LIU Zhong-cheng, LIU Yan-ping, HUO Gui-cheng. Effect of rennet on producing Quark cheese by ultrafiltration concentrated milk [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009,30(12): 120-122
- [29] 刘冬,黄玉军,赵海晴,等.牦牛乳蛋白质组成及特性[J].乳业科学与技术, 2013,36(3):20-23
- LIU Dong, HUANG Yu-jun, ZHAO Hai-qing, et al. Protein composition and characteristics of yak milk [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2013, 36(3): 20-23
- [30] Glantz M, Devold T G, Vegarud G E, et al. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation [J]. Journal of Dairy Science , 2010,93(4): 1444-1451