

相传古代有个阿拉伯商人, 外出经商前把乳汁放进羊胃中贮存。在炎热的沙漠中旅行几天之后打开胃囊, 发现原来的乳汁分成了凝块和乳清两部分, 凝块可以充饥, 乳清可以解渴。这就是人类原始的制造干酪 (cheese) 的办法。后来在考古研究中发现, 在公元前 3000 年古代阿拉伯人常用的一种坛子里也确实找到了干酪的残迹。^[1,2]

干酪系动物乳汁经凝乳酶作用而凝固, 排出乳清后压榨成型制成的乳制品。干酪营养丰富, 味道鲜美, 贮存期长, 是许多民族的传统食品。干酪已有长期大规模工业化生产的历史, 全世界年产量达 1200 万吨以上^[3], 而且每年以约 4% 的速率增长, 品种不下 800 种^[4]。

制造干酪多用牛奶, 少数也用羊奶、骆驼奶等。牛乳平均含水 87%、乳糖 4.9%、脂 3.7%、蛋白质 3.5%、盐 0.7%, 其组成随动物品种、生理及环境而变化。在牛乳蛋白质中酪蛋白占 80%, 其余为水溶性的乳球蛋白和乳清蛋白。酪蛋白是十分复杂的混合物, 可以分为 α 、 β 、 κ 及 δ 等多种组分。乳汁中的酪蛋白与钙离子结合形成稳定的胶束^[5]。

牛乳凝结机理也相当复杂, 大体分成两个阶段: 第一阶段是酶促过程, 在凝乳酶的作用下切断 K-酪蛋白的苯丙氨酸 105-甲硫氨酸 106 之间的肽键, 释放出带电的糖大肽及副-K-酪蛋白 (para-k-casein), 使胶束丧失稳定性; 然后进入非酶促的第二阶段, 即在钙离子存在下的凝聚过程, 最后形成凝块。^[1,5]

为满足世界干酪生产的巨大需求, 显然首先需要提供足量合格的凝乳酶, 据粗略估计凝乳酶的年产值达 1.2 亿美元^[3], 占酶制剂总市场的 15%^[6], 在酶制剂产业中占举足轻重的地位。

凝乳酶的传统来源是吃奶的小牛皱胃 (第

四胃)。胃的提取液中含凝乳酶 (chymosin) 70—90%, 胃蛋白酶 (pepsin) 3—10% 以及少量的胃亚蛋白酶 (gastricsin)、胰蛋白酶 (trypsin) 等。小牛一但吃草, 凝乳酶含量迅速下降, 胃蛋白酶急剧增加, 成牛含胃蛋白酶高达 65—70%^[1]。小牛凝乳酶属酸性蛋白酶, 以酶原的形式合成并分泌, 在氢离子催化下活化, 从 N 末端切去 42 个氨基酸残基, 形成有活力的凝乳酶 (分子量 35653)^[7]。小牛凝乳酶适合于制造各种类型的干酪。

为满足干酪制造业的需要, 据统计全世界每年不得不屠杀约 5000 万头小牛^[8], 造成全球性的小牛短缺。自食品危机以来, 牧场主倾向于把小公牛养大, 供应肉类市场需要, 这使凝乳酶的供求矛盾更趋紧张。为缓和这一紧张状态, 长期以来科学家们千方百计地寻找小牛凝乳酶的代用品。对这些代用品的要求包括: ①能有效地凝乳, 但不水解凝块; ②干酪制成品的质地及风味可以被接受; ③贮存期稳定; ④无毒、不致病; ⑤价格能与小牛凝乳酶竞争^[1]。制造干酪之大忌是成品中出现苦味, 通常认为苦味的根源在于凝块中形成了疏水性肽, 该肽含有较多的脯氨酸残基, 这类肽可能是凝乳酶或发酵剂的蛋白水解作用产生的。有许多办法可以降低苦味的形成, 如: ①用较高的 pH; ②较强的盐浓度; ③选择适当的发酵剂, 使其既不形成苦味肽, 最好还能分解已形成的苦味肽; ④最后, 也许是最主要的一点, 凝乳酶的蛋白水解活力不能太高, 用量也不能太大。

小羊凝乳酶与小牛者十分相似, 但小羊资源较少, 羊胃较小, 产量自然不高。小鸡胃蛋白酶的蛋白水解活力太高, 仅在以色列有所使用。^[6]葡萄牙自古以来有使用植物凝乳酶的传统, 许多植物蛋白酶有凝乳作用如南瓜、菠萝、

大豆、甘薯等，但它们的蛋白水解酶活力太高，从而很少有使用价值。^[1,9]

已经证实微生物凝乳酶在干酪制造业颇有实用价值^[6]。通过大量筛选工作已获得几株优良生产菌株，主要为米黑毛霉 (*Mucor miehei*)，其次为微小毛霉 (*Mucor pusillus*) 和寄生内座壳菌 (*Endothia parasitica*)。据统计用微生物凝乳酶生产的干酪已占世界总产量的一半以上^[3]。尽管凝乳酶在干酪制造的总成本中只占约 0.5%，但选用微生物凝乳酶的主要原因仍在于价格便宜，相比之下小牛凝乳酶的价格常比微生物凝乳酶高出 2—3 倍，从而使微生物凝乳酶在市场上能保持很强的竞争能力。

此外，干酪加工业的重要副产物为乳清，乳清是饮料及食品工业一项重要的原料。残存的凝乳酶大部分分布在乳清中，通常经 60—70℃ 巴氏消毒之后，要求残存的凝乳酶的活力被钝化 80—90%。如果巴氏消毒后凝乳酶活力残存 20% 以上，这将导致乳清蛋白的严重破坏，从而大大降低了乳清的使用价值。微生物凝乳酶一般较小牛凝乳酶的热稳定性高，借助对酶蛋白甲硫氨酸残基氧化修饰的方法，可以获得热不稳定的微生物凝乳酶，这种“第二代微生物凝乳酶”在工业上有更高应用价值。^[10]

众所周知，固定化酶一个重要的优点在于酶可以反复利用。因此，在凝乳酶严重短缺的情况下，在干酪制造中采用固定化技术仍不失为一个解决凝乳酶短缺的有效途径^[1]。为此目的人们曾将凝乳酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶等结合到多种载体上制成固定化酶反应柱。为防止牛奶立即凝结，在 15℃ 以下通过固定化酶柱，然后再把经此处理的牛奶加热到 25—30℃ 便可形成凝块。固定化技术至少在理论上还有以下优点：①易于自动控制和连续化生产；②对凝乳酶要求不甚苛刻，多种蛋白酶都有潜在的应用可能；③不致把蛋白酶留在干酪或乳清中。据报道用固定化技术可以获得满意的凝块^[11,12]，但实际在制造干酪中仍遇到种种困难，如：①固定化过程酶活力丢失比较严重；②固定化酶稳定性不够；③运转过程中酶进一

步丢失；④反应器有堵塞的趋势；⑤微生物污染；⑥干酪成熟过程中失去了残余蛋白酶的作

用等。因此，用固定化酶制造干酪虽然作了大量有意义的探索，但在大规模工业应用之前，恐怕还要走一段相当长的路^[1]。

新近一个令人振奋的发展是用重组 DNA 技术生产小牛凝乳酶，虽然尚未进入市场，但已获得重大进展^[3,6,11]。美、英、日等国多个实验室正积极开展这方面的研究工作。首先从小牛胃分离对凝乳酶原专一的 mRNA (内含子已被删除)^[13,14]，然后借助反转录酶、DNA 聚合酶和 S₁ 核酸酶的作用获得编码该酶原的双链 DNA。再以质粒^[16] 或噬菌体^[14] 为运载体导入大肠杆菌。由于所用的 mRNA 样品依然含有各种 RNA 片段，因此所得到的 cDNA 克隆实际上是一个混合的 cDNA 文库，用放射性 mRNA 或 cDNA 探针进行杂交可以挑选出含有专一性 cDNA 的克隆。所获得的 1095 核苷酸序列基本与凝乳酶原的氨基酸序列相符合^[14,15,17]。并在 N 端有一个由编码 10 个疏水性氨基酸组成的信号肽序列。为使外源基因在细菌中有效表达，在上游端还需插入适当转录启动子序列，核糖体结合部位以及翻译的起始位点 AUG。表达产物为一融合蛋白 (N 端带有一小段细菌肽)，但这不影响随后的酶原活化作用，在这一过程中该小肽连同酶原的 42 肽一起被切除。用色氨酸启动子可以获得高效表达，凝乳酶原占细胞蛋白的 50%^[18]。问题是表达产物以不溶的包含体 (inclusion bodies) 的形式存在。Marston 等^[19] 报告了一个分离包含体及提纯凝乳酶的方法，该法包括细菌破碎、用 8M 尿素或 6M 盐酸胍溶解，酶原变性，离子交换分离及肽链再折叠等一系列步骤，凝乳酶的收率为 22.2%。用重组 DNA 技术生产的凝乳酶曾被试用生产 Cheddar 干酪，产品质量与用天然凝乳酶者无明显差别^[20,21]。为保证在食品制造业应用重组 DNA 产物的安全，有的实验室致力于发展新的载体/受体系统，Collaborative Research 和 Celltech 公司均已宣布小牛凝乳酶的基因在酵母中获得成功的克隆和表达^[22,23]。

从以上情况可知,凝乳酶的研究经艰苦的努力已获得长足进展。我国畜牧业和乳品工业基础薄弱,长期以来凝乳酶的研究提不到议事日程。但近几年情况发生了明显的变化:乳牛年增长率为10%,牛乳年增长率为15%,1985年我国已拥有乳牛160万头,牛奶年产达250万吨^[24]。预计随着旅游业、航空食品和快餐业的发展和人民食物构成的改善,对乳制品的数量、质量和品种的要求将日趋提高。审时度势应不失时机地开展包括凝乳酶在内的乳制品加工的各项科研工作,这种形势已经明明白白地摆在我们面前了。

参 考 文 献

- [1] Sardinas, J. L.: *Process Biochemistry*, 11(4): 10—17, 1976.
- [2] Pariser, E. R.: *Food Technol.*, 29: 23, 1975.
- [3] Beppu, T.: *Trends In Biotechnology*, 1(3): 85—89, 1983.
- [4] Fox, P. F.: *Use of Enzymes In Food Technology* (Ed. by P. Dupuy), pp. 135—157. Versailles, Paris, 1982.
- [5] Law, B. A.: *Progress In Industrial Microbiology*, 21: 245—283, 1985.
- [6] Harboe, M. K.: *Aspartic Protease And Their Inhibitors* (Ed. by V. Kostka) pp. 537—550, Walter de Gruyter & co., Berlin, 1985.
- [7] Nishimori, K. et al.: *J. Biochem.*, 91: 1085—1088, 1982.
- [8] Arima, K.: *Developments In Industrial Microbiology*, 79—117, 1977.
- [9] Sarinas, J. L.: *Adeance In Applied Microbiology*, 15: 15: 39—73, 1972.
- [10] Cornelius, D. A.: United States Patent, no. 4, 348, 482, 1982.
- [11] Irvine, D. M. & Hill, A. R.: *Comprehensive Biotechnology* (Ed. by Murray Moo-Young), Vol. 3, pp. 523—565, Pergamon Press, Oxford, New York, 1985.
- [12] Ohmiya, K. et al.: *Neth. Milk dairy J.*, 35: 318—322, 1981.
- [13] Uchiyama, H. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 44(6): 1373—1381, 1980.
- [14] Moir, D. et al.: *Gene*, 19: 127—138, 1982.
- [15] Harris, T. J. R. et al.: *Nucleic Acids Research*, 10(7): 2177—2187, 1982.
- [16] Nishimeri, K. et al.: *J. Biochem.*, 90: 901—904, 1981.
- [17] Nishimeri, K. et al.: *J. Biochem.*, 91: 1085—1088, 1982.
- [18] Emtage, J. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 3671—3675, 1983.
- [19] Marston, F. A. O. et al.: *Bio/technology*, 2(9): 800—804, 1984.
- [20] Green, M. L. et al.: *J. Dairy Research*, 52: 281—286, 1985.
- [21] Hicks, C. L. et al.: *J. Dairy Science*, 67 (supplement 1): 73, 1984.
- [22] Goff, C. G. et al.: *Gene*, 27: 35—46, 1984.
- [23] Mellor, J. et al.: *Gene*, 24: 1—14, 1983.
- [24] 韩增干: 中国食品报, 195 期, 1980 年 5 月 15 日。