

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241202003

引用格式: 杨帆, 苏德亮, 吕鹏, 等. 牦牛乳酪蛋白胨生产工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(2): 163–170.

YANG F, SU DL, LV P, *et al.* Optimization of production process of yak milk casein peptone [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(2): 163–170. (in Chinese with English abstract).

牦牛乳酪蛋白胨生产工艺优化

杨帆¹, 苏德亮², 吕鹏¹, 白文斌², 宋礼^{1*}

(1. 甘肃华羚生物技术研究中心, 兰州 730000; 2. 甘肃华羚乳品股份有限公司, 甘南 747000)

摘要: **目的** 探究以牦牛乳酪蛋白为原料, 优化酪蛋白胨的生产工艺。**方法** 将碱性蛋白酶和胰蛋白酶两种酶组合水解牦牛乳酪蛋白, 在单因素试验基础上, 根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 采用四因素三水平的响应面分析法, 以水解度为响应值作响应面和等高线, 得出组合酶水解牦牛乳酪蛋白的最佳工艺条件, 再经过酸沉、中和、最后喷雾干燥得到牦牛乳酪蛋白胨产品。**结果** 单因素结果显示, 组合酶浓度增大, 酪蛋白水解度呈上升趋势, 酶添加量高于 2.5% 时, 水解度上升趋势变缓。温度和 pH 的升高, 使水解度呈先上升再下降的趋势。牦牛乳酪蛋白水解度在底物浓度 5% 时达到最大, 底物浓度会阻碍酶对切割位点的作用, 导致蛋白转化率降低。响应面结果显示, 组合酶添加量 2.6% (碱性蛋白酶: 胰蛋白酶=4:1)、水解时间 160 min、水解 pH 7.0、底物浓度 5%、水解温度 55 °C 时, 水解度最好, 为 23.63%。**结论** 本研究优化了以牦牛乳酪蛋白制备蛋白胨的生产工艺, 为牦牛乳酪蛋白的进一步开发利用提供支持。

关键词: 牦牛乳酪蛋白; 碱性蛋白酶; 胰蛋白酶; 水解度

Optimization of production process of yak milk casein peptone

YANG Fan¹, SU De-Liang², LV Peng¹, BAI Wen-Bin², SONG Li^{1*}

(1. Gansu Hualing Biotechnology Research Center, Lanzhou 730000, China;
2. Gansu Hualing Dairy Co., Ltd., Gannan 747000, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the production process of casein peptone with yak milk casein as raw material. **Methods** The combination of alkaline protease and trypsin was used to hydrolyze yak milk casein. On the basis of single factor experiment, according to the principle of Box-Behnken central combination test design, the response surface analysis method of four factors and three levels was adopted, and the degree of hydrolysis was used as the response value. The response surface and contour line were used to obtain the optimal process conditions for the hydrolysis of yak milk casein by the combined enzyme, and then the yak milk casein peptone product was obtained by acid precipitation, neutralization and finally spray drying. **Results** The results of single factor showed that the degree of hydrolysis of casein increased with the increase of enzyme concentration. When the amount of enzyme added was higher than 2.5%, the degree of hydrolysis increased slowly. With the increase of temperature and pH, the degree of hydrolysis increased first and then decreased. The degree of hydrolysis of yak milk casein reached

收稿日期: 2024-12-02

第一作者: 杨帆(1996—), 女, 硕士, 主要研究方向为食品加工与安全。E-mail: 18409441067@163.com

*通信作者: 宋礼(1984—), 男, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为乳制品加工及产业化。E-mail: 741012761@qq.com

the maximum when the substrate concentration was 5%, and the substrate concentration would hinder the effect of the enzyme on the cutting site, resulting in a decrease in protein conversion. The results of response surface showed that the degree of hydrolysis was the best when the amount of combined enzyme was 2.6% (alkaline protease:trypsin=4:1), the hydrolysis time was 160 min, the hydrolysis pH was 7.0, the substrate concentration was 5%, and the hydrolysis temperature was 55 °C, which was 23.63%. **Conclusion** This study optimize the production process of peptone from yak milk casein, and provided support for the further development and utilization of yak milk casein.

KEY WORDS: yak milk casein protein; alcalase; trypsin; degree of hydrolysis

0 引言

我国是世界上牦牛拥有量最多的国家^[1], 牦牛主要分布在甘肃、西藏、青海等高海拔地区, 生长环境独特, 牦牛乳被称为“天然浓缩乳”^[2], 营养丰富, 其蛋白质、乳糖、矿物质等营养成分的种类和含量均高于普通牛乳, 有很大开发利用价值^[3-6]。牦牛乳中, 酪蛋白占总蛋白含量的 80%^[7-8], α -酪蛋白(14.6 g/L)、 β -酪蛋白(16.4 g/L)、 κ -酪蛋白(4.9 g/L)含量高于其他牛乳酪蛋白^[3,9]。牦牛乳酪蛋白多数采用传统的加工方式生产曲拉、干酪素、酸乳等, 资源开发利用还不足, 生物利用率单一, 商业化程度有待提升^[10]。为提高牦牛乳酪蛋白的附加值, 充分利用牦牛乳酪蛋白, 本研究以牦牛乳酪蛋白为原料, 制备酪蛋白胨作为微生物培养基氮源, 延长牦牛乳产业链, 为牦牛乳发展提供新思路。

蛋白胨是富含蛋白质的动植物原料经酸、碱或酶水解后分离纯化获得的一种以胨、肽、氨基酸为主要成分的水溶性混合物^[11], 是许多微生物培养基的重要成分^[12-13]。牦牛乳酪蛋白营养价值高, 可为生物体提供必需氨基酸^[14], 经酸或蛋白酶消化水解、中和、过滤、凝缩精制而成的粉末为酪蛋白胨, 作为动物来源的培养基原料^[15]。但酪蛋白不易被直接吸收利用, 因此通过酶解酪蛋白, 获得具有营养价值高, 吸收利用好的多肽、氨基酸混合物^[16], 这些多肽和氨基酸类物质具有原蛋白质或其组成氨基酸所没有的功能, 可作为微生物培养基生长提供优质氮源^[17-18]。

目前蛋白胨的制备多采用酶法水解, 酶法生产的产物用途更为广泛^[19]。通过生物酶切割肽键, 产生游离氨基酸等, 修改蛋白质结构, 从而达到改善蛋白质溶解性和其他功能性质^[20-23]。碱性蛋白酶是内切酶, 可以水解具有广泛特异性的蛋白质, 其主要酶切位点为酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸^[24], 由碱性蛋白酶制备的水解物显示出更好的溶解性和良好的生物活性^[25]。碱性蛋白酶和双酶协同水解玉米谷蛋白的方法制备的水解物具有较高的抗氧化活性, 并对乙醇诱导损伤的 LO2 细胞具有保护^[26-27]。胰蛋白酶是由

动物胰脏提取而成的固体酶制剂, 属肽链内切酶。胰蛋白酶选择地水解多肽链中所有由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽键, 能将大分子的蛋白质水解成多肽及进一步水解成氨基酸等产物, 广泛应用于动物蛋白加工、皮革、饲料、纺织等行业。侯力箫^[11]通过碱性蛋白酶和胰蛋白酶双酶解条件, 用鸡副产物制备得到蛋白胨, 确定最优工艺条件为双酶配比 1:1.3、温度 50 °C、pH 8.2、酶解时间 3.4 h。满洋^[28]利用碱性蛋白酶和风味蛋白酶在 60 °C、pH 5.0 条件下酶解南极磷虾副产物 5 h 制备得到蛋白胨, 与市售的牛肉膏蛋白胨作比较后发现可以作为替代氮源, 用于微生物培养。但酶的价格相对较高, 为获得更大的经济效益, 需要针对特定原料优化酶解工艺条件。

本研究以牦牛乳酪蛋白为原料, 碱性蛋白酶和胰蛋白酶为水解酶, 水解度(degree of hydrolysis, DH)为指标, 在单因素基础上, 进行响应面分析, 优化碱性蛋白酶与胰蛋白酶组合水解牦牛乳酪蛋白的最佳工艺条件, 为牦牛乳酪蛋白胨的生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牦牛乳酪蛋白(酪蛋白含量 92%, 甘肃华羚乳品股份有限公司); 碱性蛋白酶[液体, 2.4 AU/g, 适宜 pH 6.0~9.5, 诺维信(中国)生物技术有限公司]; 胰蛋白酶(20 万 U/g, 高浓缩型, 最适酶解 pH: 7.0~9.0, 沧州夏盛酶生物技术有限公司); 氨水、氢氧化钠、甲醛(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂)。

1.2 仪器与设备

FA1204 型分析天平(感量 0.0001 g, 常州市幸运电子设备有限公司); DZKW-2 电热恒温不锈钢水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂); JJ-1 精密增力电动搅拌机(常州国华电器有限公司); FE28-Bio 数显 pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); GL-21M 高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); GIPP-2000T 喷雾干燥机(上海继谱电子科技有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 水解工艺

准确称取 10.0 g 牦牛乳酪蛋白于 250 mL 烧杯中, 配制成 5% 底物浓度的酪蛋白溶液, 以 1% 氨水调节 pH 7.0~7.5 助溶 60~80 min, 待酪蛋白完全溶解后加入适量碱性蛋白酶和胰蛋白酶。水解完成后 80 °C 灭酶, 待室温后 5000 r/min 离心取上清液测 DH。

1.3.2 DH 的测定

DH 以甲醛滴定法进行测定^[24]。取 5 mL 灭酶离心后的水解液于锥形瓶中, 添加 55 mL 蒸馏水, 用浓度 0.05 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 8.2, 加入 10 mL 甲醛, 混合均匀后, 再用浓度 0.05 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 9.2, 记录这一过程消耗的氢氧化钠的体积, 记为 V_1 ; 以蒸馏水做空白对照, 后续操作一致, 记录空白组消耗 NaOH 的体积 V_2 。计算如公式(1):

$$DH/\% = \frac{(V_1 - V_2) \times 0.05 \times 0.014}{5 \times \text{底物浓度} \times \text{样品总氮}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: 0.014 是与 1.00 mL NaOH 标准滴定溶液 [$C(\text{NaOH})=1.000 \text{ mol/L}$] 相当的氮的质量, g。

1.3.3 单因素试验

根据 1.3.1 的方法进行碱性蛋白酶组合胰蛋白酶水解牦牛乳酪蛋白试验, 通过单因素试验, 确定两种酶添加比例、水解温度、组合酶添加量、酪蛋白底物浓度、水解时间、水解 pH。

(1) 两种酶添加比例对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

固定水解温度 55 °C, 牦牛乳酪蛋白底物浓度 5%, 水解 pH 7.0, 水解时间 120 min 条件下, 组合酶添加量 2%, 测定两种酶不同添加比例(1:1、2:1、3:1、4:1、5:1)对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响。

(2) 水解温度对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

固定底物浓度 5%, pH 7.0, 组合酶添加量 2%(碱性蛋白酶: 胰蛋白酶=1:1), 水解时间 120 min 条件下, 测定不同温度(45、50、55、60、65 °C)对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响。

(3) 组合酶添加量对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

固定水解 pH 7.0, 温度 55 °C, 5% 底物浓度, 水解时间 120 min 条件下, 测定不同组合酶添加量(1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%)对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响。

(4) 底物浓度对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

固定水解 pH 7.0, 温度 55 °C, 2% 组合酶添加量, 水解时间 120 min 条件下, 测定不同底物浓度(5%、6%、7%、8%、9%)对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响。

(5) 水解时间对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

固定水解 pH 7.0, 5% 底物浓度, 2% 组合酶添加量, 温

度 55 °C 条件下, 测定不同时间(60、90、120、150、180 min)对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响。

(6) 水解 pH 对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

固定底物浓度 5%, 2% 组合酶添加量, 温度 55 °C, 水解时间 4 h 条件下, 测定不同水解 pH (6.5、7.0、7.5、8.0、8.5)对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响。

1.3.4 Box-Behnken 设计试验

根据单因素试验结果, 选择组合酶添加量(A)、水解时间(B)、水解 pH (C)和底物浓度(D) 4 个主要因素进行下一步 Box-Behnken 设计, 试验因素水平见表 1。

表 1 试验因素水平表
Table 1 Test factor level

水平	因素			
	A 组合酶添加量/%	B 水解时间/min	C 水解 pH	D 底物浓度/%
-1	2.0	120	6.5	4
0	2.5	150	7.0	5
1	3.0	180	7.5	6

1.4 牦牛乳酪蛋白胨制备及理化检测

1.4.1 牦牛乳酪蛋白胨制备

将牦牛乳酪蛋白水解液收集, 盐酸调节 pH 至 4.1~4.3, 进行点酸过滤, 再用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0~7.5, 最后进行喷雾干燥(进风口: 175 °C, 出风口 60 °C), 得到牦牛乳酪蛋白胨产品。

1.4.2 牦牛乳酪蛋白胨理化指标检测

(1) 水分检测。采用 GB/T 20886.2—2021《酵母产品质量要求 第 2 部分酵母加工制品》中 7.3 的方法进行测定。

(2) 总氮的测定。采用 GB/T 20886.2—2021 中 7.5 的凯氏定氮法进行测定。

(3) 氨氮的测定。采用 GB/T 20886.2—2021 中 7.6 所述的氨基酸态氮的检测方法进行测定。

(4) 灰分的测定。采用 GB 5009.4—2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》中的方法进行测定。

(5) 铅的测定。采用 GB 5009.12—2017《食品安全国家标准 食品中铅的测定》中的方法进行测定。

(6) 磷酸盐沉淀测定。根据 GB/T 35534—2017《胰酪蛋白胨检测方法》进行测定。

(7) 碱性沉淀测定。根据 GB/T 35534—2017 进行测定。

(8) pH 测定。根据 GB/T 35534—2017 进行测定。

1.5 数据处理

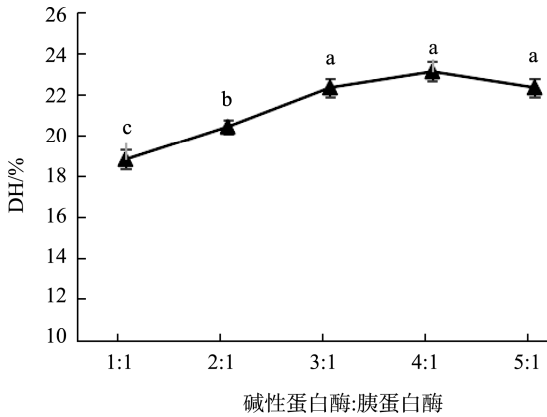
试验中数据均平行测定次, 取平均值。通过 Excel 2014 和 Design-Expert10.0.1 进行数据处理, 图片绘制。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 组合酶添加比例对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

如图 1 所示,随着碱性蛋白酶浓度增大,牦牛乳酪蛋白 DH 呈上升趋势,碱性蛋白酶与胰蛋白酶 4:1 时, DH 上升趋势变缓。因此,将组合酶最适比例确定为碱性蛋白酶:胰蛋白酶=4:1。



注:不同字母表示具有显著性差异($P \leq 0.05$),图 2~6 同。

图 1 组合酶添加比例对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

Fig.1 Effects of combined enzyme addition ratio on the DH of yak milk casein

2.1.2 水解温度对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

如图 2 所示,牦牛乳酪蛋白 DH 在 45~55 °C 区间内呈上升趋势,并在 55 °C 时达到最高值 23.11%。温度超过再升高后, DH 呈下降趋势。这是由于酶在 60 °C 加热条件下部分变性失活所导致^[29]。因此,将水解牦牛乳酪蛋白的最适温度确定为 55 °C。

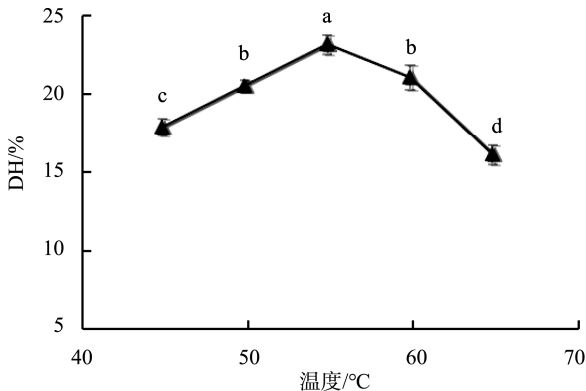


图 2 水解温度对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

Fig.2 Effects of hydrolysis temperature on the DH of yak milk casein

2.1.3 组合酶添加量对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

如图 3 所示,随着组合酶浓度增大,牦牛乳酪蛋白 DH 呈上升

趋势,组合酶添加量高于 2.5% 时, DH 上升趋势变缓。因此,将组合酶最适添加量确定为 2.5%。

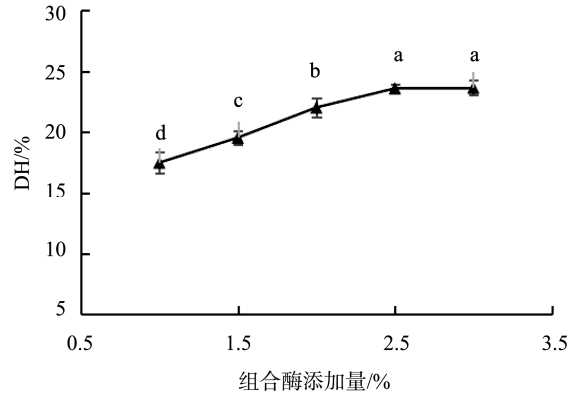


图 3 组合酶添加量对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

Fig.3 Effects of combined enzyme addition on the DH of yak milk casein

2.1.4 底物浓度对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

如图 4 所示,牦牛乳酪蛋白 DH 在底物浓度 5% 时达到最大,随着底物浓度增加, DH 呈下降趋势。底物浓度较高时反应体系流动性会变差,阻碍酶对切割位点的作用,导致蛋白转化率降低^[30]。因此,选择 5% 底物浓度进行牦牛乳酪蛋白水解试验。

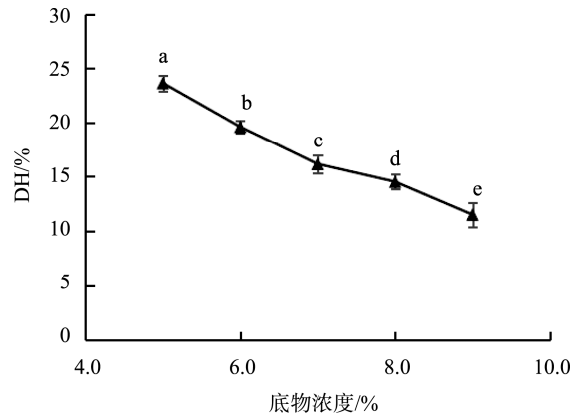


图 4 底物浓度对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

Fig.4 Effects of substrate concentration on the DH of yak milk casein

2.1.5 水解时间对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

如图 5 所示,牦牛乳酪蛋白 DH 随着水解时间的延长,呈上升趋势,在 60~150 min DH 呈线性增加,在 150 min 后,时间继续延长, DH 增加趋势逐渐变缓。因此,将酶解时间确定为 150 min。

2.1.6 水解 pH 对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响

如图 6 所示,牦牛乳酪蛋白的 DH 在水解 pH 6.5~7.0 条件下,呈上升趋势,水解 pH 超过 7.0 时, DH 随着 pH 增加逐渐下降。因此,组合酶水解牦牛乳酪蛋白的最适 pH 7.0。

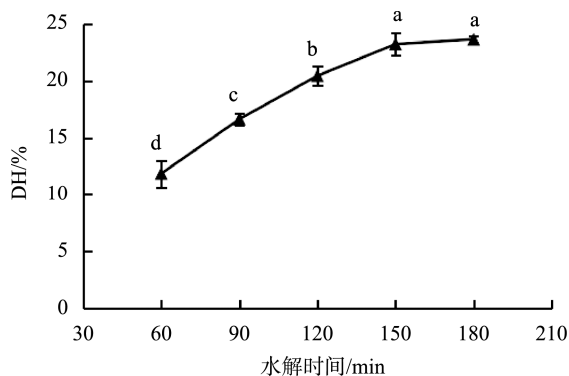


图 5 水解时间对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响
Fig.5 Effects of hydrolysis time on the DH of yak milk casein

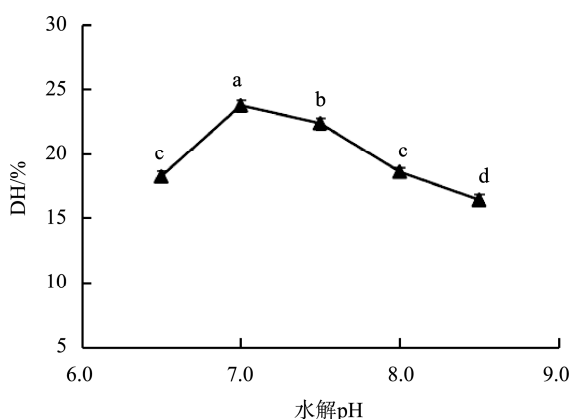


图 6 水解 pH 对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响
Fig.6 Effects of hydrolysis pH on the degree of hydrolysis of yak milk casein

2.2 Box-Behnken 试验及结果分析

以 DH 为响应值, 选取组合酶添加量(A)、水解时间(B)、水解 pH(C)和底物浓度(D) 4 个主要因素, 进行响应面优化试验, 试验结果见表 2。

2.2.1 响应面模型方差分析

响应面试验二次回归方程为 $DH=23.60+0.35A+0.46B-0.12C-0.52D+0.21AB-0.42AC+0.23AD-0.53BC-0.36BD+0.6CD-1.17A^2-1.02B^2-0.90C^2-1.99D^2$ 。模型方差分析结果见表 3。总模型 $P<0.0001$, 极显著, 失拟项 $P=0.0640>0.05$, 不显著, 说明该模型可用于分析和预测组合酶水解牦牛乳酪蛋白 DH; 模型的系数 $R^2=0.9556$, 模型的调整系数 $R^2=0.9112$, 表明实际值与预测值有较高拟合度, 该模型较合理地反映了 4 个因素对酪蛋白水解的影响。模型的一次项 A、B、D, 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 的 P 均小于 0.01, 对酪蛋白 DH 的影响极显著, 一次项 C 不显著。因素 AC、BC、CD 的 $P<0.05$, 对试验结果的影响显著。因 F 越大对 DH 的影响越大, 通过 F 值, 可推断各因素对 DH 的影响顺序为: 底物浓度(D)>水解时间(B)>组合酶添加量(A)>水解 pH(C)。

表 2 Box-Behnken 设计方案及试验结果
Table 2 Box-Behnken design and experimental results

试验号	因素				DH/%
	A 组合酶添加量/%	B 水解时间/min	C 水解 pH	D 底物浓度/%	
1	2.5	180	6.5	5	22.75
2	2.0	150	7.5	5	21.30
3	3.0	150	7.0	6	20.51
4	2.5	150	6.5	4	22.26
5	2.5	150	7.5	4	20.63
6	3.0	150	7.5	5	21.24
7	2.0	150	7.0	4	20.94
8	2.5	120	7.0	4	20.15
9	2.5	180	7.0	4	21.60
10	2.5	150	7.0	5	23.83
11	2.5	150	7.0	5	23.35
12	2.5	180	7.0	6	20.45
13	2.0	150	6.5	5	21.12
14	3.0	150	7.0	4	21.06
15	2.5	120	7.5	5	21.78
16	2.0	120	7.0	5	20.81
17	2.5	150	7.0	5	23.71
18	2.5	150	7.0	5	23.47
19	3.0	180	7.0	5	22.20
20	2.5	150	7.5	6	20.15
21	2.5	150	7.0	5	23.65
22	3.0	150	6.5	5	22.75
23	2.5	120	6.5	5	20.33
24	2.0	180	7.0	5	21.06
25	2.5	150	6.5	6	19.37
26	2.5	120	7.0	6	20.45
27	2.5	180	7.5	5	22.08
28	3.0	120	7.0	5	21.13
29	2.0	150	7.0	6	19.49

2.2.2 响应面和等高线图分析

Design-Expert 10.0.1 软件绘制的响应面图, 见图 7。响应面曲面坡度越陡, 表示两因素交互作用越显著^[31]。如图 7 所示, 组合酶添加量-水解 pH(AC)、水解时间-水解 pH(BC)、底物浓度-水解 pH(CD)交互作用较为显著。底物浓度(D)引起的响应面坡度最陡峭, 该因素对酪蛋白 DH 的影响最大, 其次是水解时间(B)、组合酶添加量(A), 水解 pH(C)引起的响应面坡度最平缓, 对牦牛乳酪蛋白 DH 的影响最小。

表 3 回归模型方差分析
Table 3 Analysis of variance in regression model

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性
模型	43.91	14	3.14	21.52	<0.0001	**
<i>A</i> 组合酶添加量/%	1.45	1	1.45	9.94	0.0070	**
<i>B</i> 水解时间/min	2.51	1	2.51	17.23	0.0010	**
<i>C</i> 水解 pH	0.16	1	0.16	1.12	0.3077	不显著
<i>D</i> 底物浓度/%	3.22	1	3.22	22.12	0.0003	**
<i>AB</i>	0.17	1	0.17	1.15	0.3010	不显著
<i>AC</i>	0.71	1	0.71	4.9	0.0440	*
<i>AD</i>	0.2	1	0.20	1.39	0.2581	不显著
<i>BC</i>	1.12	1	1.12	7.71	0.0148	*
<i>BD</i>	0.53	1	0.53	3.61	0.0784	不显著
<i>CD</i>	1.45	1	1.45	9.96	0.0070	*
<i>A</i> ²	8.83	1	8.83	60.6	<0.0001	**
<i>B</i> ²	6.74	1	6.74	46.25	<0.0001	**
<i>C</i> ²	5.23	1	5.23	35.9	<0.0001	**
<i>D</i> ²	25.57	1	25.57	175.47	<0.0001	**
残差	2.04	14	0.15			
失拟项	1.89	10	0.19	5.16	0.0640	不显著
纯误差	0.15	4	0.037			
总误差	45.95	28				

注: **, 表示 $P < 0.01$, 差异极显著; *, 表示 $P < 0.05$, 差异显著; 模型的系数 $R^2 = 0.9556$, 模型的调整系数 $R^2 = 0.9112$ 。

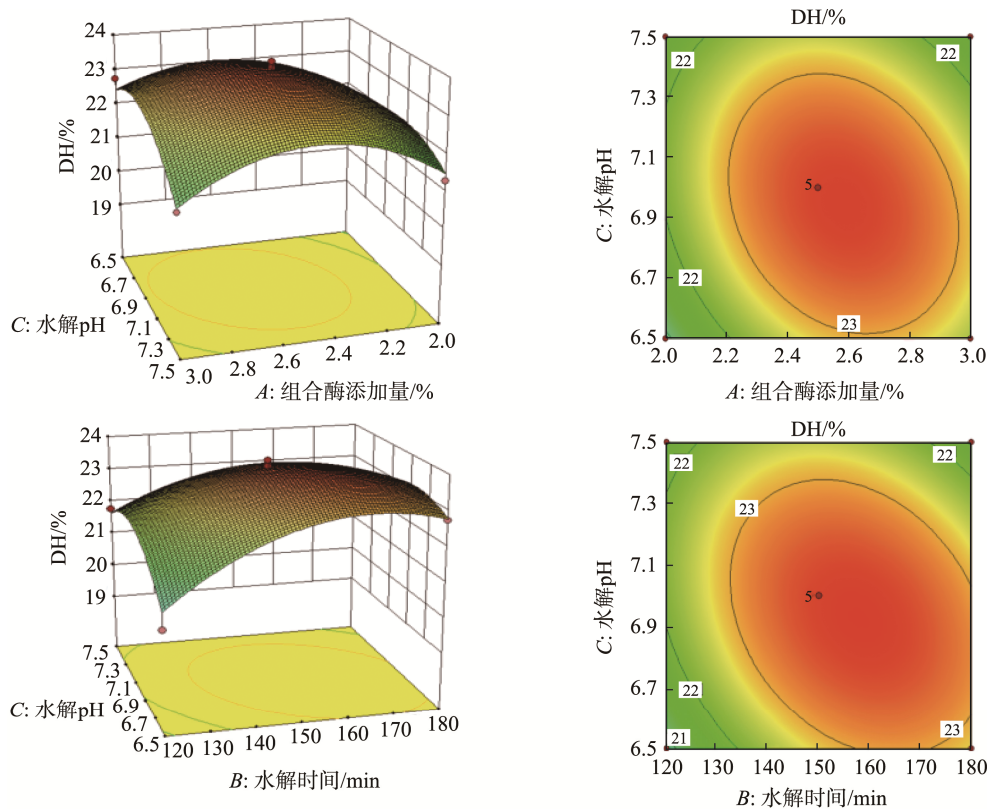


图 7 各因素交互作用的影响面图

Fig. 7 Response surface diagram of interaction of various factors

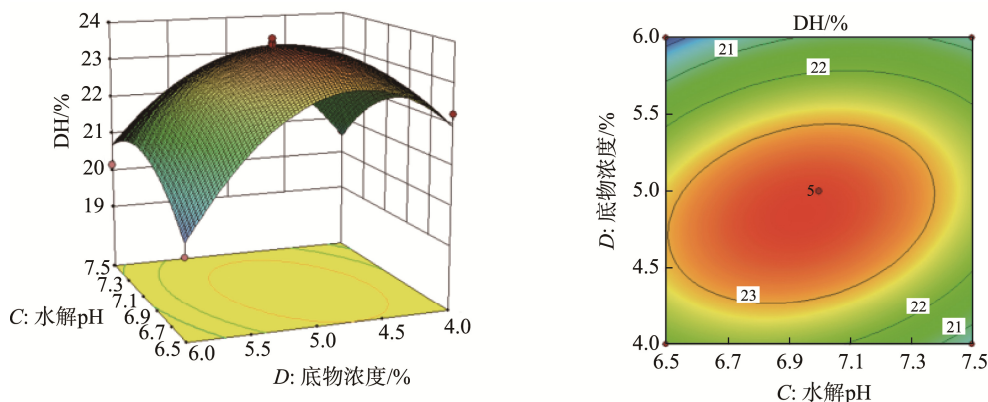


图 7(续) 各因素交互作用的响应面图
Fig.7 Response surface diagram of interaction of various factors

2.2.3 提取工艺确定及验证试验

通过 Design Expert 10.0.1 软件预测出牦牛乳酪蛋白水解最佳工艺条件, 即组合酶添加量 2.61%, 水解时间 160.63 min, 水解 pH 6.9, 底物浓度 4.8%, 预测值 23.79%, 为方便试验操作, 调整后的工艺参数为组合酶添加量 2.6%, 水解时间 160 min, 水解 pH 7.0, 底物浓度 5%, 该条件下牦牛乳酪蛋白 DH 达到 23.63%, 误差为 0.67%。

2.3 牦牛乳酪蛋白胨产品

将牦牛乳酪蛋白水解液收集, 再经过点酸, 中和喷雾干燥的方法, 得到牦牛乳酪蛋白胨产品。

牦牛乳酪蛋白胨产品如图 8 所示, 理化指标检测结果见表 4。

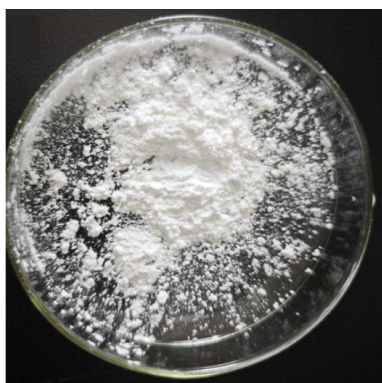


图 8 牦牛乳酪蛋白胨粉末
Fig.8 Yak cheese peptone powder

表 4 理化指标

Table 4 Physical and Chemical criterion

理化指标	检测结果
水分/%	4.76
总氮/%	13.7
灰分/%	9.68
铅/(mg/kg)	未检出
氨氮/%	2.7
磷酸盐沉淀	无
碱性沉淀	无
pH (2.0%)	6.0~7.0

3 结 论

以牦牛乳酪蛋白为试验原料, 通过单因素试验和四因素三水平的响应面分析法对牦牛乳酪蛋白水解工艺进行优化, 并建立牦牛乳酪蛋白水解的回归模型, 确定水解牦牛乳酪蛋白的最佳工艺条件, 即组合酶添加量 2.6%(碱性蛋白酶:胰蛋白酶=4:1), 水解时间 160 min, 水解 pH 7.0, 底物浓度 5%, 该条件下酪蛋白 DH 达到 23.63%。将牦牛乳酪蛋白水解液收集, 再经点酸、过滤、中和及喷雾干燥得到牦牛乳酪蛋白胨产品, 为提升牦牛乳的商业化提供新的思路及新的技术支持。

参考文献

- 刘元林, 田晓静, 黄汇惠, 等. 2 种蛋白酶水解牦牛血液蛋白工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(6): 2377-2384.
LIU YL, TIAN XJ, HUANG HH, et al. Optimization of hydrolysis process of yak blood protein by 2 kind of proteases [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(6): 2377-2384.
- 张金亮, 李义恒, 杨晓丽, 等. 内源性 LPL 及其对牦牛乳风味劣变的影响机制研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(3): 347-353.
ZHANG JL, LI YH, YANG XL, et al. Research progress of endogenous LPL and its influence mechanism on yak milk flavor deterioration [J]. Food and Fermentation Industry, 2023, 49(3): 347-353.
- 吴登宇, 韦体, 马忠仁, 等. 牦牛乳酪蛋白抗氧化肽对 HEK293 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2023, 44(23): 142-150.
WU DY, WEI T, MA ZR, et al. Protective effects of yak cheese protein antioxidant peptides on oxidative stress injury of HEK293 cells [J]. Food Science, 2023, 44(23): 142-150.
- LIU QX, YANG M, ZHAO BT, et al. Isolation of antioxidant peptides from yak casein hydrolysate [J]. RSC Advances, 2020, 10(34): 19844-19851.
- 舒森彪, 张金超, 杨杰, 等. 牦牛乳对小鼠肠道菌群及代谢的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(10): 135-146.
SHU SB, ZHANG JC, YANG J, et al. Effect of yak milk on intestinal microbiota and metabolism in mice [J]. Food Science, 2024, 45(10): 135-146.
- 刘庆雪, 肖梓军. 牦牛乳及其风味物质研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(5): 53-58.
LIU QX, XIAO ZJ. Research progress on yak milk and its flavor substances [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2022, 45(5):

- 53–58.
- [7] 钟丽雯, 鲁迎瑞, 张轶轩, 等. 牦牛乳酪蛋白琥珀酸铁的制备及其结构表征[J]. 中国食品学报, 2024, 24(8): 247–258.
ZHONG LW, LU YR, ZHANG YX, *et al.* Preparation and structural characterization of iron succinate from yak casein [J]. Chinese Journal of Food, 2024, 24(8): 247–258.
- [8] THILL S, SCHMIDT T, WÖLL D, *et al.* A regenerated fiber from rennet-treated casein micelles [J]. Colloid and Polymer Science, 2021, 299(5): 1–6.
- [9] LIU QX, YANG M, ZHAO BT, *et al.* Isolation of antioxidant peptides from yak casein hydrolysate [J]. RSC Advances, 2020, 10(34): 19844–19851.
- [10] 于珍, 布冠好, 王美月, 等. 花生肽的制备及其美拉德反应产物风味特性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(14): 4665–4673.
YU Z, BU GH, WANG MY, *et al.* Preparation of peanut peptides and flavor properties of its Maillard reaction products [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(14): 4665–4673.
- [11] 侯力箫. 鸡副产物制备复合蛋白胨及其性质研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
HOU LX. Study on the preparation and properties of compound peptone from chicken by-products [D]. Changchun: Jilin University, 2017.
- [12] FALLAH M, BAHRAM S, JAVADIAN SR. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media [J]. Food Science & Nutrition, 2015, 3(2): 153–157.
- [13] CHAPMAN M, MARIANO K, MACREADIE I. Lupin peptone as a replacement for animal-derived peptone in rich culture media for yeast [J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 109: 39–40.
- [14] 李佳逸, 阳辉蓉, 陈炼红. 牦牛乳酪蛋白酶解产物抗氧化活性研究[J]. 保鲜与加工, 2022, 22(2): 76–82.
LI JY, YANG HR, CHEN LH. Antioxidant activity of yak milk casein hydrolysates [J]. Preservation and Processing, 2022, 22(2): 76–82.
- [15] 王国英, 王瑞生, 朱树国, 等. 微波水解-氨基酸自动分析仪测定酪蛋白胨中的 17 种氨基酸[J]. 北方药学, 2022, 19(6): 1–5.
WANG GY, WANG RS, ZHU SG, *et al.* Determination of 17 amino acids in casein peptone by microwave hydrolysis-amino acid automatic analyzer [J]. Northern Pharmacy, 2022, 19(6): 1–5.
- [16] ANNA M, ANNA D, ŁUKASZ B, *et al.* Casein hydrolysate and casein-iron chelate as natural bioactive compounds for yoghurt fortification [J]. Applied Sciences, 2022, 12(24): 12903.
- [17] 韩娜, 杨敏, 杨继涛, 等. 酪蛋白酶解物的分离及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 166–170, 229.
HAN N, YANG M, YANG JT, *et al.* Separation and antioxidant activity of casein hydrolysates [J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(9): 166–170, 229.
- [18] 马宇骥, 李键, 王洪志, 等. 复合酶解牦牛乳酪蛋白工艺优化及抗氧化性的研究[J]. 食品科技, 2018, 43(2): 109–114.
MA YJ, LI J, WANG HZ, *et al.* Study on process optimization and antioxidant activity of composite enzymatic hydrolysis of yak milk casein [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(2): 109–114.
- [19] 朱辉. 利用黑水虻幼虫制备胰蛋白胨的工艺研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
ZHU H. The preparation of tryptone from *Hermetia illucens* L. larvae [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017.
- [20] 艾雨晴, 陈松骏, 秦娟, 等. 微生物产蛋白酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 451–458.
AI YQ, CHEN SJ, QIN J, *et al.* Advances in microbial protease production [J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(19): 451–458.
- [21] 董原, 刘晓兰, 郑喜群, 等. 碱性蛋白酶水解时间对玉米谷蛋白理化性质及抗氧化活性的影响[J]. 中国粮油学报, 2024, 39(1): 125–130.
DONG Y, LIU XL, ZHENG XQ, *et al.* Effect of alkaline protease hydrolysis time on physicochemical properties and antioxidant activity of corn glutenin [J]. Chinese Journal of Grain and Oil, 2024, 39(1): 125–130.
- [22] 李丽娟, 孟鹏. 碱性蛋白酶水解大豆分离蛋白制备大豆多肽的工艺条件优化[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(4): 62–66.
LI LJ, MENG P. Optimization of the process conditions for the preparation of soybean peptides from soybean protein isolate by alkaline protease hydrolysis [J]. Microbiology Journal, 2014, 34(4): 62–66.
- [23] 高敏, 安丽平, 刘志罡. 碱性蛋白酶改性大豆蛋白胶黏剂的研究[J]. 大豆科学, 2023, 42(6): 749–756.
GAO M, AN LP, LIU ZG. Study on modification of soybean protein adhesive by alkaline protease [J]. Soybean Science, 2023, 42(6): 749–756.
- [24] 马石霞, 刘高强, 冶秀燕, 等. 亮斑扁角水虻幼虫酶解制备蛋白胨工艺优化及蛋白胨性质[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5337–5349.
MA SX, LIU GQ, YE XY, *et al.* Process optimization and peptone properties of peptone prepared by enzymatic hydrolysis of *Hermetia illucens* larvae [J]. Microbiology Bulletin, 2023, 50(12): 5337–5349.
- [25] 帕尔哈提·柔孜, 刘源. 牛骨髓蛋白及其碱性蛋白酶酶解物的功能特性比较 [J/OL]. 现代食品科技: 1–12. [2024-05-10]. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.0614>
- [26] PALHATI RZ, LIU Y. Comparison of functional properties of bovine bone marrow protein and its alkaline protease hydrolysates [J/OL]. Modern Food Science and Technology: 1–12. [2024-05-10]. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.0614>
- [27] 王彬彬, 刘晓兰, 郑喜群, 等. 玉米谷蛋白水解物抗氧化活性及其对香肠品质改善的研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(2): 103–109.
WANG BB, LIU XL, ZHENG XQ, *et al.* Antioxidant activity of corn gluten hydrolysate and its effect on sausage quality improvement [J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(2): 103–109.
- [28] 崔宁, 刘晓兰, 李冠龙, 等. 玉米谷蛋白水解物对乙醇诱导损伤 LO2 细胞的保护作用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(6): 52–57.
CUI N, LIU XL, LI GL, *et al.* Protective effect of corn gluten hydrolysate on ethanol-induced LO2 cell injury [J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(6): 52–57.
- [29] 满洋. 水产品副产物制备蛋白胨的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
MAN Y. Research on preparation of peptone from aquatic by-products [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.
- [30] 岳喜庆, 王澜儒. 微生物酶水解酪蛋白的最佳工艺[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(11): 111–115.
YUE XQ, WANG LR. Optimal process of microbial enzymatic hydrolysis of casein [J]. Food Research and Development, 2011, 32(11): 111–115.
- [31] 张根生, 丁琬莹, 王月, 等. 响应面法优化双酶酶解酪蛋白工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(21): 237–241.
ZHANG GS, DING WY, WANG Y, *et al.* Response surface methodology was used to optimize the enzymatic hydrolysis of casein [J]. Food Science, 2013, 34(21): 237–241.
- [32] 肖雪, 王金浩, 邵俊花, 等. 超声辅助酶法优化鸡肉蛋白水解工艺[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(2): 124–131.
XIAO X, WANG JH, SHAO JH, *et al.* Optimization of chicken protein hydrolysis by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis [J]. Food Research and Development, 2023, 44(2): 124–131.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)