DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260114004
引用格式: 宋鸿杰, 郑成鑫, 汲广习, 等. 酵母乳的酶解工艺技术优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(16): 135–151.
Song Hongjie, Zheng Chengxin, Ji Guangxi, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process technology of yeast milk [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(16): 135–151. (in Chinese with English abstract).

酵母乳的酶解工艺技术优化

宋鸿杰, 郑成鑫*, 汲广习, 刘成才, 时夫龙, 马 莉

(齐齐哈尔龙江阜丰生物科技有限公司, 齐齐哈尔 161031)

摘 要: 目的 优化酵母乳酶解工艺, 提高产物中的氨基氮与总氮含量。**方法** 通过单因素试验, 考察木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和复合蛋白酶的酶添加量、pH、时间与温度对酶解效果的影响; 进一步利用响应面法分别优化酶工艺参数, 并通过复合酶复配试验确定 3 种酶的最佳添加时间, 并探究非离子表面活性剂的协同增强作用。**结果** 单因素试验最佳参数为: 木瓜蛋白酶添加量 1.5%、pH 6.0、温度 50 ℃、时间 15 h; 风味蛋白酶为添加量 0.7%、pH 7.0、温度 54 ℃、时间 13 h; 复合蛋白酶为添加量 1.8%、pH 7.5、温度 60 ℃、时间 12 h。响应面优化后, 木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和复合蛋白酶的氨基氮含量实测值分别为 3.83%±0.04%、3.93%±0.06%和 4.12%±0.06%, 总氮含量的实测值分别为 9.65%±0.04%、9.78%±0.05%和 9.87%±0.04%, 实测值与模型预测值接近, 证实模型可靠性。复合酶复配试验确定木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和复合蛋白酶的最佳添加时间依次为 2、4、5 h, 氨基氮含量达 4.24%±0.03%, 总氮含量达 9.97%±0.04%。此外, 添加 0.030%的非离子表面活性剂可进一步强化酶解效果, 使氨基氮含量提高到 4.57%±0.05%, 总氮含量为 10.22%±0.04%。**结论** 采用复合酶复配工艺结合非离子表面活性剂的添加可显著提升酶解效果, 为后续发酵工业副产物酵母乳的高值化利用提供了高效、可行的技术方案和重要的理论依据。

关键词: 酵母乳; 酶解; 木瓜蛋白酶; 风味蛋白酶; 复合蛋白酶
中图分类号: TS201.1 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)16–0135–17

Optimization of enzymatic hydrolysis process technology of yeast milk

SONG Hong-Jie, ZHENG Cheng-Xin*, JI Guang-Xi, LIU Cheng-Cai, SHI Fu-Long, MA Li

(*Qiqihar Longjiang Fufeng Biotechnology Co*., *Ltd*., *Qiqihar* 161031, *China*)

ABSTRACT: Objective To optimize the enzymatic hydrolysis process technology of yeast milk, improve the content of amino nitrogen and total nitrogen in the product. **Methods** The effects of enzyme dosage, pH, time and temperature of papain, flavor protease and complex protease on enzymatic hydrolysis were investigated using single-factor experiments. Subsequently, response surface methodology was employed to optimize the enzyme process parameters, and the optimal addition time of the 3 kinds of enzymes was determined by complex enzyme experiments, and the synergistic enhancement effect of nonionic surfactants was explored. **Results** The optimal parameters from single-factor experiments were as follows: papain dosage 1.5%, pH 6.0 and temperature 50 °C, time 15 h; flavor

收稿日期: 2026-01-14
第一作者: 宋鸿杰(2000—), 女, 硕士, 主要研究方向为食品工程。E-mail: 2118292826@qq.com
***通信作者:** 郑成鑫(1985—), 男, 主要研究方向为生物发酵。E-mail: songhj1219@163.com

protease was added at 0.7%, pH 7.0, temperature 54 ℃ and time 13 h; the complex protease dosage 1.8%, pH 7.5, temperature 60 ℃ and time 12 h. After response surface optimization, the measured amino nitrogen content for papain, flavor protease and complex protease were 3.83%±0.04%, 3.93%±0.06% and 4.12%±0.06%, respectively, and the measured total nitrogen content were 9.65%±0.04%, 9.78%±0.05% and 9.87%±0.04%, respectively. The measured values were close to the model's predicted values, confirming the reliability of the model. The compound enzyme combination test determined that the optimal addition times for papain, flavor protease and complex protease were 2, 4 and 5 h, and the amino nitrogen content was 4.24%±0.03% and total nitrogen content was 9.97%±0.04%. Furthermore, the addition of 0.030% nonionic surfactant further enhanced the enzymatic hydrolysis, increasing the amino nitrogen content to 4.57%±0.05% and total nitrogen content to 10.22%±0.04%. **Conclusion** The combination of complex enzyme technology with the addition of nonionic surfactant significantly improves the enzymolysis effect, providing an efficient and feasible technical approach and an important theoretical basis for the high-value utilization of yeast milk, a by-product of the fermentation industry.

KEY WORDS: yeast milk; enzymatic hydrolysis; papain; flavor protease; complex protease

0 引 言

酵母抽提物，又称酵母水解物，是以酿酒酵母为菌种，经液体发酵获得菌体，再通过自溶或外源酶催化水解后，浓缩或干燥制成的产品[1]。作为一种成熟稳定的功能性原料，酵母抽提物不仅富含核苷酸、小分子肽、游离氨基酸、功能性糖类及多种微量元素等酵母细胞内的可溶性成分[2−3]，还具备生产成本低、原料供应充足等优势，使其在动物饲料添加剂[4]、食品调味与加工[5]、化妆品活性成分[6]及微生物发酵培养基[7]等多个领域实现规模化应用，成为连接农业副产物资源化利用与高附加值产品生产的重要纽带[8]。

酵母乳是酵母发酵液放罐后，经分离、洗涤工序纯化得到的高纯度酵母细胞悬浮液，也是酵母抽提物工业化生产的核心中间原料。当前酵母抽提物的研究重点集中在酵母乳的酶解过程，尤其是酶的种类与作用机制。木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、纤维素酶等是常用酶制剂，可有效促进酵母细胞自溶[9]。相较于传统的自溶法，酶解法能够更有效地加速细胞裂解并释放细胞内功能成分[9]，同时提高产物中氨基氮与总氮含量[10]，进而改善产品风味与营养品质，已逐步成为主流工艺[11]。在提升酶解效率方面，研究表明，等离子体裂解剂，如乙酸乙酯可促进酶解过程中固形物与蛋白质的释放，进而提升酵母提取物回收率[9]。此外，在单一酶制剂的研究基础上，有研究采用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶等多种酶复配，提高了啤酒酵母中氨基氮的得率[12]。另有研究发现，非离子表面活性剂可降低酶用量并增强水解效率[13−14]。然而，现有研究多集中于单一助剂的浓度筛选，对表面活性剂与酶分子间的相互作用机制缺乏系统探讨。此外，现有工艺对氨基氮与总氮含量的同步提升存在瓶颈，当酶解液氨基氮含量超过 4.0%时，进一步增加往往伴随总氮损失[15]。氨基氮与总氮含量作为考察指标，分别反映酵母细胞内游离氨基酸释放量与总蛋白质水解程度，是衡量酵母抽提物营养品质与加工性能的核心指标，符合 GB/T 23530—2009《酵母抽提物》的要求。然而，当前工艺在酶的种类、协同配比、复合酶复配添加时间及酶促助剂的优化仍存在提升空间，制约了氨基氮与总氮含量的进一步提高，且多数研究尚未实现酶复配与酶促助剂的协同优化，难以兼顾酶解效率与产品品质[16]。

为解决上述问题，本研究以自溶后的酵母乳为原料，以氨基氮与总氮含量为核心评价指标，系统开展酶解工艺优化，通过单因素试验筛选关键工艺参数，进一步采用响应面法分析 3 种蛋白酶在不同条件下对酶解产物的交互影响，确定各单一酶的最优参数，进而通过复合酶复配试验，探索酶添加时间对协同水解效果的作用，并引入非离子表面活性剂作为酶促助剂，考察其添加量对酶解效果的提升作用，旨在通过多阶段工艺优化，提高酵母乳中氨基氮与总氮含量，建立高效酶解体系，为酵母乳工业化生产提供理论支持与技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

酵母菌株由齐齐哈尔龙江阜丰生物科技有限公司菌种库保存，菌株为外购获得，均采用的菌株属于酿酒酵母菌种。

氢氧化钠(NaOH)(分析纯，纯度≥96.0%)(国药集团化学试剂有限公司)；柠檬酸(纯度≥99.5%)、乙酸乙酯(生化试剂，纯度≥99.9%)、异丁醇(纯度≥99.5%)、乳酸乙酯(分析纯，纯度≥99.0%)、甲醛溶液(纯度 37%)、一水柠檬酸(纯度≥99.9%)(吉林协联生物科技有限公司)；木瓜蛋白酶(10.0×10^4 U/g)(内蒙古邦吉生物科技有限公司)；风味蛋白酶(10.0×10^4 U/g)(山东艾科森特生物科技有限公司)；复合

蛋白酶(8.0×10^4 U/g)(南宁庞博有限公司); 非离子表面活性剂(D0WFAX^{TM} DF-103T, 广州恒宇化工有限公司)。

1.1.2　仪器与设备

GRJD 10D-6 一级种子罐、GRJ-50D 二级种子罐、GRJD 120-100D 发酵罐[优誓(北京)生物技术有限公司]; LG16-C 高速离心机(北京雷博尔医疗器械有限公司); ML104T 电子分析天平(精度 0.1 mg)、S220-K 台式 pH 计[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司]; HH-2 电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); 722-S 可见分光光度计(上海棱光技术有限公司); SPX-150B-E 生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); VORTEX-6 旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); ATN-300 型自动凯氏定氮仪(上海洪纪仪器设备有限公司)。

1.2　分析方法

总氮含量的测定: 总氮含量参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法测定[17]。

氨基氮含量的测定: 氨基氮含量参考 GB/T 20886.2—2021《酵母产品质量要求 第 2 部分: 酵母加工制品》中的甲醛电位滴定法[18]。

取酶解溶液 15 mL, 用 0.05 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 8.2, 保持 1 min 不变, 随后缓慢加入 5 mL 甲醛溶液, 放置 1 min 后, 再用 NaOH 溶液调 pH 至 9.2, 记录消耗 NaOH 的体积为 V_1, 以蒸馏水作为对照组, 同样操作调 pH 至 9.2 并记录消耗 NaOH 的体积为 V_2。氨基氮含量计算见公式(1):

$$X/\%=\frac{(V_1-V_2)\times0.014\times c}{w\times m}\times100\% \quad (1)$$

式中: X 为样品的氨基氮的含量, %; c 为 NaOH 标准滴定溶液的浓度, mol/L; V_1 为样品消耗 NaOH 溶液的体积, mL; V_2 为蒸馏水消耗 NaOH 溶液的体积, mL; w 为样品的除 NaCl 干基率, %; m 为样品的质量, g。

1.3　工艺流程

本研究的总体工艺流程图见图 1。

1.4　实验方法

1.4.1　酵母乳的制备

将无菌室培育的酵母菌种依次进行扩培: 先接种至一级种子罐(30 ℃、pH 5.0, 12 h), 再转接至二级种子罐(30 ℃、pH 5.0, 12 h), 随后转入发酵罐(30 ℃、pH 5.0, 12 h)继续发酵。培养结束后, 离心分离获取种子液, 储存备用。将种子液接种至发酵罐进行发酵, 发酵结束后再次离心, 收集上清液即为酵母乳。

1.4.2　自　溶

取适量的酵母乳, 先以蒸馏水配制为 13%质量浓度的酵母悬液, 随后加入 1.5%乙酸乙酯, 以促进酵母细胞壁破裂, 进而增强后续溶出效果; 接着用 NaOH 与柠檬酸调节悬液 pH 至 5.0, 最终控制体系在 30 ℃温度下进行自溶反应。

1.4.3　复合酶酶解单因素试验

取自溶后的酵母乳, 分别添加木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和复合蛋白酶进行酶解。以氨基氮和总氮含量为评价指标, 分别对木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和复合蛋白酶进行酶添加量、酶解 pH、酶解温度和酶解时间 4 个因素的单因素试验。具体设置如下。

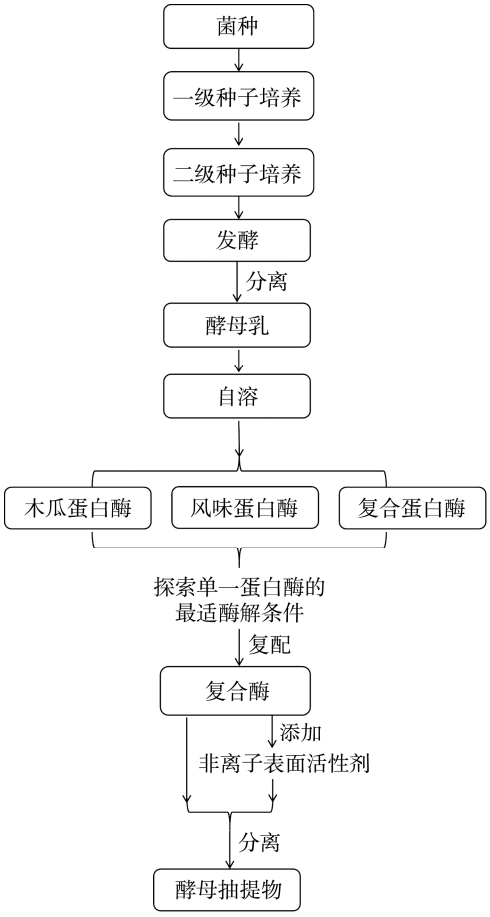


图 1　工艺流程图

Fig.1　Diagram of process flow

(1)酶添加量试验

木瓜蛋白酶固定酶解温度 50 ℃、pH 6.0、时间 14 h, 酶添加量设为 1.1%、1.3%、1.5%、1.7%、1.9%; 风味蛋白酶固定酶解温度 54 ℃、pH 7.0、时间 14 h, 酶添加量设为 0.3%、0.5%、0.7%、0.9%、1.1%; 复合蛋白酶固定酶解温度 60 ℃、pH 7.5、时间 14 h, 酶添加量设为 1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%。

(2)酶解 pH 试验

木瓜蛋白酶固定酶添加量 1.5%、酶解温度 50 ℃、时间 14 h, pH 设为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0; 风味蛋白酶固定酶添加量 0.7%、酶解温度 54 ℃、时间 14 h, pH 设为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0; 复合蛋白酶固定酶添加量 1.8%、酶解温度 60 ℃、时间 14 h, pH 设为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5。

(3)酶解温度试验

木瓜蛋白酶固定酶添加量 1.5%、pH 6.0、酶解时间 14 h, 温度设为 40、45、50、55、60 ℃; 风味蛋白酶固定酶添加量 0.7%、pH 7.0、酶解时间 14 h, 温度设为 46、50、54、58、62 ℃; 复合蛋白酶固定酶添加量 1.8%、pH 7.5、酶解时间 14 h, 温度设为 50、55、60、65、70 ℃。

(4)酶解时间试验

木瓜蛋白酶固定酶添加量 1.5%、温度 50 ℃、pH 6.5, 酶解时间设为 13、14、15、16、17 h; 风味蛋白酶固定酶添加量 0.7%、温度 54 ℃、pH 7.0, 酶解时间设为 7、10、13、16、19 h; 复合蛋白酶固定酶添加量 1.8%、温度 60 ℃、pH 7.5, 酶解时间设为 8、10、12、14、16 h。

1.4.4 响应面法工艺优化

单因素试验表明酶解时间在一定范围内对氨基氮和总氮含量的提高效果不显著, 影响较小, 故响应面法排除该因素。在单因素的基础上进一步细化试验指标, 采用响应面法结合 Box-Behnken 设计, 分别优化 3 种酶的酶添加量(%)、酶解 pH、酶解温度(℃), 设置 3 个变量和 3 个水平共 17 个试验方案。以氨基氮、总氮含量为响应值(表 1~3), 基于试验结果开展中试, 进一步优化确定各酶最佳酶解工艺参数。

表 1 木瓜蛋白酶响应面优化因素水平表

Table 1 Factors and levels table of response surface optimization of papain

水平	A_1(酶解温度)/℃	B_1(酶解 pH)	C_1(酶添加量)/%
–1	48	5.8	1.3
0	50	6.0	1.5
1	52	6.2	1.7

表 2 风味蛋白酶响应面优化因素水平表

Table 2 Factors and levels table of response surface optimization of flavor protease

水平	A_2(酶解温度)/℃	B_2(酶解 pH)	C_2(酶添加量)/%
–1	52	6.8	0.5
0	54	7.0	0.7
1	56	7.2	0.9

表 3 复合蛋白酶响应面优化因素水平表

Table 3 Factors and levels table of response surface optimization of complex protease

水平	A_3(酶解温度)/℃	B_3(酶解 pH)	C_3(酶添加量)/%
–1	58	7.3	1.7
0	60	7.5	1.8
1	62	7.7	1.9

1.4.5 复合酶酶解复配效果试验

在前期已优化的酶解工艺参数基础上, 本研究采用分阶段添加策略, 考察不同加酶时间点对酵母酶解效果的影响。具体方案如下: 木瓜蛋白酶的添加时间分别设定为 1、2、3 h; 风味蛋白酶的添加时间分别设定为 3、4、5 h; 复合蛋白酶的添加时间分别设定为 4、5、6 h。酶解反应进行 12 h 后, 升温至 65 ℃并维持 30 min 以灭酶, 随后测定酶解产物中氨基氮与总氮的含量, 从而评价复合酶复配体系对酵母乳酶解效率的影响。

1.4.6 酶促进剂的添加量对酵母乳酶解效果的影响

在复合蛋白酶已确定的最佳反应条件下, 添加非离子表面活性剂, 开展其不同添加量、不同添加时间的平行试验。首先设置添加量为 0.015%, 添加时间为 0、1、2、3、4、5 h; 以氨基氮含量和总氮含量为评价指标筛选最佳添加时间; 其次基于最佳添加时间, 设置添加量分别为 0.015%、0.020%、0.025%、0.030%、0.035%、0.040%、0.045%, 以氨基氮和总氮含量为指标, 考察酶促进剂的添加对酵母乳的水解效果的影响。

1.5 数据处理

采用 Origin 2024、SPSS 27.0 和 Design Expert 13 软件进行数据处理分析, 每组实验设置 3 次平行, 数值表示为平均值±标准偏差。P<0.05 表示差异具有统计学意义, P<0.01 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 酶添加量对酵母乳水解效果的影响

如图 2 所示, 随着酶添加量的增加, 氨基氮与总氮含量均呈现先上升后下降的趋势。3 种蛋白酶的最佳添加量分别为: 木瓜蛋白酶 1.5%、风味蛋白酶 0.7%、复合蛋白酶 1.8%。该条件下, 木瓜蛋白酶组的氨基氮与总氮含量分别为 3.74%±0.05% 和 9.55%±0.04%; 风味蛋白酶组为 3.84%±0.05% 和 9.71%±0.04%; 复合蛋白酶组为 3.99%±0.06%和 9.75%±0.04%。对比 3 种酶最优条件下的水解效果, 可以得出复合蛋白酶对于酵母水解物中氨基氮和总氮的提高效果明显高于木瓜蛋白酶和风味蛋白酶, 与廖鲜艳等[19]的研究结果相似, 这主要是复合蛋白酶整合了多种蛋白酶的催化特性, 可通过不同的酶切位点实现多靶点水解, 相比单一蛋白酶对底物降解更彻底[20]。当酶添加量超过最佳水平后, 两种氮含量均出现下降, 这可能是酶浓度过高引起酶与底物竞争, 部分酶活性受到抑制, 导致整体催化效率降低[21]。因此, 确定木瓜蛋白酶、风味蛋白酶与复合蛋白酶的较优添加量分别为 1.5%、0.7%和 1.8%。

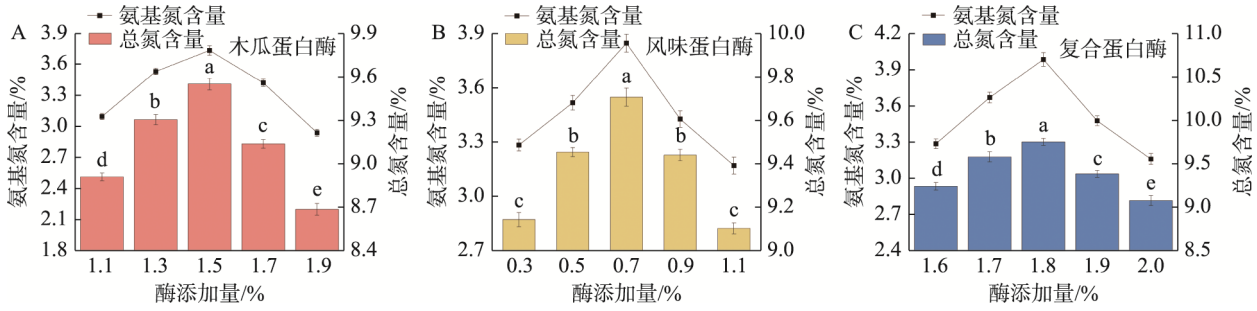
2.2 酶解 pH 对酵母乳水解效果的影响

由图 3 可以看出, 随着 pH 的增加, 氨基氮含量和总氮含量均呈现先增加后下降的趋势。木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶的最优酶解 pH 分别为 6.0、7.0、7.5。在此条件下, 木瓜蛋白酶组的氨基氮和总氮含量分别为 3.78%±0.03% 和 9.58%±0.03%, 风味蛋白酶组分别为

3.87%±0.04%和 9.74%±0.05%，复合蛋白酶组分别为4.02%±0.04%和9.79%±0.03%。这是因为木瓜蛋白酶在 pH 6.0 时活性最大，而当 pH 高于或低于最适 pH 范围都会使木瓜蛋白酶活性降低[22]；同理，风味蛋白酶在 pH 7.0 时水解效果更好[23]，复合蛋白酶在 pH 7.5 时其活性最强[24]。可见，本研究的木瓜蛋白酶的最适 pH 偏酸性，风味蛋白酶偏中性，复合蛋白酶偏碱性。因此，确定木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和复合蛋白酶的较优酶解 pH 分别为 6.0、7.0 和 7.5。

2.3　酶解温度对酵母乳水解效果的影响

由图 4 可以看出，随着酶解温度的增加，氨基氮含量和总氮含量均呈现先增加后下降的趋势。其中，在木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶作用下的最优酶解温度分别为 50、54、60 ℃，氨基氮含量和总氮含量对应分别为3.81%±0.03%和9.61%±0.03%、3.90%±0.07%和9.77%±0.04%、4.08%±0.03%和 9.82%±0.02%。蛋白酶的水解活性受温度影响较大[25−26]，适度升温有助于蛋白质结构展开，促进酶与底物结合；但温度过高会引起酶蛋白变性，导致活性中心失活，催化效率下降[27]。氨基氮含量是反映蛋白质水解程度的重要指标，其值越高，说明酵母乳中蛋白质被水解得越充分[28]。在各自最优温度下，复合蛋白酶组的氨基氮与总氮含量均优于其他两组，表明本试验条件下复合蛋白酶对酵母乳的水解效果最佳。综上所述，确定木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和复合蛋白酶的最优酶解温度分别为 50、54、60 ℃。



注：不同小写字母表示组间存在显著性差异(P<0.05)，图 3~5 同。

图 2　酶添加量对酵母乳水解效果的影响

Fig.2　Effects of enzyme dosage on the hydrolysis effect of yeast milk

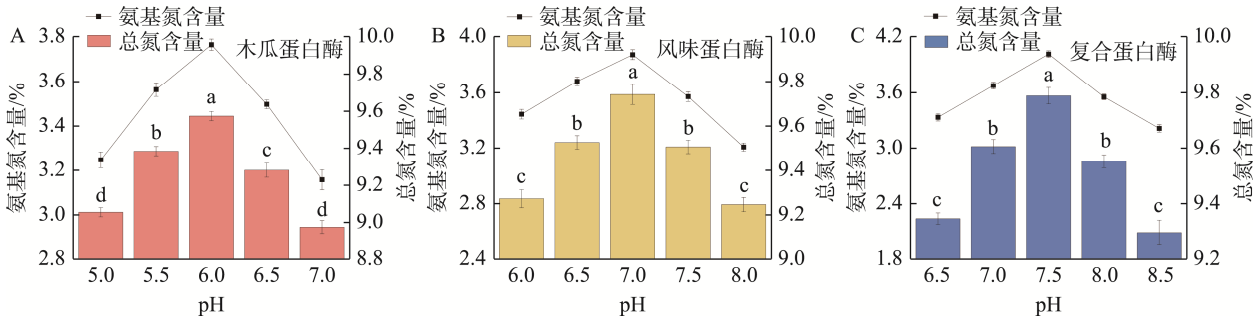


图 3　pH 对酵母乳水解效果的影响

Fig.3　Effects of pH on the hydrolysis effect of yeast milk

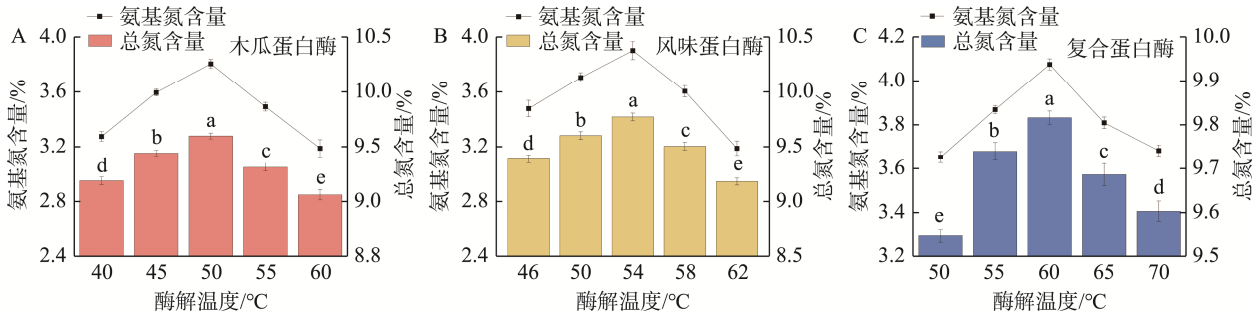


图 4　酶解温度对酵母乳水解效果的影响

Fig.4　Effects of enzymatic hydrolysis temperature on hydrolysis effect of yeast milk

2.4 酶解时间对酵母乳水解效果的影响

由图 5 可以看出，随着酶解时间的增加，3 种酶的氨基氮含量和总氮含量均呈现先增加后下降的趋势。木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶作用下的最优酶解时间分别为 15、13、12 h，氨基氮含量和总氮含量对应最高含量分别为 3.82%±0.05% 和 9.63%±0.04%、3.92%±0.03% 和 9.77%±0.03%、4.09%±0.06%和 9.83%±0.03%。木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶在酶解时间分别在 13~15、7~13、8~12 h 范围内，氨基氮和总氮含量上升较快，随酶解时间的增大而提高，当酶解时间分别大于 15、13、12 h 时，氨基氮和总氮含量趋于稳定，而当酶解时间分别超过 16、16、14 h 时间时，含量下降说明酶已将底物水解完全[29–30]。因此，确定较优酶解时间分别为 15、13、12 h。

从单因素实验能够看出，木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶在酶解时间分别在 14~16、10~16、10~14 h 范围内对氨基氮和总氮含量影响不显著，说明此范围内酶解时间对酵母乳的水解效果影响相对较小，因此后续响应面试验将酶解时间因素排除。

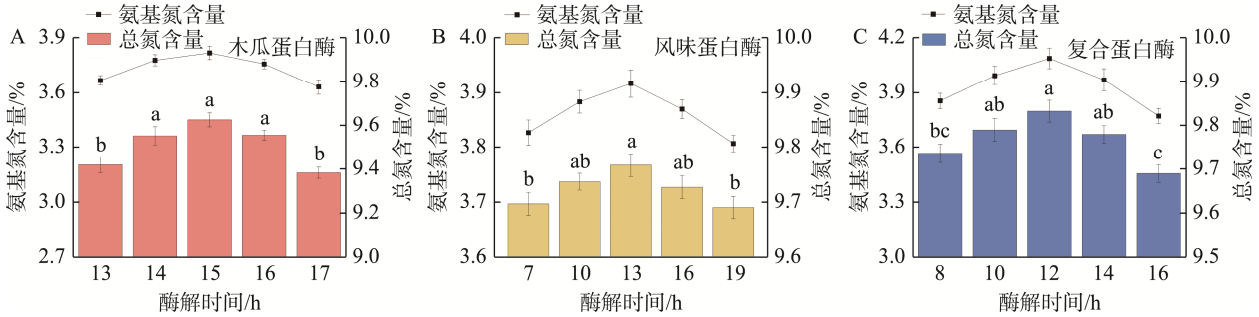


图 5 酶解时间对酵母乳水解效果的影响

Fig.5 Effects of enzyme hydrolysis time on the hydrolysis effect of yeast milk

2.5 木瓜蛋白酶响应面试验分析

得到单因素试验结果后，通过响应面试验确定酶解条件的显著性，利用响应面试验优化木瓜蛋白酶的提取条件，以酶解添加量(%)、酶解 pH、酶解温度(℃)为因素，氨基氮含量(%)和总氮含量(%)为响应值进行试验，见表 4。

表 4 木瓜蛋白酶 3 水平析因设计结果

Table 4 Results of factorial design for the 3 levels of papain

试验序号	A_1(酶解温度)/℃	B_1(酶解 pH)	C_1(酶添加量)/%	氨基氮含量/%	总氮含量/%
1	50	6.0	1.5	3.81	9.62
2	50	6.2	1.7	3.37	9.21
3	50	5.8	1.3	3.65	9.44
4	52	6.0	1.3	3.42	9.20
5	50	6.0	1.5	3.80	9.61
6	48	5.8	1.5	3.53	9.34
7	50	6.0	1.5	3.70	9.51
8	50	6.0	1.5	3.79	9.59
9	48	6.2	1.5	3.36	9.16
10	52	6.0	1.7	3.37	9.13
11	48	6.0	1.7	3.56	9.33
12	50	6.0	1.5	3.83	9.65
13	52	5.8	1.5	3.31	9.16
14	52	6.2	1.5	3.15	9.01
15	50	5.8	1.7	3.60	9.41
16	48	6.0	1.3	3.61	9.42
17	50	6.2	1.3	3.42	9.32

表 5 表示氨基氮含量的回归模型方差分析结果，结果显示该模型 F 为 39.97、P 为 3.40e^{-5} (<0.0001)，具有极显著性；失拟项 P>0.05，表明模型拟合良好，误差较小[31]。模型决定系数 R^2 为 0.9809，调整后 R^2_{adj} 为 0.9564，说明模型具有较高的拟合优度和预测可靠性。此外，因素 A_1、B_1，以及二次项 A_1^2、B_1^2、C_1^2 对氨基氮含量均具有显著性影响，A_1、B_1、C_1 的 F 分别为 45.76、43.53、2.79 可知，3 个因素对氨基氮含量的影响大小为：A_1>B_1>C_1。

利用 Design-Expert 13 软件进行多元线性回归和二项式拟合，得出的二次多项回归方程为：氨基氮含量/%=3.79–0.10A_1–0.10B_1–0.03C_1+0.01A_1B_1–0.23A_1^2–0.21B_1^2–0.06C_1^2。综上，该响应面分析所建立的变量间关系可靠，可用于氨基氮含量的预测与优化。

表 5 木瓜蛋白酶氨基氮含量方差分析结果

Table 5 Results of variance analysis of amino nitrogen content in papain

方差来源	方差	自由度	均方	F	P
模型	0.6447	9	0.0716	39.97	<0.0001
A_1	0.0820	1	0.0820	45.76	**
B_1	0.0780	1	0.0780	43.53	**
C_1	0.0050	1	0.0050	2.79	0.1388
A_1B_1	0.0000	1	0.0000	0.01	0.9093
A_1C_1	0.0000	1	0.0000	0.00	1.0000
B_1C_1	0.0000	1	0.0000	0.00	1.0000
A_1^2	0.2310	1	0.2310	128.92	**
B_1^2	0.1933	1	0.1933	107.85	**
C_1^2	0.0161	1	0.0161	8.96	*
残差	0.0125	7	0.0018		
失拟项	0.0024	3	0.0008	0.32	0.8122
纯误差	0.0101	4	0.0025		
总离差	0.6572	16			
R^2	0.9809	R^2_{adj}	0.9564		

注：*表示显著(P<0.05)；**表示极显著(P<0.01)，表 6、8~9、11~12 同。

本研究采用 Box-Behnken 设计与响应面分析，探讨了各因素对氨基氮含量的影响。等高线的形态能够反映出各因素的交互作用对响应值的影响，当等高线为圆形时，其交互作用不显著，等高线越接近椭圆形、分布越密集，表明交互作用越显著，曲面也越陡峭[32−33]。如图 6 所示，在酶解温度与酶解 pH 的交互作用中，其等高线近似圆形，说明二者对氨基氮含量的共同影响较小；酶解温度与酶添加量的交互作用显著，其等高线呈椭圆形且曲面陡峭，氨基氮含量随酶解温度增加而上升，随后下降，表明酶与底物已充分反应，酶解温度的影响大于酶添加量[34]。酶解 pH 与酶添加量的交互作用显著，等高线呈密集椭圆形，且酶解 pH 的影响比酶添加量更为明显。以上响应面分析结果与方差分析相符，验证了模型的可靠性。

经响应面优化得出最佳工艺条件为：酶解温度 49.57 ℃，酶解 pH 5.95，酶添加量 1.46%。在该条件下进行 3 次平行验证实验，测得氨基氮含量为 3.84%±0.06%。

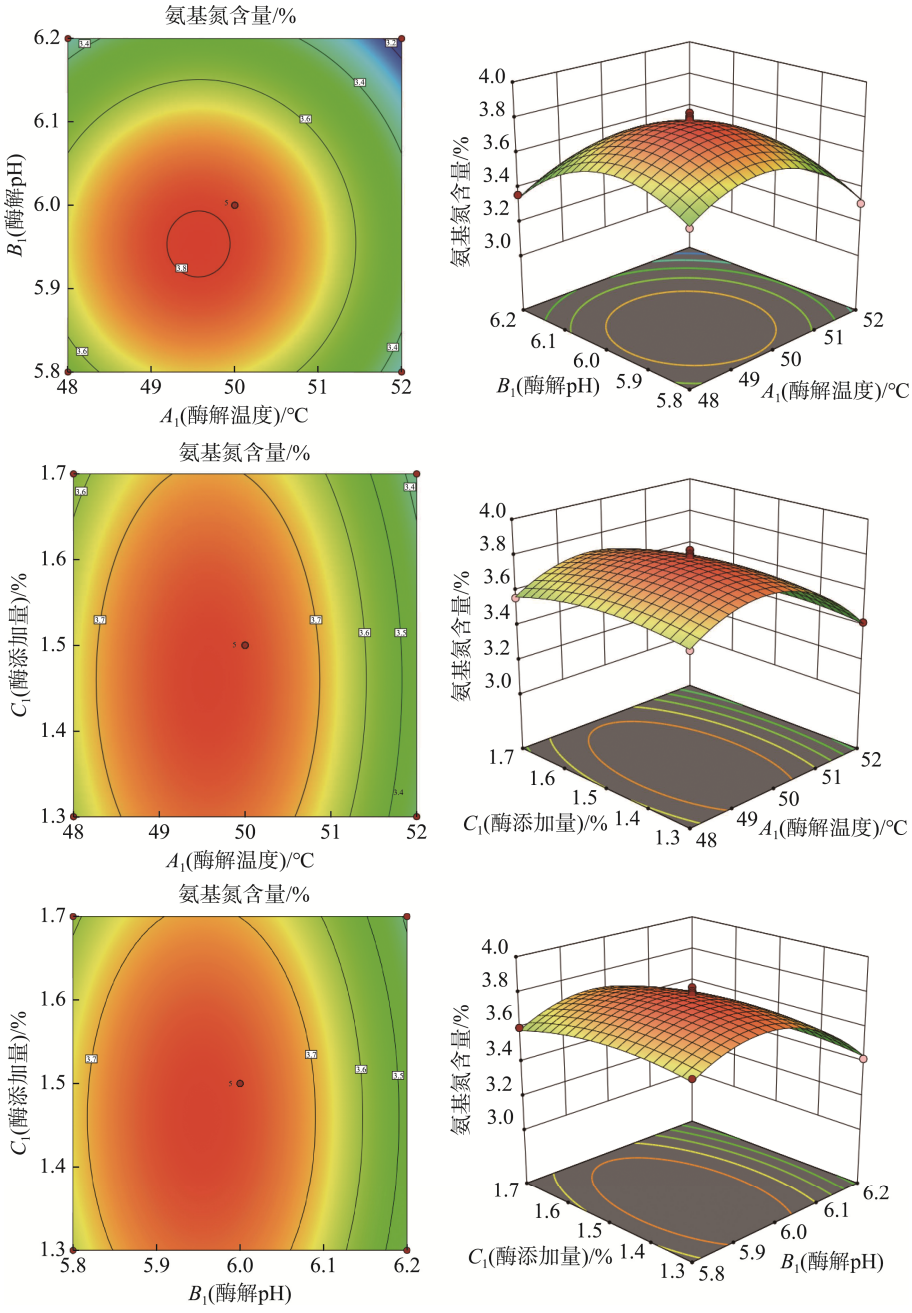


图 6　木瓜蛋白酶不同因素交互作用对氨基氮含量的影响

Fig.6　Effects of interaction of different factors of papain on amino nitrogen content

表 6 方差分析结果显示，总氮含量回归模型极显著 F=38.03，P=4.02e^{-5} (<0.0001)，具有极显著性；失拟项 P 为 0.9380 (>0.05)不显著，表明模型拟合良好，误差较小。模型决定系数 R^2=0.9800，调整后 R^2_{adj}=0.9542，说明模型具有较高的预测可靠性。各因素以及二次项对总氮含量均有显著影响。A_1、B_1、C_1 的 F 分别为 40.36、30.31、6.46，影响因素的主次顺序为 A_1>B_1>C_1。得到的二次多项式回归方程为：总氮含量/%=9.60–0.09A_1–0.08B_1–0.04C_1+0.01A_1B_1+0.01A_1C_1–0.02B_1C_1–0.25A_1^2–0.18B_1^2–0.07C_1^2。该模型可靠，可用于总氮含量的预测与工艺优化。

如图 7 所示，从响应面的等值线与极点分布可知，实验因素交互作用下总氮含量存在最大值。在酶解温度与酶解 pH 的交互作用中，酶解温度的影响更为突出；当固定酶添加量时，总氮含量随酶解温度升高先升后降，且酶解温度的影响程度高于酶添加量；酶解 pH 与酶添加量的交互作用对应曲面坡度较陡、等高线密集且呈椭圆形，同时酶解 pH 对应的曲面坡度更大，说明酶解 pH 对总氮含量的影响更显著[35]。响应面分析结果与方差分析结论一致，验证了本研究所建模型的可靠性。

经响应面优化得出最佳工艺条件为：酶解温度 49.59 ℃，酶解 pH 5.96，酶添加量 1.46%，测得总氮含量为 9.66%±0.05%。

表 6 木瓜蛋白酶总氮含量方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis of total nitrogen content in papain

方差来源	方差	自由度	均方	F	P
模型	0.5963	9	0.0663	38.03	<0.0001
A_1	0.0703	1	0.0703	40.36	**
B_1	0.0528	1	0.0528	30.31	**
C_1	0.0112	1	0.0112	6.46	*
A_1B_1	0.0002	1	0.0002	0.13	0.7299
A_1C_1	0.0001	1	0.0001	0.06	0.8175
B_1C_1	0.0016	1	0.0016	0.92	0.3698
A_1^2	0.2669	1	0.2669	153.18	**
B_1^2	0.1315	1	0.1315	75.50	**
C_1^2	0.0232	1	0.0232	13.32	**
残差	0.0122	7	0.0017		
失拟项	0.0011	3	0.0004	0.13	0.9380
纯误差	0.0111	4	0.0028		
总离差	0.6085	16			
R^2	0.9800	R^2_{adj}	0.9542		

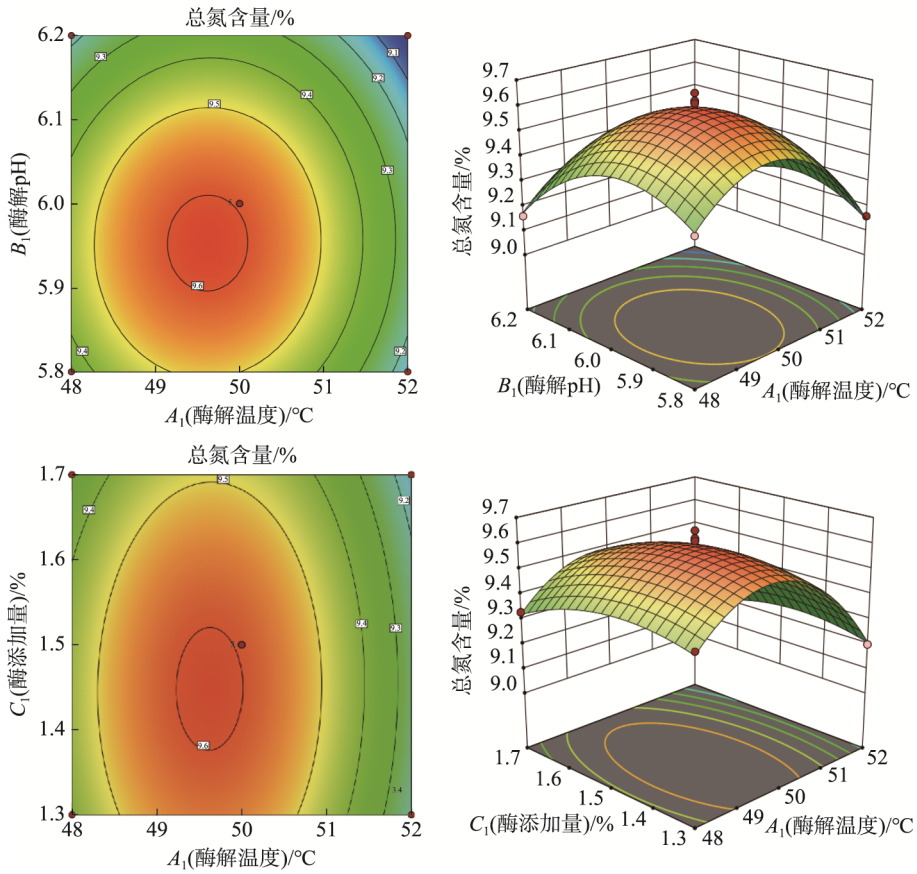


图 7 木瓜蛋白酶不同因素交互作用对总氮含量的影响

Fig.7 Effects of interaction of different factors of papain on total nitrogen content

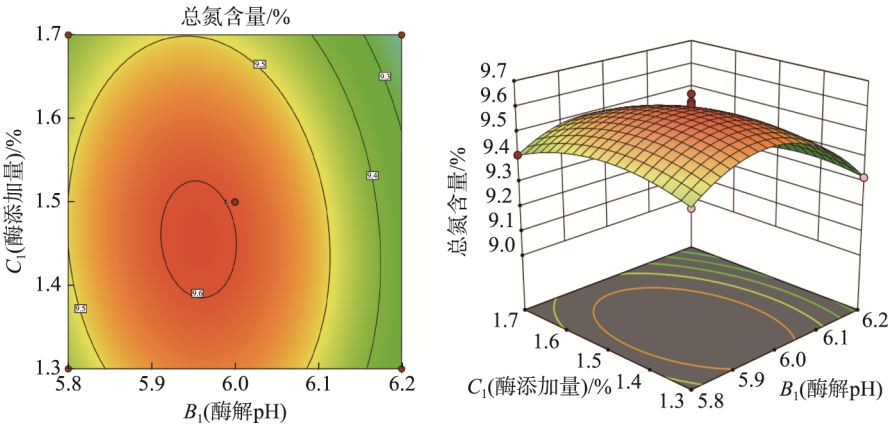


图 7(续)　木瓜蛋白酶不同因素交互作用对总氮含量的影响

Fig.7　Effects of interaction of different factors of papain on total nitrogen content

2.6　风味蛋白酶响应面试验分析

利用响应面试验优化风味蛋白酶的提取条件。表 7 显示了根据响应面设计在酶解温度(℃)、酶解 pH、酶添加量(%)的条件下产物中氨基氮含量(%)和总氮含量(%)。

表 7　风味蛋白酶 3 水平析因设计结果

Table 7　Results of factorial design for the 3 levels of flavor protease

试验序号	A_2(酶解温度)/℃	B_2(酶解 pH)	C_2(酶添加量)/%	氨基氮含量/%	总氮含量/%
1	54	7.0	0.7	3.88	9.71
2	54	7.2	0.9	3.65	9.50
3	54	6.8	0.5	3.78	9.61
4	56	7.0	0.5	3.58	9.36
5	54	7.0	0.7	3.89	9.74
6	52	6.8	0.7	3.76	9.46
7	54	7.0	0.7	3.93	9.77
8	54	7.0	0.7	3.91	9.77
9	52	7.2	0.7	3.53	9.39
10	56	7.0	0.9	3.52	9.28
11	52	7.0	0.9	3.68	9.52
12	54	7.0	0.7	3.92	9.78
13	56	6.8	0.7	3.42	9.24
14	56	7.2	0.7	3.52	9.23
15	54	6.8	0.9	3.70	9.50
16	52	7.0	0.5	3.75	9.55
17	54	7.2	0.5	3.71	9.53

根据表 8 的方差分析结果，氨基氮含量回归模型具有极显著性(F=178.08，P 为 2.00e^{-7}<0.0001)。失拟项不显著(P>0.05)，表明模型拟合良好，误差较小。模型决定系数 R^2=0.9957，调整后 R^2_{adj}=0.9901，说明模型拟合优度高，预测结果可靠。因素 A_2、B_2、C_2，交互项 A_2B_2 以及二次项 A_2^2、B_2^2、C_2^2 对氨基氮含量均具有显著性影响。A_2、B_2、C_2 的 F 分别为 225.4、30.47、35.54，3 个因素对氨基氮含量的影响大小为: A_2>C_2>B_2。二次多项回归方程为: 氨基氮含量/%=3.91–0.09A_2–0.03B_2–0.03C_2+0.08A_2B_2+0.01A_2C_2+0.01B_2C_2–0.21A_2^2–0.14B_2^2–0.06C_2^2。该模型变量间关系可靠，可用于氨基氮含量的预测与工艺优化。

表 8　风味蛋白酶氨基氮含量方差分析结果

Table 8　Results of variance analysis of amino nitrogen content of flavor protease

方差来源	方差	自由度	均方	F	P
模型	0.4110	9	0.0457	178.08	<0.0001
A_2	0.0578	1	0.0578	225.40	**
B_2	0.0078	1	0.0078	30.47	**
C_2	0.0091	1	0.0091	35.54	**
A_2B_2	0.0272	1	0.0272	106.17	**
A_2C_2	0.0000	1	0.0000	0.10	0.7640
B_2C_2	0.0001	1	0.0001	0.39	0.5521
A_2^2	0.1910	1	0.1910	744.95	**
B_2^2	0.0773	1	0.0773	301.47	**
C_2^2	0.0154	1	0.0154	60.10	**
残差	0.0018	7	0.0003		
失拟项	0.0001	3	0.0000	0.06	0.9792
纯误差	0.0017	4	0.0004		
总离差	0.4128	16			
R^2	0.9957	R^2_{adj}	0.9901		

响应面三维曲面图 8 能够体现出酶添加量、酶 pH、酶解温度 3 个单因素之间的交互作用对氨基氮含量的影响。结果显示，酶解温度和酶解 pH 对氨基氮含量的交互作用最显著，且在等高线曲线图中较为陡峭，其次是酶解 pH 和酶添加量对氨基氮含量的交互作用。经响应面优化得出最佳工艺条件为: 酶解温度 53.52 ℃，酶解 pH 6.96，酶添加量 0.64%，测得氨基氮含量为 3.95%±0.05%。

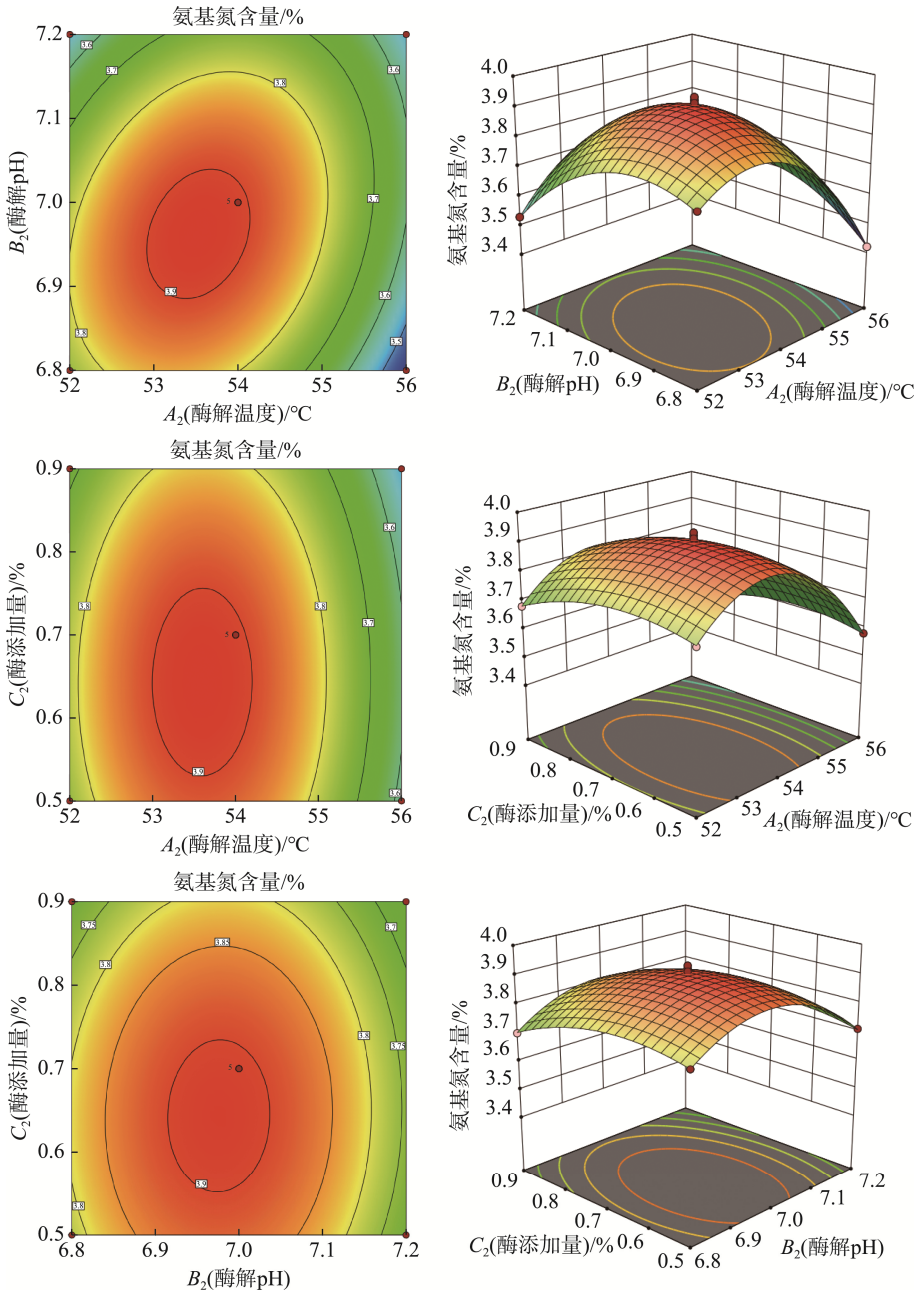


图 8 风味蛋白酶不同因素交互作用对氨基氮含量的影响

Fig.8 Effects of interaction of different factors of flavor protease on amino nitrogen content

根据表 9 的方差分析结果，总氮含量回归模型极显著(F=113.99，P 为 9.37e^{-7}<0.0001)，失拟项不显著(P>0.05)，表明模型拟合良好，误差较小。模型决定系数 R^2 为 0.9932，调整后 R^2_{adj} 为 0.9845，说明模型预测可靠性高。因素 A_2、B_2、C_2 及其二次项对总氮含量均有显著影响，A_2、B_2、C_2 的 F 分别为 153.29、5.98、14.60，各因素影响主次顺序为 A_2>C_2>B_2。所得二次回归方程为：总氮含量/%=9.75–0.10A_2–0.02B_2–0.03C_2+0.02A_2B_2–0.01A_2C_2+0.02B_2C_2–0.27A_2^2–0.16B_2^2–0.06C_2^2。该模型可靠，可用于分析酶添加量、酶解 pH 及酶解温度对总氮含量的影响。

从图 9 可知，酶解温度、酶解 pH、酶添加量 3 组相互交互过程中，酶解 pH 与酶添加量等高线图相对其他两组交互作用呈现更明显的椭圆，表明了对响应值的影响更显著。经响应面优化得出最佳工艺条件为：酶解温度 53.59 ℃，酶解 pH 6.97，酶添加量 0.65%，测得总氮含量为 9.79%±0.04%。

2.7 复合蛋白酶响应面试验分析

利用响应面试验优化复合蛋白酶的提取条件。表 10 显示了根据响应面设计在酶解温度(℃)、酶解 pH、酶添加

量(%)的条件下产物中氨基氮含量(%)和总氮含量(%)。

根据表 11 的方差分析结果，模型 F 为 65.42，P 为 $6.34e^{-6}$ (<0.0001)，氨基氮含量回归模型极显著，失拟项 P 为 0.7110 (>0.05)失拟项不显著，表明模型拟合良好。模型决定系数 R^2 为 0.9883，调整后 R^2_{adj} 为 0.9731，说明模型具有较高的预测可靠性。A_3、B_3、C_3 的 F 分别为 56.75、53.88、13.47，3 个因素影响的大小顺序为 $A_3>B_3>C_3$。所得二次回归方程为：氨基氮含量/%=4.11–0.05A_3–0.05B_3–0.05C_3+0.03A_3B_3+0.02A_3C_3+0.04B_3C_3–0.15A_3^2–0.10B_3^2–0.13C_3^2。

从图 10 可以看出，酶解温度和酶解 pH 交互作用最显著。最佳工艺条件为：酶解温度 59.64 ℃，酶解 pH 7.45，酶添加量 1.79%，测得氨基氮含量为 4.14%±0.06%。

由表 12 可知，模型 F 为 86.31，P 为 $2.45e^{-6}$<0.0001，表明模型具有极显著性。失拟项 P 为 0.6079>0.05，说明失拟不显著，模型拟合良好，预测准确性高。A_3、B_3、C_3 的 F 分别为 70.18、66.71、12.68 比较，3 个因素影响的大小顺序为 $A_3>B_3>C_3$。二次多项回归方程为：总氮含量/%=9.86–0.05A_3–0.05B_3+0.02C_3+0.02A_3B_3+0.01A_3C_3+0.01B_3C_3–0.16A_3^2–0.10B_3^2–0.05C_3^2。

表 9　风味蛋白酶总氮含量方差分析结果

Table 9　Results of variance analysis of total nitrogen content of flavor protease

方差来源	方差	自由度	均方	F	P
模型	0.5489	9	0.0610	113.99	<0.0001
A_2	0.0820	1	0.0820	153.29	**
B_2	0.0032	1	0.0032	5.98	*
C_2	0.0078	1	0.0078	14.60	**
A_2B_2	0.0009	1	0.0009	1.68	0.2357
A_2C_2	0.0006	1	0.0006	1.17	0.3156
B_2C_2	0.0016	1	0.0016	2.99	0.1274
A_2^2	0.2974	1	0.2974	555.81	**
B_2^2	0.1054	1	0.1054	197.09	**
C_2^2	0.0155	1	0.0155	29.05	**
残差	0.0037	7	0.0005		
失拟项	0.0004	3	0.0001	0.17	0.9109
纯误差	0.0033	4	0.0008		
总离差	0.5526	16			
R^2	0.9932	R^2_{adj}	0.9845		

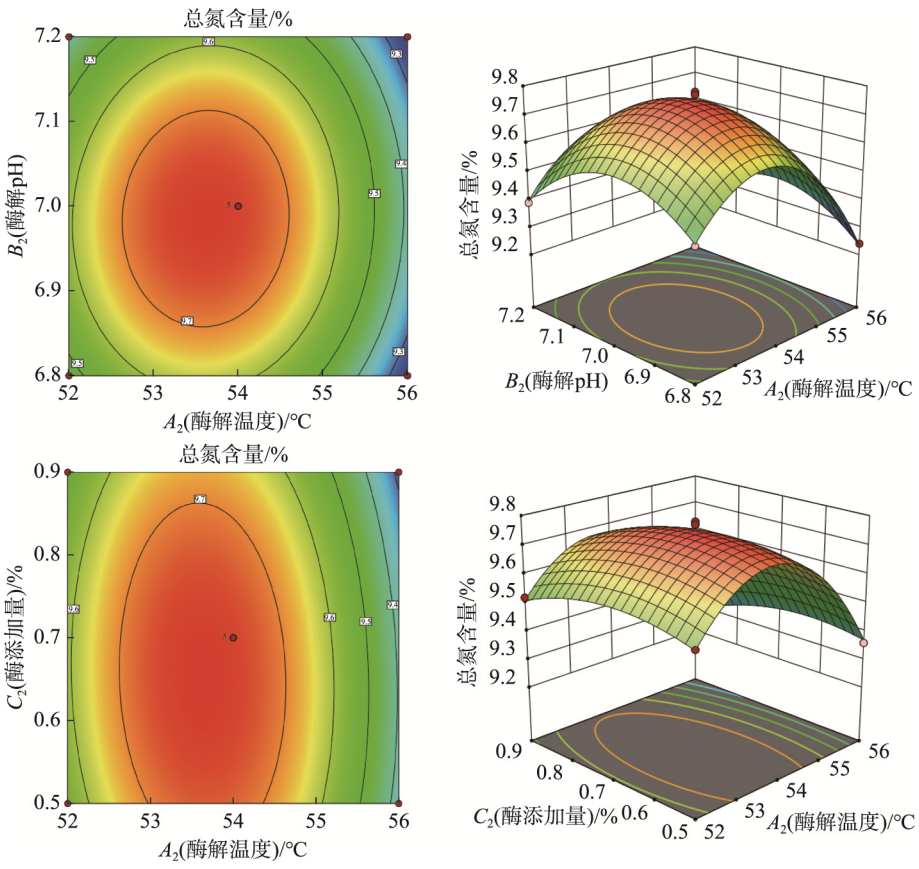


图 9　风味蛋白酶不同因素交互作用对总氮含量的影响

Fig.9　Effects of interaction of different factors of flavor protease on total nitrogen content

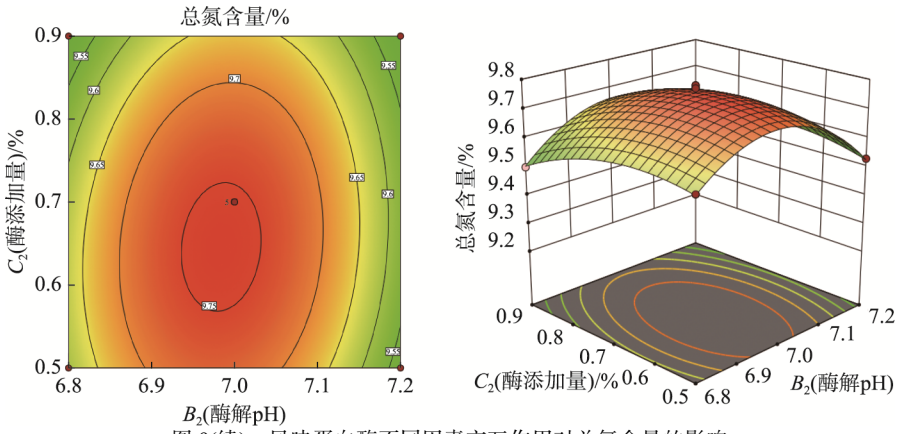


图 9(续) 风味蛋白酶不同因素交互作用对总氮含量的影响

Fig.9 Effects of interaction of different factors of flavor protease on total nitrogen content

表 10 复合蛋白酶 3 水平析因设计结果

Table 10 Results of factorial design for the 3 levels of complex protease

试验序号	A_3(酶解温度)/℃	B_3(酶解 pH)	C_3(酶添加量)/%	氨基氮含量/%	总氮含量/%
1	60	7.5	1.8	4.08	9.84
2	60	7.7	1.9	3.91	9.71
3	60	7.3	1.7	4.07	9.75
4	62	7.5	1.7	3.88	9.58
5	60	7.5	1.8	4.09	9.87
6	58	7.3	1.8	3.97	9.73
7	60	7.5	1.8	4.13	9.85
8	60	7.5	1.8	4.11	9.88
9	58	7.7	1.8	3.83	9.58
10	62	7.5	1.9	3.86	9.63
11	58	7.5	1.9	3.95	9.72
12	60	7.5	1.8	4.12	9.88
13	62	7.3	1.8	3.83	9.59
14	62	7.7	1.8	3.8	9.51
15	60	7.3	1.9	3.98	9.77
16	58	7.5	1.7	4.01	9.68
17	60	7.7	1.7	3.93	9.65

表 11 复合蛋白酶氨基氮含量方差分析结果

Table 11 Results of variance analysis of amino nitrogen content of complex protease

方差来源	方差	自由度	均方	F	P
模型	0.1972	9	0.0219	65.42	<0.0001
A_3	0.0190	1	0.0190	56.75	**
B_3	0.0180	1	0.0180	53.88	**
C_3	0.0045	1	0.0045	13.47	**
A_3B_3	0.0030	1	0.0030	9.03	*
A_3C_3	0.0004	1	0.0004	1.19	0.3107
B_3C_3	0.0012	1	0.0012	3.66	0.0974
A_3^2	0.0922	1	0.0922	275.31	**
B_3^2	0.0425	1	0.0425	126.95	**
C_3^2	0.0046	1	0.0046	13.69	**
残差	0.0023	7	0.0003		
失拟项	0.0006	3	0.0002	0.48	0.7110
纯误差	0.0017	4	0.0004		
总离差	0.1996	16			
R^2	0.9883	R^2_{adj}	0.9731		

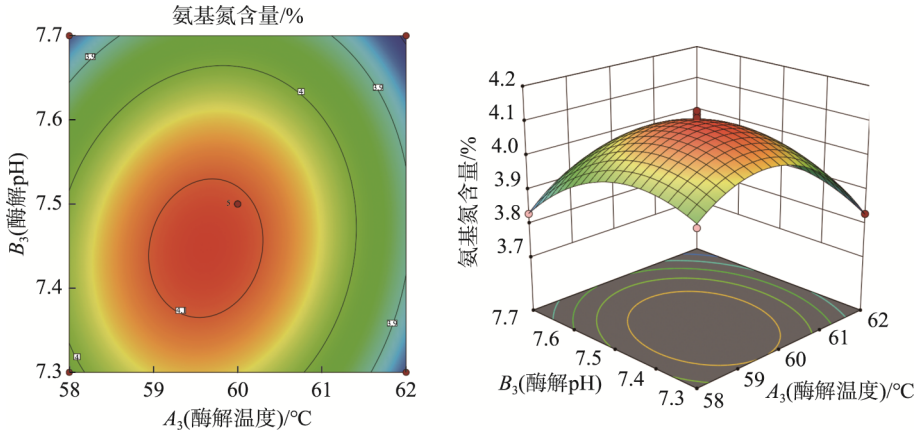


图 10 复合蛋白酶不同因素交互作用对氨基氮含量的影响

Fig.10 Effects of interaction of different factors of complex protease on amino nitrogen content

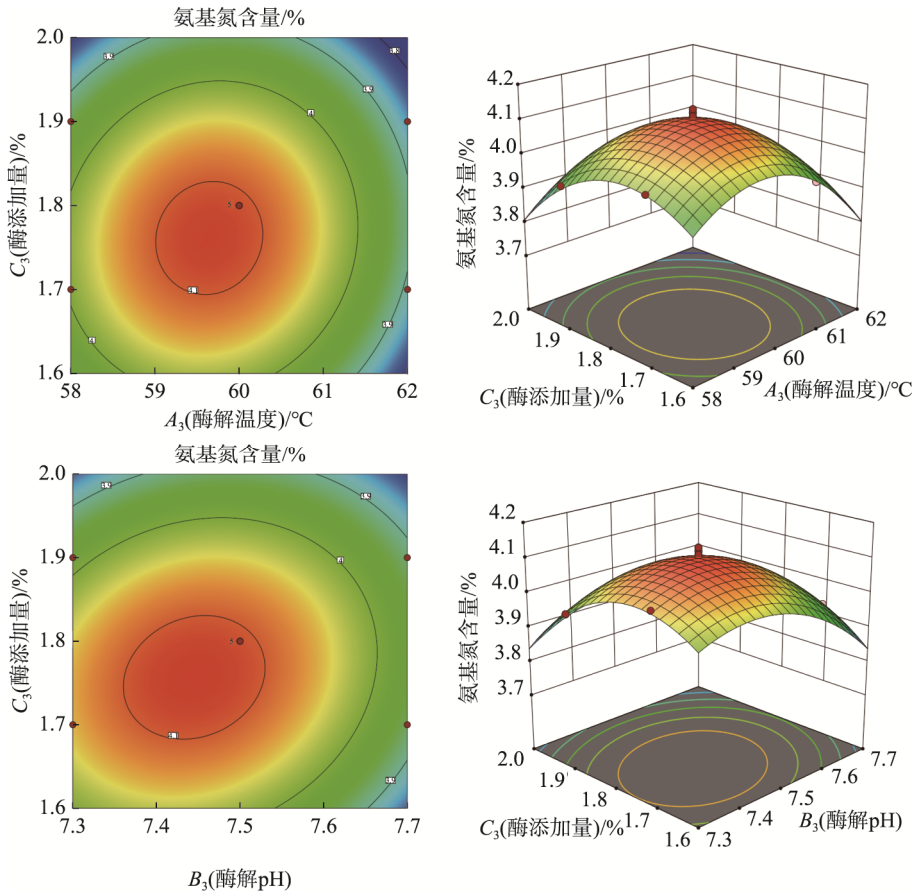


图 10(续)　复合蛋白酶不同因素交互作用对氨基氮含量的影响

Fig.10　Effects of interaction of different factors of complex protease on amino nitrogen content

表 12　复合蛋白酶总氮含量方差分析结果

Table 12　Results of variance analysis of total nitrogen content of complex protease

方差来源	方差	自由度	均方	F	P
模型	0.2214	9	0.0246	86.31	<0.0001
A_3	0.0200	1	0.0200	70.18	**
B_3	0.0190	1	0.0190	66.71	**
C_3	0.0036	1	0.0036	12.68	**
A_3B_3	0.0012	1	0.0012	4.30	0.0769
A_3C_3	0.0000	1	0.0000	0.09	0.7757
B_3C_3	0.0004	1	0.0004	1.40	0.2748
A_3^2	0.1139	1	0.1139	399.78	**
B_3^2	0.0396	1	0.0396	139.01	**
C_3^2	0.0093	1	0.0093	32.64	**
残差	0.0020	7	0.0003		
失拟项	0.0007	3	0.0002	0.68	0.6079
纯误差	0.0013	4	0.0003		
总离差	0.2234	16			
R^2	0.9911	R^2_{adj}	0.9796		

从图 11 可以看出，酶解时间与酶解 pH、酶解 pH 与酶添加量的交互作用的等高线图呈椭圆形，表明酶解时间与酶解 pH、酶解 pH 与酶添加量的交互作用明显；而酶解温度与酶添加量的交互作用的等高线图呈圆形，表明酶解温度与酶添加量的交互作用不明显。经响应面优化得出最佳工艺条件为：酶解温度 59.64 ℃，酶解 pH 7.45，酶添加量 1.79%，测得总氮含量为 9.89%±0.05%。结果表明，响应面法所确定的工艺条件准确可靠，可用于实际优化应用。

为便于实际应用，基于响应面试验结果进行中试验证，对酶解条件进行优化，将其调整为：木瓜蛋白酶条件调整为温度 50 ℃、pH 6.0、酶添加量 1.5%；风味蛋白酶为温度 54 ℃、pH 7.0、酶添加量 0.7%；复合蛋白酶为温度 60 ℃、pH 7.5、酶添加量 1.8%。验证结果显示，调整后 3 种酶的氨基氮与总氮含量分别为：木瓜蛋白酶组 3.83%±0.04% 和 9.65%±0.04%；风味蛋白酶组 3.93%±0.06%和 9.78%±0.05%；复合蛋白酶组 4.12%±0.06% 和 9.87%±0.04%，与模型预测值接近，说明所得模型准确合适，该模型的拟合度较好，具有参考价值。

本研究中复合蛋白酶表现最优，显著高于单一木瓜蛋白酶和风味蛋白酶，这与复合蛋白酶的多酶系协同催化特性密切相关。复合蛋白酶整合内切酶与外切酶活性，可通过不同酶切位点实现蛋白质多靶点水解，相比单一酶对底物降解更

彻底[36]。罗龙娟等[37]研究发现，采用酵母抽提酶与风味蛋白酶复配可使氨基氮含量提升，显著优于单一酶解效果。

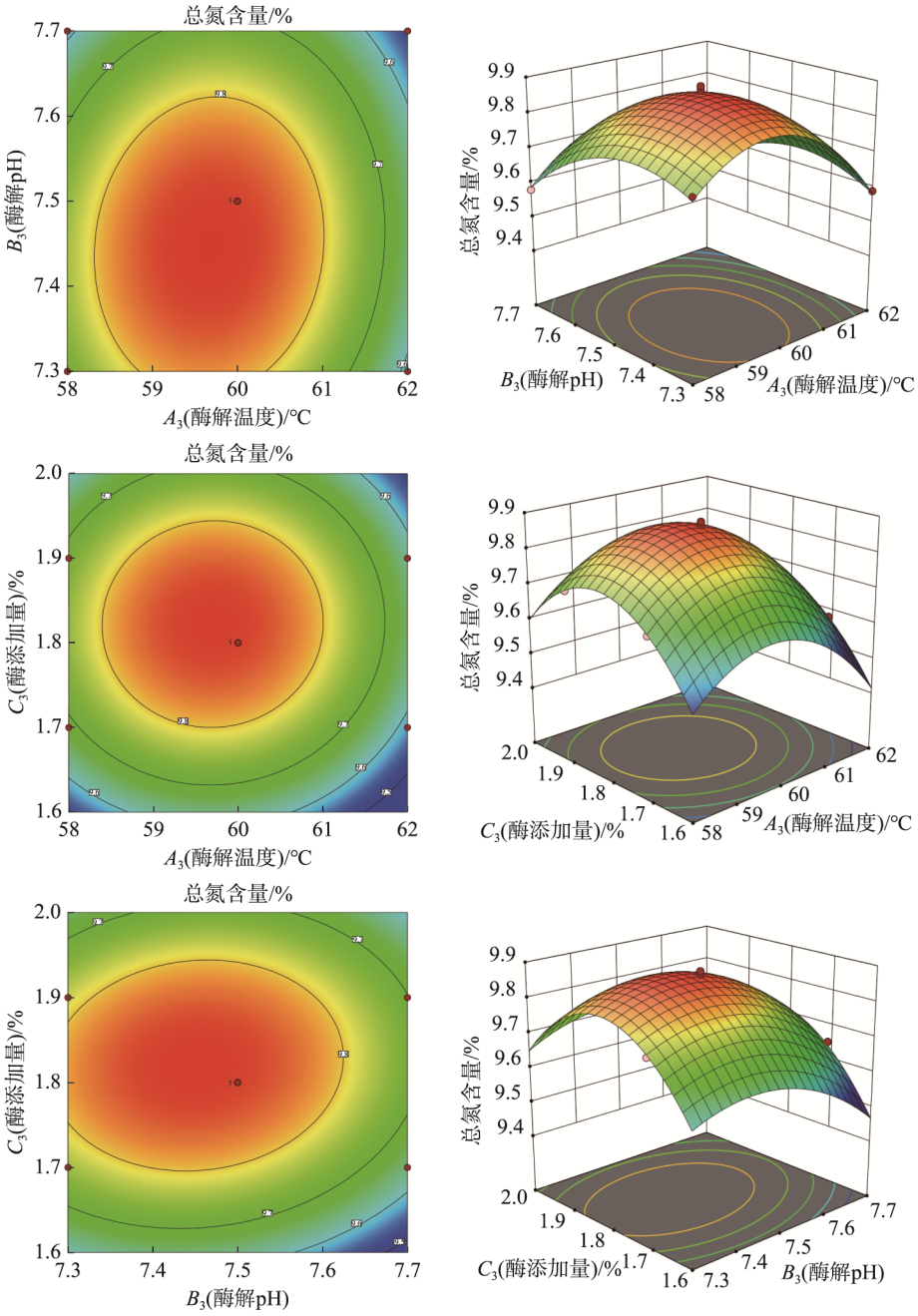


图 11 复合蛋白酶不同因素交互作用对总氮含量的影响

Fig.11 Effects of interaction of different factors of complex protease on total nitrogen content

2.8 复合酶复配效果分析

根据响应面优化的最佳条件，复合酶复配结果由表 13 可知，复合酶的最佳复配方案为复配 5，即木瓜蛋白酶、风味蛋白酶与复合蛋白酶的最佳添加时间分别为 2、4、5 h。经试验验证，氨基氮含量达 4.24%±0.03%，总氮含量达 9.97%±0.04%，说明复合酶分步添加策略可显著提升酵母乳的酶解效率。本研究采用 3 酶分步添加策略，通过控制添加时间避免了酶活性相互干扰，实现了协同增效。

2.9 酶促进剂的添加量对酵母乳酶解效果分析

由图 12 可知，随着表面活性剂添加量的增加，酶解液中氨基氮与总氮含量均呈现先快速升高后趋于平稳的趋势，这说明非离子表面活性剂对酶解具有明显的促进作用，这与周妍等[38]的研究结果相一致。在 0.015%~0.030%添加量范围内，随表面活性剂浓度增加，氨基氮与总氮含量呈快速上升趋势；当添加量为 0.030%时达到峰值，此时氨基氮含量为 4.57%±0.05%，总氮含量

为 10.22%±0.04%。然而, 当添加量进一步提高至 0.035%时, 两项指标均未继续提升, 酶解效果趋于平缓[37–39]。综合考虑酶解效率与生产成本, 确定表面活性剂最佳添加量为 0.030%。

表 13　复合酶复配分析结果

Table 13　Results of complex enzyme compound analysis

复合酶复配	木瓜蛋白酶的最佳添加时间/h	风味蛋白酶的最佳添加时间/h	复合蛋白酶的最佳添加时间/h	氨基氮含量/%	总氮含量/%
复配 1	1	3	4	4.16±0.04	9.90±0.04
复配 2	1	4	5	4.17±0.03	9.91±0.03
复配 3	1	5	6	4.15±0.02	9.89±0.02
复配 4	2	3	4	4.22±0.03	9.95±0.02
复配 5	2	4	5	4.24±0.03	9.97±0.04
复配 6	2	5	6	4.21±0.04	9.94±0.03
复配 7	3	3	4	4.19±0.02	9.92±0.03
复配 8	3	4	5	4.20±0.03	9.93±0.02
复配 9	3	5	6	4.18±0.02	9.91±0.03

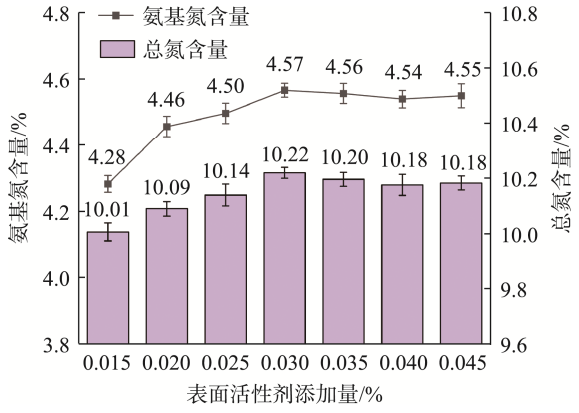


图 12　表面活性剂添加量对酵母乳的水解效果的影响

Fig.12　Effects of surfactant addition amount on hydrolysis effect of yeast milk

3　讨论与结论

酵母乳作为发酵工业副产物, 富含蛋白质与生物活性成分, 其高值化利用是资源循环的重要方向, 在食品调味、饲料添加剂、化妆品活性成分及生物制品等多个领域具备广阔应用潜力[40]。本研究针对酵母乳高值化利用中酶解效率低、复合酶协同机制不明确等问题, 以酵母乳为原料, 通过单因素试验、响应面优化、复合酶复配及酶促进剂添加实验, 以氨基氮与总氮含量为实验核心指标, 系统优化酵母乳的酶解工艺。研究结果表明, 通过单因素试验, 分别确定了木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶的最佳酶解参数; 进一步采用响应面法对 3 种酶的最优工艺进行优化, 得到相应的氨基氮与总氮验证值, 实测值与模型预测值高度吻合, 证实了模型的可靠性。在复合酶复配实验中, 确定了木瓜蛋白酶、风味蛋白酶和复合蛋白酶最佳添加时间分别为 2、4、5 h。酶促进剂的添加实验结果表明, 表面活性剂对酶解具有明显的促进作用, 这与周妍等[38]的研究结果相似; 在添加量为 0.030%时达到峰值, 此时氨基氮含量为 4.57%±0.05%, 总氮含量为 10.22%±0.04%。与传统酶解工艺相比[41], 本研究采用的复合酶协同水解策略与响应面优化方法, 在缩短反应周期、减少酶制剂用量方面展现出明显优势, 为工艺规模化应用奠定了基础。

本研究为发酵工业副产物酵母乳的高值化利用提供了高效、可行的技术方案, 其工艺优化思路与功能化利用模式可为同类发酵副产物资源化开发提供参考范式。通过产学研协同转化, 该技术有望推动发酵行业副产物循环利用水平提升, 助力生物制造与绿色食品产业高质量发展, 推动酵母乳酶解产物的产业化应用进程。

参考文献

[1] 徐智鹏, 陈毛清, 曹诗国, 等. 高蛋白酵母水解物生产菌株的筛选研究[J]. 中国饲料, 2020(3): 115–118.
Xu Zhipeng, Chen Maoqing, Cao Shiguo, et al. Screening and researching of the high-protein yeast production strain for yeast hydrolysate [J]. China Feed, 2020(3): 115–118.

[2] Oliveira A S, Ferreira C, Pereira J O, et al. Spent brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a potential source of bioactive peptides: an overview [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 208: 1116–1126.

[3] Zhu Lisha, Wang Jianfeng, Feng Yincheng, et al. Process optimization, amino acid composition, and antioxidant activities of protein and polypeptide extracted from waste beer yeast [J]. Molecules, 2022, 27(20): 6825.

[4] Bilal R M, Hassan F U, Saeed M, et al. Role of yeast and yeast-derived products as feed additives in broiler nutrition [J]. Animal Biotechnology, 2023, 34(2): 392–401.

[5] Timira V, Chen Xing, Zhou Peng, et al. Potential use of yeast protein in

terms of biorefinery, functionality, and sustainability in food industry [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23(3): e13326.

[6] Lee Y R, Cha Y J, Jeong S, et al. A novel sophorolipids extraction method by yeast fermentation process for enhanced skin efficacy [J]. Skin Research and Technology, 2023, 29(11): e13518.

[7] Zarei O, Dastmalchi S, Hamzeh-Mivehroud M. A simple and rapid protocol for producing yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* suitable for preparing bacterial culture media [J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2016, 15(4): 907–913.

[8] Tao Zekun, Yuan Haibo, Liu Meng, et al. Yeast extract: characteristics, production, applications and future perspectives [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023, 33(2): 151–166.

[9] Takalloo Z, Nikkhah M, Nemati R, et al. Autolysis, plasmolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): a comparative study [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 36(5): 68.

[10] Gao Feng, Li Qingfei, Wei Wei, et al. Preparation of yeast extract from brewer's yeast waste and its potential application as a medium constituent [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2024, 196(10): 6608–6623.

[11] Cui Chun, Qian Yangpeng, Sun Weizheng, et al. Effects of high solid concentrations on the efficacy of enzymatic hydrolysis of yeast cells and the taste characteristics of the resulting hydrolysates [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(5): 1298–1304.

[12] 李青飞. 酵母抽提物的制备及其在微生物培养基中的应用[D]. 淮安: 淮阴工学院, 2023: 23–38.
Li Qingfei. Preparation of yeast extract and its application in microbial culture media [D]. Huaian: Huaiyin Institute of Technology, 2023: 23–38.

[13] 谷丞, 霍丹, 韩潇, 等. 表面活性剂改善高固体系木质纤维素酶水解的研究[J]. 中国造纸, 2020, 39(12): 41–45.
Gu Cheng, Huo Dan, Han Xiao, et al. Study on the improvement of enzymatic hydrolysis of lignocellulose by surfactant under high solid system [J]. China Pulp & Paper, 2020, 39(12): 41–45.

[14] Da Costa Nogueira C, De Araújo Padilha C E, De Souza Filho P F, et al. Effects of the addition of poly(ethylene glycol) and non-ionic surfactants on pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanol fermentation [J]. BioEnergy Research, 2022, 15(2): 889–904.

[15] 徐慧, 刘建军, 赵祥颖. 啤酒废酵母的资源化利用[J]. 中国酿造, 2008, 27(12): 4–7.
Xu Hui, Liu Jianjun, Zhao Xiangying. Comprehensive utilization of beer yeast [J]. China Brewing, 2008, 27(12): 4–7.

[16] 石拓, 刘晓倩, 徐庆阳. 酵母抽提物生产工艺的研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2019, 48(1): 5–8.
Shi Tuo, Liu Xiaoqian, Xu Qingyang. Research progress of yeast extract production process [J]. Fajiao Keji Tongxun, 2019, 48(1): 5–8.

[17] 尚海燕, 崔文甲, 王文亮, 等. 基于响应面法优化羊肚菌蛋白复配酶解工艺及其产物特性研究[J]. 中国调味品, 2025, 50(12): 22–30.
Shang Haiyan, Cui Wenjia, Wang Wenliang, et al. Optimization of *Morchella esculenta* protein compound enzymatic hydrolysis process based on response surface methodology and study on product characteristics [J]. China Condiment, 2025, 50(12): 22–30.

[18] 姜雯雯, 陈晓燕, 曾威, 等. 响应面优化虾壳抗菌肽酶解工艺[J]. 现代食品, 2023(4): 81–84.
Jiang Wenwen, Chen Xiaoyan, Zeng Wei, et al. Optimization of antimicrobial peptidase hydrolysis technology of shrimp shell by response surface methodology [J]. Modern Food, 2023(4): 81–84.

[19] 廖鲜艳, 李崎, 李永仙, 等. 外加蛋白酶对提高酵母水解物氨基酸含量的影响[J]. 酿酒, 2002, 29(5): 61–62.
Liao Xianyan, Li Qi, Li Yongxian, et al. Effect of adding proteinase on increasing content of amino acid in protein hydrolysate of yeast [J]. Liquor-making, 2002, 29(5): 61–62.

[20] Zhang Xinyu, Ma Xiaojie, Cao Shinuo, et al. Effect of protease species on structure, interfacial behavior, and foaming properties of limited enzyme hydrolysis products of soybean protein isolate and mung bean protein [J]. Food Chemistry, 2025, 493: 145926.

[21] 易海丽, 郭训卿, 秦敏, 等. 具有潜在美白和抗光老化功能的燕窝活性肽酶解工艺优化[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2025, 42(3): 213–221.
Yi Haili, Guo Xunqing, Qin Min, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process of active peptides from bird's nest with potential whitening and anti-photoaging properties [J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Ziran Kexueban), 2025, 42(3): 213–221.

[22] 赵心雨, 岳新霞, 余远波, 等. 对碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶真丝坯绸精炼的研究[J]. 轻纺工业与技术, 2022, 51(5): 1–4.
Zhao Xinyu, Yue Xinxia, Yu Yuanbo, et al. Study on refining of silk blank with alkaline protease and papain [J]. Light and Textile Industry and Technology, 2022, 51(5): 1–4.

[23] 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 Yuanlin, Tian Xiaojing, Huang Huihui, et al. Optimization of hydrolysis process of yak blood protein by 2 kinds of proteases [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(6): 2377–2384.

[24] 王钰慧, 甄守艳, 霍乃蕊, 等. 复合蛋白酶和风味蛋白酶双酶水解羊骨粉的研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2016, 36(1): 57–60.
Wang Yuhui, Zhen Shouyan, Huo Nairui, et al. Hydrolyzing of sheep bone powder using protamex and falvorzyme [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2016, 36(1): 57–60.

[25] Wu Changzheng, Jia Tianchang, Hou Sha, et al. An oyster hydrolysis natural protease: enzymatic properties, hydrolysates and flavor metabolomic profiling [J]. Food Bioscience, 2026, 78: 108434.

[26] 侯超, 吕庆. 木瓜蛋白酶-重量法测定风味发酵乳中脂肪含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(13): 276–281.
Hou Chao, Lv Qing. Determination of fat content in flavored fermented milk by papain-gravimetric method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(13): 276–281.

[27] 陈杰, 徐婧婷, 郭顺堂. 豆粕热处理对酱曲中蛋白酶活性和酱油中氨基态氮含量的影响[J]. 大豆科学, 2009, 28(5): 889–893.
Chen Jie, Xu Jingting, Guo Shuntang. Effect of thermal treatment of defatted soy flakes on the neutral protease activity in koji and contents of amino nitrogen in fermented soy sauce [J]. Soybean Science, 2009, 28(5): 889–893.

[28] 杨艳君, 冯玉杰, 马建华, 等. 黄豆制备呈味肽的酶解工艺优化[J]. 中国调味品, 2025, 50(12): 172–178.
Yang Yanjun, Feng Yujie, Ma Jianhua, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process for preparing flavor peptides from soybeans [J]. China Condiment, 2025, 50(12): 172–178.

[29] 陈静, 唐浩国, 王嘉康, 等. 酶解法制备菌菇酱工艺优化[J]. 食品与机械, 2024, 40(4): 203–209.
Chen Jing, Tang Haoguo, Wang Jiakang, et al. Study on optimization of enzymatic hydrolysis technology for mushroom sauce [J]. Food & Machinery, 2024, 40(4): 203–209.

[30] 丁琳, 余运波, 闫景坤. 复合蛋白酶水解河蚬肉的工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(23): 9226–9232.
Ding Lin, Yu Yunbo, Yan Jingkun. Study on hydrolysis technology of *Corbicula fluminea* with complex proteases [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(23): 9226–9232.

[31] 邢可心. 珍珠粉酶解液的制备与性能研究[D]. 鞍山: 辽宁科技大学, 2022: 32–36.
Xing Kexin. Preparation and properties of enzymatic hydrolysate of pearl powder [D]. Anshan: University of Science and Technology Liaoning, 2022: 32–36.

[32] 胡连霞, 付修文, 孙睿佳, 等. 纤维素酶协同酿酒酵母发酵明日叶酒的工艺条件优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(24): 346–356.
Hu Lianxia, Fu Xiuwen, Sun Ruijia, et al. Optimization of fermentation conditions for *Angelica keiskei* wine under the synergistic effect of cellulase and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(24): 346–356.

[33] 沙金, 庞敏霞, 姚国祥, 等. 铁皮石斛茎多糖复合酶法提取工艺优化及特性研究[J]. 中国食品学报, 2025, 25(11): 238–249.
Sha Jin, Pang Minxia, Yao Guoxiang, et al. Optimization of composite enzymatic extraction process for *Dendrobium officinale* stem polysaccharides and their characteristic [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2025, 25(11): 238–249.

[34] 汪咪娜, 王迪, 张静, 等. 响应面法优化生物酶法提取滇红茶多糖工艺技术研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(5): 168–175.
Wang Mina, Wang Di, Zhang Jing, et al. Optimization of enzyme extraction of tea polysaccharides from Yunnan black tea by response surface methodology [J]. China Food Additives, 2023, 34(5): 168–175.

[35] Li Bing, Kong Qing, Gao Yang, et al. Comparison of taurine extraction from *Mytilus coruscus* and *Crassostrea gigas* using ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis [J]. Journal of Food Science, 2026, 91: e70859.

[36] 陈亮亮, 蔡芷荷, 卢勉飞, 等. 酵母抽提物生产工艺的研究进展[J]. 广东农业科学, 2013, 40(3): 85–88.
Chen Liangliang, Cai Zhihe, Lu Mianfei, et al. Research progress on technology of yeast extract [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(3): 85–88.

[37] 罗龙娟, 梁燕玲, 赵晓生, 等. 3 种酵母酶解效果的对比研究[J]. 食品科技, 2014, 39(9): 18–20.
Luo Longjuan, Liang Yanling, Zhao Xiaosheng, et al. The contrast of the hydrolysis effects of three kinds of yeasts [J]. Food Science and Technology, 2014, 39(9): 18–20.

[38] 周妍, 赵雪冰, 刘德华. 非离子型表面活性剂对木质纤维素酶催化水解的影响及机理[J]. 化学进展, 2015, 27(11): 1555–1565.
Zhou Yan, Zhao Xuebing, Liu Dehua. Effects of non-ionic surfactant on the enzymatic hydrolysis of lignocellulose and corresponding mechanism [J]. Progress in Chemistry, 2015, 27(11): 1555–1565.

[39] 周丽东, 周敬红, 齐缘凤. 表面活性剂对木薯秆酶水解的影响[J]. 生物质化学工程, 2010, 44(4): 25–28.
Zhou Lidong, Zhou Jinghong, Qi Yuanfeng. Study on surfactants effect on enzymatic hydrolysis of cassava pole [J]. Biomass Chemical Engineering, 2010, 44(4): 25–28.

[40] Fu Yu. Yeast extract as a more sustainable food ingredient: insights into flavor and bioactivity [M]. Amsterdam: Elsevier, 2025: 97–147.

[41] Megrous S, Zhao Xiao, Al-Dalali S, et al. Response surface methodology and optimization of hydrolysis conditions for the *in vitro* calcium-chelating and hypoglycemic activities of casein protein hydrolysates prepared using microbial proteases [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2024, 18(4): 3069–3084.

(责任编辑: 安香玉　曹岱琳)