丁玲玲, 凡立澜, 张鑫琦, 等. 波茨坦短芽孢杆菌 S8 蛋白酶的酶学性质及其在牦牛肉嫩化中的应用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(6): 141−149. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020192
DING Lingling, FAN Lilan, ZHANG Xinqi, et al. Enzymatic Properties of Protease Produced by *Brevibacillus borstelensis* S8 and Its Application in Yak Meat Tenderization[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(6): 141−149. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020192

· 生物工程 ·

波茨坦短芽孢杆菌 S8 蛋白酶的酶学性质及其在牦牛肉嫩化中的应用

丁玲玲[1], 凡立澜[1], 张鑫琦[1], 梁安健[1], 冶海潇[1], 朱成林[1], 邹立扣[2], 唐俊妮[1,*]
(1.西南民族大学药学与食品学院, 四川成都 610225;
2.四川农业大学资源学院, 四川成都 611830)

摘　要: 本研究以波茨坦短芽孢杆菌 S8 所产蛋白酶为对象，探究其酶学性质，并构建超声波辅助酶的牦牛肉嫩化工艺体系。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）验证酶纯化效果、单因素实验探究酶学性质、响应面优化牦牛肉嫩化工艺，并通过剪切力、保水性、肌原纤维小片化指数以及质构特性等指标表征其嫩化效果。结果表明，纯化后的蛋白酶经 SDS-PAGE 电泳呈现单一条带，分子量约为 47 kDa；酶学性质探究表明在 pH 为 7.0，30~40 ℃，以及 20 mmol/L Mg^{2+}条件下酶活力最佳；通过响应面优化试验得到超声波辅助蛋白酶嫩化牦牛肉最佳工艺参数为：蛋白酶浓度 2.5%、超声温度 34.6 ℃、超声时间 39.6 min，此条件下牦牛肉剪切力降低 63.3%，蒸煮损失降低 33.7%，离心损失降低 52.0%，肌原纤维小片化指数增大 47.3%，肌原纤维蛋白被降解，质构特性得到明显改善。本研究为波茨坦短芽孢杆菌蛋白酶的开发利用提供参考，同时为牦牛肉嫩化工艺提供新的蛋白酶资源和技术支持。

关键词: 波茨坦短芽孢杆菌 S8, 蛋白酶, 酶学性质, 超声波, 嫩化, 牦牛肉, 响应面优化
中图分类号: TS251.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)06−0141−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020192　　本文网刊:

Enzymatic Properties of Protease Produced by *Brevibacillus borstelensis* S8 and Its Application in Yak Meat Tenderization

DING Lingling[1], FAN Lilan[1], ZHANG Xinqi[1], LIANG Anjian[1], YE Haixiao[1], ZHU Chenglin[1], ZOU Likou[2], TANG Junni[1,*]
(1.College of Pharmacy and Food, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China;
2.College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611830, China)

Abstract: This study focused on the enzymatic properties of the protease produced by *Brevibacillus borstelensis* S8, and constructed an ultrasound assisted enzymatic system for yak meat tenderization. SDS-PAGE was used to verify the purification effect of protease. Single factor experiments were used to explore the enzymatic properties. Response surface experiments were used to optimize the yak meat tenderization process. Subsequently, the tenderization effect of yak meat was characterized by shear force, water holding capacity, myofibrillar fragmentation index, and texture characteristics. The results showed that the purified protease exhibited a single band with a molecular weight of approximately 47 kDa by SDS-PAGE electrophoresis. The investigation of enzymatic properties showed that the enzyme activity was optimal under pH7.0, 30~40 ℃, and with 20 mmol/L Mg^{2+} supplementation. The optimal process parameters for ultrasound assisted protease tenderization of yak meat obtained through response surface optimization experiments were as follows: Protease concentration 2.5%, ultrasonic temperature 34.6 ℃, and treatment duration 39.6 min. Under the above conditions, the shear force of yak meat decreased by 63.3%, steaming loss decreased by 33.7%, centrifugation loss decreased by 52.0%,

收稿日期: 2025−02−24
基金项目: 西南民族大学大学生创新创业训练计划项目（S202410656125）。
作者简介: 丁玲玲（2004−）, 女, 本科, 研究方向: 食品微生物学, E-mail: 1411721477@qq.com。
*** 通信作者:** 唐俊妮（1971−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与食品微生物, E-mail: 392783291@qq.com。

myofibrillar fragmentation index increased by 47.3%, myofibrillar protein was degraded, and the texture characteristics were significantly improved. This study provides a reference for the development and utilization of protease from *B. borstelensis* S8, and also provides new protease resources and technical support for yak meat tenderization process.

Key words: *Brevibacillus borstelensis* S8; proteinase; enzymatic properties; ultrasonic; tenderization; yak meat; response surface optimization

自然界中的蛋白酶主要源于植物、动物和微生物,因其具有生物可降解性和常温下高活性的特点,被广泛应用于食品加工行业[1−2]。蛋白酶作为一类高效生物催化剂,一直是肉品嫩化领域的研究热点,通过特异性水解肌原纤维蛋白和结缔组织胶原蛋白,可显著改善肉品质构特性[3]。但酶的高度特异性也给其针对不同肉类嫩化的普适性带来一定影响。目前肉类嫩化研究主要针对禽肉、猪肉和牛肉[4−7],常用于肉品嫩化的蛋白酶主要为植物蛋白酶,如木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等。对于微生物酶的工业应用仍处于发展阶段,其中,微生物源蛋白酶资源开发不足,酶学性质及安全性不明确等因素是限制微生物酶发展的主要原因[8]。但与动植物源相比,微生物酶存在许多优势,微生物产蛋白酶不受季节和气候的限制,可以通过培养快速获得[9],还可通过基因工程手段进一步提高产率,降低工业化大规模生产的成本。研究证明,相较于植物蛋白酶,微生物蛋白酶作用更加温和,可以有效避免肉的过度嫩化[10]。目前,具有产蛋白酶能力的微生物主要有米曲霉菌、黑酵母菌、粘质沙雷氏菌及芽孢杆菌等,又以芽孢杆菌属的微生物为主要来源,本研究中采用的波茨坦短芽孢杆菌具有产多种酶的能力及益生菌特性,是潜在的产酶益生菌之一[11]。

牦牛肉具有纤维较粗、难于咀嚼、口感不佳等特点[12],使用单一的嫩化手段难以达到预期的嫩化效果,存在耗时较长、嫩化效果不佳、产品失重大和色泽劣变等现象[12−14]。相关研究表明,多种嫩化技术联合使用可提高嫩化效果,如 Zhang 等[15] 以乳酸-超声波-木瓜蛋白酶联合处理牦牛肉,使牦牛肉剪切力显著降低。但很少有研究报导微生物蛋白酶联合处理对改善牦牛肉嫩度的效果。

本研究选取波茨坦短芽孢杆菌所产蛋白酶,分离纯化后探究其酶学性质,提高酶活力,并利用响应面法优化超声波辅助酶嫩化工艺,使牦牛肉嫩化效率与品质控制达到平衡。一方面挖掘微生物蛋白酶新资源,丰富了微生物酶的菌种来源;另一方面建立蛋白酶浓度-超声温度-超声时间的响应面模型,推进了牦牛肉肉质嫩化的基础研究,为高海拔地区特色肉制品开发提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Brevibacillus borstelensis S8　四川农业大学邹立扣教授赠予;牦牛肉　购于四川省成都市某清真牛羊肉批发零售店;甘氨酸、福林试剂、KCl、KH_2PO_4、$ZnSO_4·7H_2O$、琼脂、酪蛋白、牛血清白蛋白、硫酸铵、三氯乙酸、无水乙醇、L-酪氨酸　购于上海源叶生物科技有限公司;以上所用试剂均为分析纯;胰蛋白胨大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB)　购于青岛海博生物公司;5×蛋白上样缓冲液(含双对氯苯基三氯乙烷(Dichlorodiphenyltrichloroethane, DDT))、BCA(Bicinchoninic Acid Assay, 二喹啉甲酸)试剂盒、葡聚糖凝胶 Sephadex G-75　购于北京索莱宝科技有限公司;蛋白质 Marker(11~245 kDa)　购于北京天根生化科技有限公司;变性丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)快速制备试剂盒　购于上海生物工程股份有限公司。

SB-5200DT 超声波清洗机　宁波新芝生物科技股份有限公司;MATTHAUS pH-STAR 便携式 pH 测定仪　成都世纪方舟科技有限公司;TGL-1650 高速冷冻离心机　四川蜀科仪器有限公司;UV-1900 型紫外可见分光光度计　翱艺仪器(上海)有限公司;ENS-TDV 质构仪　北京怡诺威腾科技发展有限公司;MLS-3030H 高压蒸汽灭菌锅　上海拜格生物科技发展有限公司;DYY-8C 电泳仪电源　北京六一生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株活化与发酵　将 S8 菌种先在 TSA 培养基中进行划线纯化,选取单菌落接种于 5 mL TSB 培养基中,37 ℃、180 r/min 振荡培养 24 h,按上述条件将在 TSB 中传代 2 次得到活化后的 S8,按照 10%的(V/V)的接种量接种于 500 mL 的灭菌 TSB 培养基中,37 ℃、180 r/min 振荡培养 24 h,得到 S8 发酵液备用。

1.2.2 蛋白酶的分离纯化及纯度测定　参考张智等[16] 的方法,取 S8 发酵液经 8000×g 离心 10 min,收集上清液调硫酸铵饱和度至 70%,4 ℃ 静置 12 h。随后以 9000×g 离心 10 min 收集沉淀,采用磷酸盐缓冲液 PBS(pH7.0)复溶,置于透析袋于 4 ℃ 条件下透析 12 h。取 5 mL 透析液上样于预先经 PBS(pH7.0)平衡的 Sephadex G-75 凝胶过滤层析柱,控制流速 0.5 mL/min。收集洗脱液进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),其中分离胶浓度 12%,浓缩胶浓度 5%,分别施加 80 V 和 120 V 电压,电泳结束后,依次进行凝胶染色及脱色处理。

1.2.3 蛋白酶活力测定　参照 GB/T 23527.1-2023

《酶制剂质量要求》中紫外分光光度法测定蛋白酶活力。

1.2.4　蛋白酶酶学性质　蛋白酶的酶学性质参照文献 [17] 所述方法进行测定。

1.2.4.1　pH 对酶活力的影响及其 pH 稳定性　测定不同 pH(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)条件下蛋白酶的酶活力。将酶液于 40 ℃ 下保温 3.0 h，每隔 30 min 测定酶活力。以最高酶活为 100%，分析蛋白酶最适反应 pH 及 pH 稳定性。

1.2.4.2　温度和对酶活力的影响及热稳定性　在 pH7 条件下，将酶液分别于 20、30、40、50、60、70 ℃ 中保温 3.0 h，每 30 min 测一次酶活，以最高值为 100%，测定不同温度下的蛋白酶活力，并分析蛋白酶热稳定性。

1.2.4.3　金属离子对酶活力的影响　配制终浓度为 20 mmo/L 的 Zn^{2+}、Mg^{2+}、Na^{+}、Ca^{2+}、Fe^{2+}、Cu^{2+}、Mn^{2+}酶液，于 4 ℃ 保温 24 h 后测定蛋白酶活力，并以不含金属离子的蛋白酶活力为 100%，计算各金属离子条件下蛋白酶的相对酶活力。

1.2.5　牦牛肉准备　牦牛肉背肌去除脂肪、表面筋膜和结缔组织，切分成若干 50×30×30 mm 肉块，吸干水分备用。

1.2.6　不同因素对牦牛肉嫩度的影响

1.2.6.1　蛋白酶浓度对牦牛肉嫩度的影响　分别用质量浓度为 0、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的酶溶液以 5 g/mL 添加量对牦牛肉进行 30 min 嫩化处理。

1.2.6.2　超声温度对牦牛肉嫩度的影响　恒定超声频率(40 kHz)和功率(240 W)，以 2.5% 蛋白酶溶液处理牦牛肉样品，随后分别于 20、25、30、35、40、45 ℃ 条件下进行 30 min 超声处理。

1.2.6.3　超声时间对牦牛肉嫩度的影响　恒定超声频率(40 kHz)和功率(240 W)，以 2.5% 蛋白酶溶液处理牦牛肉样品，同时控制超声温度为 35 ℃，分别对牦牛肉进行 10、20、30、40、50、60 min 的超声处理。

1.2.7　响应面优化试验　以牦牛肉剪切力为响应值，设计三因素三水平 Box-Behnken(BB)响应面试验，建立多元二次回归数学方程拟合自变量与响应值之间的函数关系，预测嫩化牦牛肉的最适工艺参数及牦牛肉的剪切力理论最小值，响应面试验因素水平设计如表 1 所示。

表 1　响应面试验因素水平设计

Table 1　Factor-level designs for response surface experiments

因素	水平		
	−1	0	1
A: 蛋白酶浓度(%)	2	2.5	3
B: 超声温度(℃)	30	35	40
C: 超声时间(min)	30	40	50

1.2.8　剪切力测定　依据 Ji 等[18] 的方法改进。以未经嫩化处理的同部位牦牛肉为对照组，采用 TA-XT Plus 质构仪配备 LPBS-1S 探头，设置测试前速度 2 mm/s，测试速度 2.0 mm/s，测试后速度 10.0 mm/s，压缩距离 30.0 mm，初始触发力 10.0 g，每组样品平行测定 3 次并取平均值。

1.2.9　质构特性测定　参考张诗琦等[19] 的方法，采用 TA-XT Plus 质构仪配备 PP75A 探头，以 TPA 模式中二次挤压的方式进行测定。设定测前速度 2.0 mm/s，测试速度 1.0 mm/s，测后速度为 2.0 mm/s，下压距离 10.0 mm，间隔时间 5.0 s，解析力量感应曲线，并计算硬度、弹性、内聚性、胶粘性及咀嚼性等参数，每组样品平行测定 3 次并取平均值。

1.2.10　保水性测定

1.2.10.1　蒸煮损失率　准确称取一定质量(m_0)的肉样放入蒸煮袋中加热至 70 ℃，拿出肉样冷却至室温，吸干表面水分再次称重(m_1)。根据公式(1)计算样品蒸煮损失率：

$$蒸煮损失率(\%) = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \qquad 式（1）$$

1.2.10.2　离心损失率　参考 Zhang 等[20] 的方法，准确称取一定质量(m_0)的肉样，吸干表面水分并用吸水纸包裹，5000×g 离心 10 min 后再次称重，记为 m_1。离心损失率根据公式(2)计算：

$$离心损失率(\%) = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \qquad 式（2）$$

1.2.11　肌原纤维蛋白(Myofibrillar proteins, MP)的提取与含量测定　称取 3.00 g 肉样，加入 30 mL 浓度为 20 mmol/L 的 PBS Ⅰ缓冲液(含 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH7.0)[21]，机械均质后，4 ℃、6000×g 离心 15 min，弃去上清液，重复洗涤两次，得到沉淀复溶于 30 mL 浓度为 25 mmol/L 的 PBS Ⅱ缓冲液(含 0.6 mol/L NaCl, pH7.0)溶解，经 4 ℃、9000×g 离心 20 min，收集上清，即得 MP 溶液，采用 BCA 试剂盒测定样品浓度，于 48 h 内使用。肌原纤维蛋白降解情况，是将肌原纤维蛋白的浓度调整至 1 μg/μL，采用 SDS-PAGE 进行电泳观察。

1.2.12　肌原纤维小片化指数(Myofibrillar Fragmentation Index, MFI)测定　参考郑娇等[22] 的方法并改进，称取 3.00 g 肉样并加入 20 mL 预冷的 MFI 缓冲液(KCl 3.7 g、KH_2PO_4 0.60 g、K_2HPO_4 1.28 g、EDTA 0.15 g、$MgCl_2$ 0.1 g，定容至 500 mL)，充分研磨均质后于 4 ℃、1000×g 离心 15 min，重复洗涤两次。沉淀经 10 mL MFI 缓冲液重悬后过滤，调整滤液浓度至 0.5 mg/mL，于 540 nm 下测定吸光度，将结果乘以 200 得到肌原纤维小片化指数。

1.3　数据处理

所有实验均进行 3 次重复，所得数据经过 IBM SPSS Statistics 邓肯检验进行多重比较分析，Origin

2022 软件绘图，Design-Expert 13 用于响应面试验的设计及分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶分离纯化结果

将所提取的蛋白酶经葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 层析柱洗脱，收集洗脱液，最终得到纯化倍数为 5.03、得率 17.60%、比酶活 10711 U/mg 的波茨坦短芽孢杆菌蛋白酶（表 2）。将纯化后的蛋白酶上样于 SDS-PAGE 凝胶体系，如图 1 中泳道 2 所示，该蛋白酶在 SDS-PAGE 凝胶体系中仅出现单一条带，表明硫酸铵沉淀-透析-凝胶层析有效去除了杂蛋白，使蛋白酶接近电泳纯度[23]。通过蛋白的相对迁移率与分子量的比例关系计算，初步确定酶的分子量约为 47 kDa。

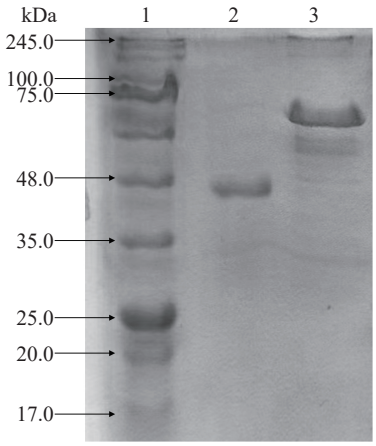


图 1 纯化的 S8 蛋白酶的 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig.1 Gel electrophoresis of SDS-PAGE for purified S8 protease

注：1：蛋白分子量 Marker；2：纯化的蛋白酶；3：牛血清白蛋白。

表 2 S8 蛋白酶的分离纯化结果

Table 2 Separation and purification results for S8 protease

纯化步骤	比酶活(U/mg)	得率(%)	纯化倍数
发酵上清液	2130	100.00	–
70%硫酸铵沉淀	4280	59.77	2.01
脱盐	8060	38.11	3.78
凝胶层析	10711	17.60	5.03

注：“–”表示无数据。

2.2 酶学性质

pH 是影响酶活力的关键因素[24]，强酸或强碱条件极易破坏酶的空间结构并导致失活。如图 2A 所示，在一定 pH 范围内，蛋白酶活力随 pH 的增大而增大，当 pH=7 时酶活力达到峰值，且显著高于其他实验组（P<0.05）；当 pH>7 时，酶活力逐渐下降；由此推测该酶的最适 pH 约为 7，这可能与活性中心关键氨基酸残基的质子化状态直接相关。进一步分析蛋白酶 pH 稳定性，如图 2B，pH7 时酶液稳定性优异，3 h 后相对酶活力仍保持在 80% 以上，显著高于蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）S46 蛋白酶在最适 pH=8

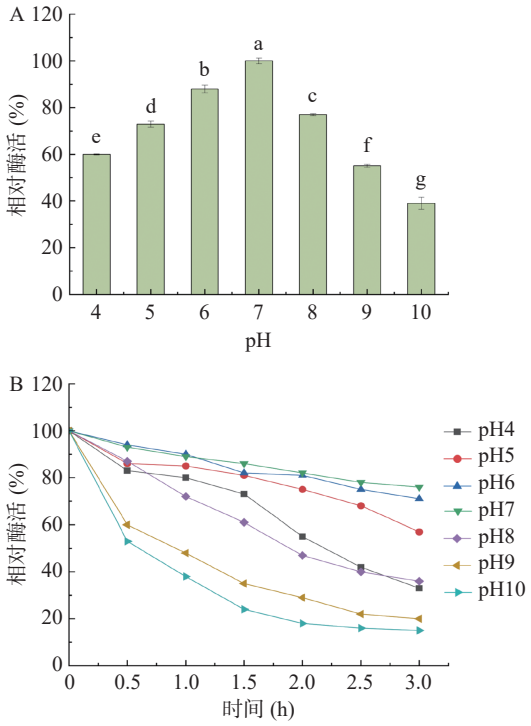


图 2 pH 对蛋白酶活性的影响（A）及不同 pH 条件下酶活随时间的变化（B）

Fig.2 Effect of pH on protease activity (A) and the changes of protease activity over time under different pH conditions (B)

注：不同字母表示存在显著差异（P<0.05），图 4~图 5、图 7、图 9 同。

下保温 3 h 后的残留活性（55.06%）[25]。

在一定温度范围内，温度升高，酶促反应加快，但过高的温度会导致酶分子构象发生改变，使酶变性失活[26]。如图 3 所示，在 pH 为 7.0 的环境下，将蛋白酶在 20~70 ℃ 保温 3 h，结果显示，60~70 ℃ 时酶活下降趋势明显，而在 30~40 ℃ 下保温 1.5 h 相对酶活力维持在 60%~80%，3.0 h 后仍能检测到 40%~60% 的酶活力。这表明波茨坦短芽孢杆菌蛋白酶在 30~40 ℃ 范围内稳定性良好，这与嗜盐性古细菌（*Halococcus salifodinae*）PRR34 有相似的特性[27]。

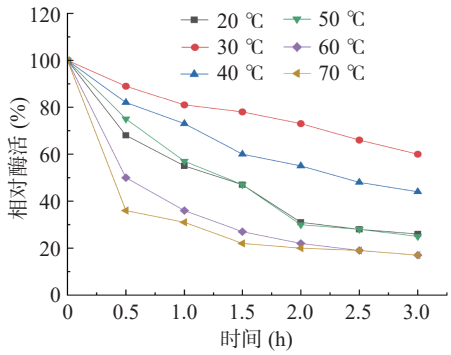


图 3 不同温度条件下酶活随时间的变化

Fig.3 Changes in enzyme activity over time under different temperature conditions

不同金属离子对酶活力的影响存在显著差异。金属离子可以作为酶的辅助因子或激活剂提高酶活力，另一方面又能和酶活性中心的必需基团结合使酶

活力被抑制[28]。由图 4 可以看出，以不加金属离子的酶活力为对照组（酶活设为 100%），Mn^{2+}、Fe^{2+}、Na^{+}、Mg^{2+}对波茨坦短芽孢杆菌蛋白酶活力均有显著增强作用（P<0.05），其中 Mg^{2+}作用最为突出，相对酶活力达到 141%；而 Ca^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}则表现出酶活抑制性，导致酶活力有不同程度下降。不同蛋白酶对金属离子的响应亦存在差异，正如 Majeed 等[29] 的研究中 Ca^{2+}和 Fe^{2+}可增强枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）BSP 蛋白酶活性，金属离子结合位点是造成这一现象的原因之一。

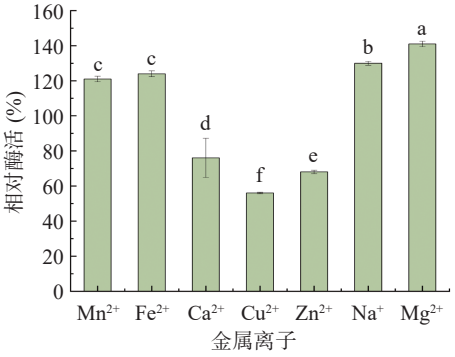


图 4　金属离子对酶活力的影响

Fig.4　Influence of different metal ions on protease activity

2.3　不同因素对牦牛肉剪切力的影响

2.3.1　蛋白酶浓度对牦牛肉剪切力的影响　剪切力作为衡量肉类嫩度的关键指标，反映了切割肌肉纤维所需力的大小，剪切力越低表明肉品嫩度越高[30]。由图 5A 可知，随着蛋白酶浓度增大，牦牛肉剪切力呈递减趋势，在浓度为 2.5% 时剪切力达到最低值 99.743±0.554 N，较空白组降低 32.7%（P<0.05）。蛋白酶可以降解肉类中的大分子蛋白质，从而降低切割时的剪切阻力[31]。当蛋白酶浓度处于较低水平，其在牦牛肉中的渗透效率受限，嫩化效果不佳；随着浓度增加，蛋白酶分子数量与渗透效率同步提升，牦牛肉剪切力随之降低。当蛋白酶浓度升至 3%，牦牛肉剪切力出现回升，推测是过度的水解作用使肉的超微网状结构损伤，导致剪切力升高，这与孙树远等[32] 的研究结果一致。

2.3.2　超声温度对牦牛肉剪切力的影响　超声波作为一种安全、无电离、对环境友好的机械波，其产生的作用力，不仅能直接作用于肌纤维，还能增强酶-底物传质效率[33]。如图 5B 所示，在最适酶浓度下，牦牛肉剪切力随超声温度升高呈现先降低后升高的趋势，在 35 ℃ 降至最低为 67.330±2.286 N，较 20 ℃ 时降低 32.323%（P<0.05）。这归因于超声波通过空化效应、机械效应以及热效应提高牦牛肉嫩度，同时促进蛋白酶渗透，使其更高效、均匀地发挥嫩化作用[34]。然而温度过高会导致蛋白酶活性降低，嫩化效果受损，同时使牦牛肉蛋白变性造成肉剪切力回升。

2.3.3　超声时间对牦牛肉剪切力的影响　如图 5C 所示，在 35 ℃ 及 2.5% 酶浓度条件下，牦牛肉剪切力随着超声时间的延长先降低后增加。当处理时间较短，酶的催化作用与超声效应无法充分协同，致使嫩化效果受限。随着超声时间延长，牦牛肉剪切力逐步下降，40 min 达到最低 52.483±1.06 N，较未超声组降低 47.475%（P<0.05）。然而超时处理（>40 min）剪切力回升，与 Liu 等[35] 在研究中观察到的鱿鱼经超过 20 min 的超声处理后剪切力升高现象一致，这可能与长时间的超声导致蛋白酶活性下降，同时牦牛肉肌原纤维过度降解，影响肌肉收缩，肌肉失去原有弹性相关[36]。

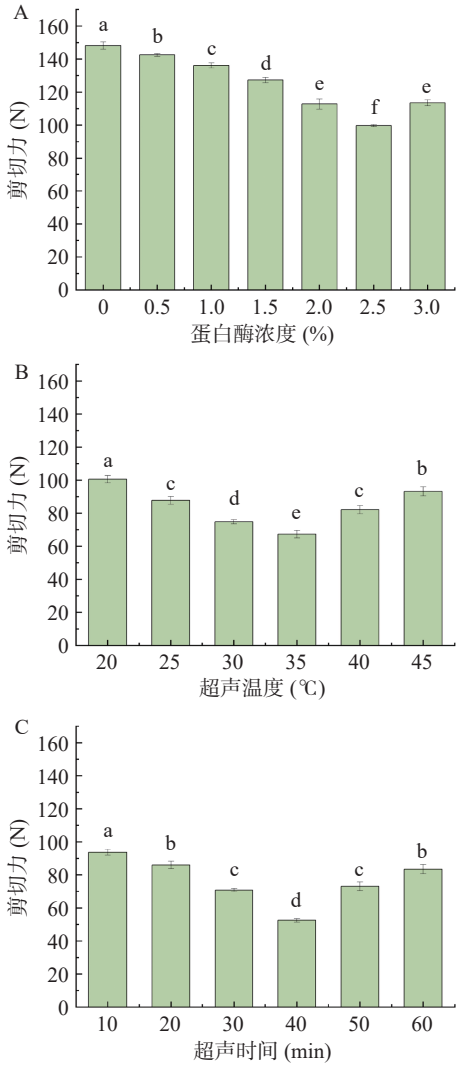


图 5　不同因素对牦牛肉剪切力的影响

Fig.5　Effects of different factors on shear force for yak meat

2.4　响应面优化试验

响应面试验可以得到各因素对响应值的影响规律及交互作用，以牦牛肉剪切力为响应值设计并进行响应面试验，结果如表 3 所示。

利用 Design Expert 13 分析得到牦牛肉剪切力（Y）对蛋白酶浓度（A）、超声温度（B）、超声时间（C）的二次多项回归方程：$Y=53.64+0.1563A+5.15B+1.82C+0.889AB+0.7115AC+0.091BC+10.04A^2+30.03B^2+24.25C^2$。

表 3 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 3 Box-Behnken experimental design and results

实验号	A: 蛋白酶浓度(%)	B: 超声温度(℃)	C: 超声时间(h)	Y: 剪切力(N)
1	2.5	30	50	104.79
2	2.5	35	40	50.88
3	2.5	35	40	50.79
4	3	40	40	98.53
5	2	35	50	88.65
6	2.5	40	30	110.88
7	2.5	35	40	53.69
8	2.5	35	40	56.28
9	2	35	30	83.85
10	3	30	40	86.16
11	2.5	30	30	101.05
12	2	40	40	99.51
13	2.5	35	40	56.58
14	2	30	40	90.59
15	2.5	40	50	114.99
16	3	35	50	90.60
17	3	35	30	88.65

回归模型方差分析如表 4 所示，该模型的 F=116.76，P<0.01，表明模型极显著，失拟项 F=0.8147，P>0.05，即失拟项不显著。此外，模型 R^2=0.9934，表明模型可信度较好；矫正决定系数为 0.9849，与 R^2 极为接近，说明模型拟合度高，可用于预测牦牛肉嫩化最佳工艺。根据 F 值将影响因素由大到小排列为超声温度>超声时间>蛋白酶浓度。

表 4 模型方差分析

Table 4 Analysis of variance for the model

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	7582.07	9	842.45	116.76	<0.0001	**
A: 蛋白酶浓度	0.1953	1	0.1953	0.0271	0.8740	
B: 超声温度	212.34	1	212.34	29.43	0.0010	**
C: 超声时间	26.62	1	26.62	3.69	0.0962	
AB	3.16	1	3.16	0.4381	0.5292	
AC	2.02	1	2.02	0.2806	0.6127	
BC	0.0331	1	0.0331	0.0046	0.9479	
A^2	424.80	1	424.80	58.88	0.0001	**
B^2	3798.03	1	3798.03	526.39	<0.0001	**
C^2	2476.12	1	2476.12	343.18	<0.0001	**
残差	50.51	7	7.22			
失拟项	19.16	3	6.39	0.8147	0.5489	
纯误差	31.35	4	7.84			
总合	7632.58	16				

注: *表示显著(P<0.05); **表示极显著(P<0.01)。

基于所得模型回归方程及实验结果，绘制各因素间响应面图(图 6)。可以看到，随着各因素数值升高，牦牛肉剪切力均呈现先减小后增大的趋势。蛋白酶浓度与超声温度之间的交互作用(AB)对牦牛肉剪切力的影响最大，其次是蛋白酶浓度与超声时间的交互作用(AC)，超声时间与超声温度的交互作用(BC)对牦牛肉剪切力的影响最小，与方差分析结果各因素交互作用 AB>AC>BC 一致。

验证实验：模型预测当蛋白酶浓度为 2.498%、超声温度为 34.571 ℃、超声时间为 39.624 min 时，

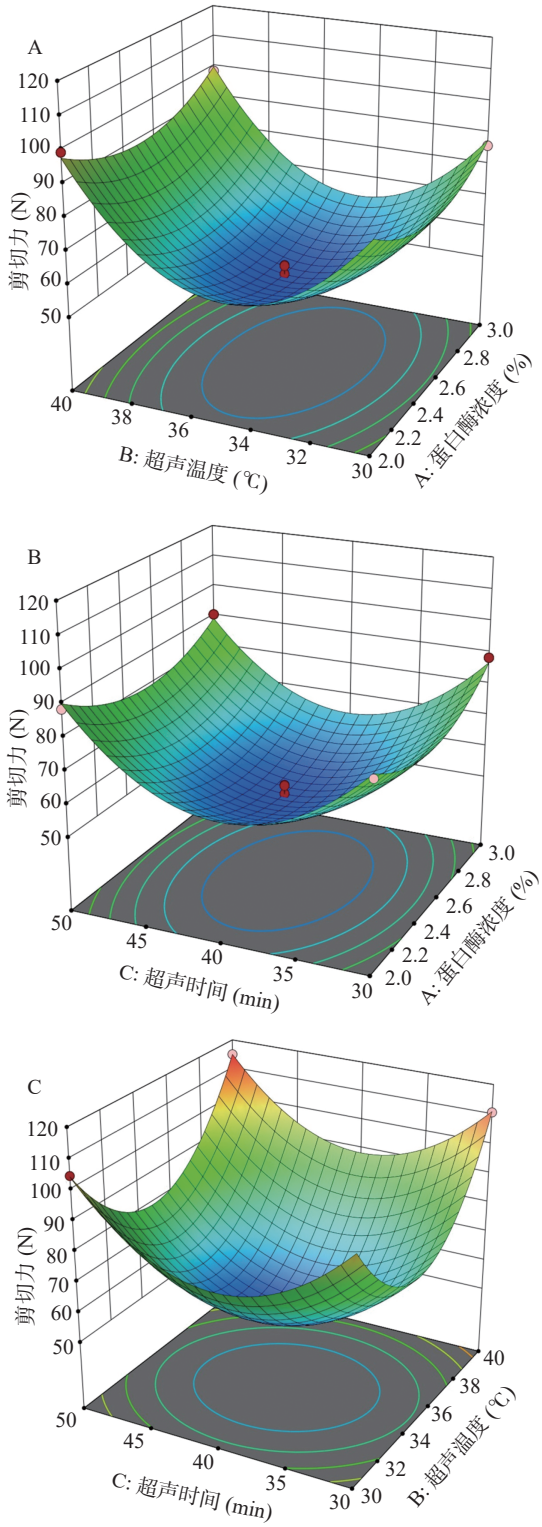


图 6 各因素间相互作用对牦牛肉剪切力的影响

Fig.6 Influence of various factors interaction on shear force of yak meat

注: A. 蛋白酶浓度与超声温度; B. 蛋白酶浓度与超声时间; C. 超声温度与超声时间。

牦牛肉剪切力为 53.389 N。为进一步验证其可靠性，将牦牛肉用 2.5% 的蛋白酶处理后在 34.6 ℃ 下超声 39.6 min，进行三次重复验证实验测定剪切力。得到剪切力的平均值为 54.389±1.058 N，较预测值偏差 1.87%，证明该模型能较准确预测牦牛肉嫩化效果，该工艺参数使牦牛肉剪切力降低 63.3%。

2.5　嫩化前后牦牛肉质构变化

以最佳工艺条件嫩化牦牛肉，其质构特性如表 5 所示。与嫩化前相比，嫩化后硬度由 99.67±2.59 N 降至 45.72±2.65 N，弹性、内聚性、胶粘性及咀嚼性分别下降 35.5%、21.3%、64.3% 和 77.3%（P<0.05）。这与 Yoon 等[37] 报道的超声辅助木瓜蛋白酶和碳酸氢钠使肉的硬度降低 68.19%，同样证明了超声辅助酶解技术对改善肉品质构特性的能力。蛋白酶能通过降解肌原纤维蛋白、肌浆蛋白及结缔组织蛋白等大分子物质，破坏肌肉纤维的交联结构，改善牦牛肉的质构特性[38]，同时，超声波的空化效应，增加了底物与酶的相互作用[39]，这种协同效应降低了肌原纤维的完整性，最终实现硬度、咀嚼性等质构参数的系统性优化。

表 5　嫩化前后牦牛肉质构特性分析

Table 5　Effects of tenderizing on textures of yak meat

样品	硬度(N)	弹性	内聚性	胶粘性	咀嚼性(N)
嫩化前	99.67±2.59^{a}	0.62±0.03^{a}	0.61±0.01^{a}	61.20±2.06^{a}	38.14±1.91^{a}
嫩化后	45.72±2.65^{b}	0.40±0.01^{b}	0.48±0.02^{b}	21.85±0.48^{b}	8.67±0.40^{b}

注：同列不同字母表示存在差异（P<0.05）。

2.6　嫩化前后牦牛肉保水性变化

保水性与肉品色泽、风味、嫩度等食用品质密切相关，是衡量肉品经济价值的重要指标[40]。如图 7 所示，在最佳嫩化工艺处理后，牦牛肉的蒸煮损失和离心损失变化得到了显著改善，与对照组相比，嫩化组蒸煮损失降低了 33.7%，离心损失降低了 52.0%（P<0.05）。相较于王文艳等[41] 报道的菠萝蛋白酶和超声处理使牛肉后系水力提升 23.1%，本研究中对保水性的改善效果更好。推测这一现象与嫩化过程中蛋白质降解及结构改变密切相关，蛋白酶的水解促使肌肉组织间隙增大，形成更疏松的网状结构，提高了其纳水的能力[42]。

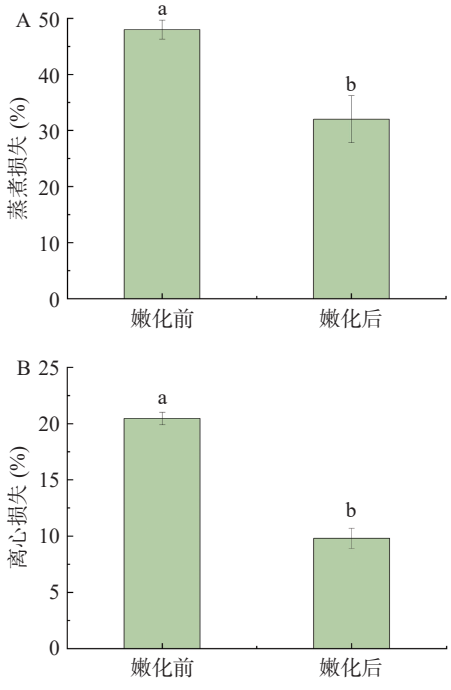


图 7　嫩化前后牦牛肉蒸煮损失和离心损失

Fig.7　Steaming losses and centrifugation losses of yak meat before and after tenderization

注：A 为嫩化前后牦牛肉蒸煮损失；B 为嫩化前后牦牛肉离心损失。

2.7　嫩化前后牦牛肉肌原纤维蛋白降解情况

肌原纤维蛋白的化学结构状态是影响肉嫩度的关键因素[43]。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析最佳嫩化条件下牦牛肉肌原纤维蛋白的降解情况，结果如图 8 所示。可以看出，嫩化后肌原纤维蛋白在副肌球蛋白处（100 kDa）的条带强度明显减弱，而在 48~75 kDa 区间有微弱条带产生，推测为副肌球蛋白的降解产物。并且肌动蛋白（43 kDa）处条带和肌球蛋白轻链（16~25 kDa）处条带灰度值降低。基于此，可以推测嫩化工艺是通过促进副肌球蛋白、肌动蛋白及肌球蛋白轻链降解，破坏肌原纤维的空间结构完整性，从而降低肌肉剪切阻力。

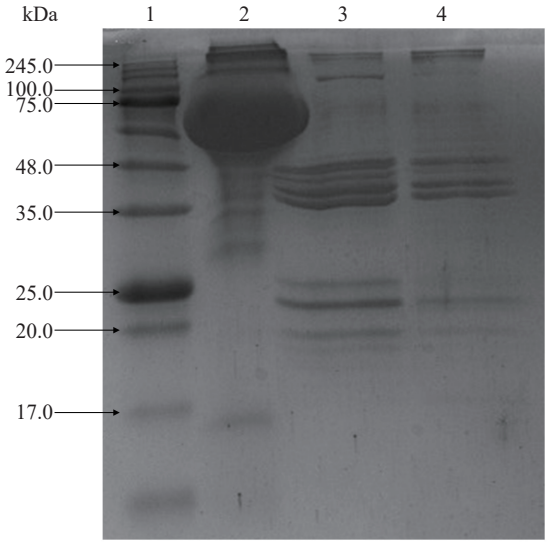


图 8　嫩化前后牦牛肉肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 电泳

Fig.8　SDS-PAGE electrophoresis of myofibrillar protein in yak meat before and after tenderization

注：1：蛋白分子 Marker；2：牛血清白蛋白；3：嫩化前；4：嫩化后。

2.8　嫩化前后牦牛肉肌原纤维小片化指数变化

肌原纤维小片化指数（MFI）是指长度为 1~4 个

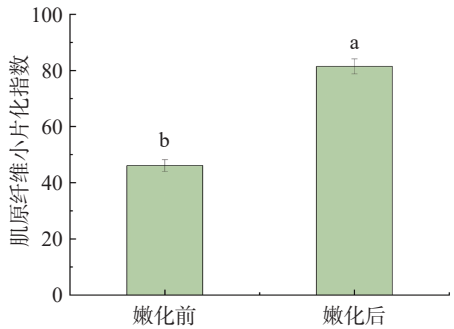


图 9　嫩化前后牦牛肉肌原纤维小片化指数（MFI）变化

Fig.9　Changes in myofibrillar fragmentation index (MFI) of yak meat before and after tenderization

肌节的肌原纤维占肌原纤维碎片总数的比例，MFI 越大则代表肌纤维断裂程度越大[44]，与肉的嫩度有关。如图 9 所示，嫩化前牦牛肉 MFI=46.1±2.08，嫩化后则达到 87.5±2.65，增大 47.29%，有显著变化（P<0.05），即在蛋白酶和超声波的协同作用下牦牛肉的肌纤维受损。研究表明超声波的空化作用使肌原纤维蛋白解离，聚集体颗粒分散，能直接增大 MFI 值[45]。除此之外，蛋白酶破坏了肌原纤维蛋白结构，导致肌纤维断裂，使牦牛肉嫩度得到改善，这进一步验证了剪切力的探究结果，与 Zhang 等[15] 的研究一致。

3 结论

本研究中，波茨坦短芽孢杆菌产生的 S8 蛋白酶在 pH7.0、30 ℃ 左右和 20 mmo/L Mg^{2+}条件下酶活力最高，相对酶活力达 141%；响应面优化得到最佳牦牛肉嫩化工艺为蛋白酶浓度 2.5%、超声温度 34.6 ℃、超声时间 39.6 min，在此条件下牦牛肉剪切力最低 54.389±1.058 N，较嫩化前降低 63.3%；在该最佳工艺条件下，牦牛肉硬度、弹性、内聚性、胶粘性和咀嚼性均有显著降低（P<0.05），保水性提高，其中蒸煮损失降低 33.7%，离心损失降低 52.0%；嫩化后牦牛肉肌原纤维降解，MFI 增大了 47.29%。在超声波的辅助下 S8 蛋白酶使牦牛肉肌肉剪切力降低、质构特性和保水性得到改善、肌肉纤维断裂，嫩化效果好。本研究得到一种新的微生物来源的肉类嫩化剂，同时为牦牛肉精深加工产业提供技术支持。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] MOHD A S I, KUMAR P, SHARMA N, et al. Application of plant proteases in meat tenderization: recent trends and future prospects[J]. Foods, 2023, 12(6): 1336.

[2] MARINO R, DELLAMALVA A, CAROPRESE M, et al. Proteomics in bovine semitendinosus muscle to assess emerging strategies based on papain injection and ultrasounds on meat tenderization process[J]. Meat Science, 2023, 200: 109147.

[3] XU J H, CAO H J, ZHANG B, et al. The mechanistic effect of bromelain and papain on tenderization in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle[J]. Food Research International, 2020, 131: 108991.

[4] JEONG S H, LEE H B, LEE D U. Effects of pulsed electric field on meat tenderization and microbial decontamination: A review[J]. Food Science of Animal Resources, 2024, 44(2): 239−254.

[5] AUNG S H, HOSSAIN M A, PARK J Y, et al. Development of semi-dried goat meat jerky using tenderizers considering the preferences of the elderly[J]. Journal of Animal Science and Technology, 2024, 66(4): 807−833.

[6] PHANWIPA W P, MATURIN K H, THANALEE S P, et al. Novel edible starch films incorporating papain for meat tenderization[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2022, 31: 100787.

[7] KIM H, CHIN K B. Protease activities of extracts from kiwi of various colors and their use as a tenderizer in cured pork loins[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, 46(11).

[8] SONG P, ZHANG X, WANG S H, et al. Microbial proteases and their applications[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1236368.

[9] 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 Y Q, CHEN S J, QIN J, et al. Advances in proteases producted by microorganisms[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 451−458.]

[10] BUREROS KJC, DIZON EI, ISRAEL KAC, et al. Physicochemical and sensory properties of carabeef treated with Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn protease as meat tenderizer[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(1): 310−318.

[11] LIANG A J, WANG J L, DING L L, et al. Probiotic properties, whole-genome sequence analysis, and safety assessment of *BreviBacillus borstelensis* S8[J]. LWT, 2024, 210: 116800.

[12] 罗唐君, 马娜, 刘鑫, 等. 菠萝蛋白酶嫩化牦牛肉的工艺研究[J]. 食品科技, 2024, 49(8): 116−121. [LUO T J, MA N, LIU X, et al. Tenderizing process of yak meat by bromelain[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(8): 116−121.]

[13] BEKHIT A A, HOPKINS D L, GEESINK G, et al. Exogenous proteases for meat tenderization[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2014, 54(8): 1012−1031.

[14] MA Y, YUAN Y P, BI X F, et al. Tenderization of yak meat by the combination of papain and high-pressure processing treatments[J]. Food and Bioprocess Technology, 2019, 12(4): 681−693.

[15] ZHANG X W, ZHU L X, SONG L S, et al. Combined treatment of lactic acid-ultrasound-papain on yak meat and its tenderization mechanism[J]. Meat Science, 2023, 196: 109043.

[16] 张智, 温冬灼, 冯丽荣, 等. 耐热解淀粉芽孢杆菌 BA-DES4 产纤维素酶的分离纯化及酶学性质[J]. 食品工业科技, 2023, 44(11): 136−143. [ZHANG Z, WEN D Z, FENG L R, et al. Separation, purification and enzymatic property of cellulase produced by thermostable *Bacillus amyloliquefaciens* BA-DES4[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(11): 136−143.]

[17] 翁晓敏, 胡诗琦, 蔡佳琪, 等. 海洋来源纤维素酶 CelL7 的异源表达、酶学表征及生物膜清除作用[J]. 食品科学, 2025, 46(6): 124−132. [WENG X M, HU S Q, CAI J Q, et al. Heterologous expression, enzymatic characterization, and biofilm eradication activity of cellulase CelL7 derived from marine sources[J]. Food Science, 2025, 46(6): 124−132.]

[18] JI X Q, LUO X, ZHU L X, et al. Effect of medium voltage electrical stimulation and prior ageing on beef shear force during superchilled storage[J]. Meat Science, 2021, 172: 108320.

[19] 张诗琦, 杨尚霖, 王翔宇, 等. 不同间歇微波解冻方式对牦牛肉品质特性、脂质氧化的影响[J]. 食品工业科技, 2024, 45(12): 38−46. [ZHANG S Q, YANG S L, WANG X Y, et al. Effects of different intermittent microwave thawing methods on the quality characteristics and lipid oxidation of yak meat[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(12): 38−46.]

[20] ZHANG H P, TANG D B, YANG H G, et al. Effects of high hydrostatic pressure assisted enzymatic tenderization on goose meat texture and myofibril protein[J]. LWT, 2023, 184: 114845.

[21] 吴平, 姚芳, 王正云, 等. 超声协同嫩化剂改善淘汰蛋鸡肉嫩度的工艺优化及其对肉品质的影响[J]. 食品工业科技, 2024, 45(12): 56−68. [WU P, YAO F, WANG Z Y, et al. Optimization of ultrasound assisted tenderizing agents for improving the meat tenderness of eliminated hen and its effects on meat qualities[J]. Sci-

ence and Technology of Food Industry, 2024, 45(12): 56−68.］
［22］ 郑娇, 唐善虎, 李思宁, 等. 有机酸前处理对风干牦牛肉理化性质及挥发性风味物质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(7): 97−104. ［ZHENG J, TANG S H, LI S N, et al. Effects of pre-treatments with organic acids on the physicochemical properties and volatile flavor substances of air-dried yak jerky[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(7): 97−104.］
［23］ 黄武营, 李云, 朱慧, 等. 一株产凝乳酶变色栓菌鉴定及其凝乳酶的分离纯化与酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(12): 243-251. ［HUANG W Y, LI Y, ZHU H, et al. Identification of a milk-clotting enzyme-producing strain *Trametes versicolor* and enzyme purification and characterization[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(12): 243-250.］
［24］ MA D L, QIU L, WANG X F, et al. L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* C6: Enzymatic characteristics and its recombinant *Bacillus subtilis* whole cells achieving a significantly increased production of D-tagatose[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 278(P1): 134753.
［25］ D'SOUZA D H, BHATTACHARYA S, DAS A. Fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* S46: Purification, characterization, and evaluation of its *in vitro* thrombolytic potential[J]. Journal of Basic Microbiology, 2020, 60(8): 661−668.
［26］ SELIM M S, ABO ELSOUD M M, SANAD M N M E, et al. Enzymatic debittering of citrus juices: optimization, modeling, and characterization of naringinase production from marine *Bacillus subtilis* strain BSnari[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2023, 53.
［27］ HONG T, PAN R R, KE J T, et al. Expression, purification, and enzymatic characterization of an extracellular protease from *Halococcus salifodinae*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2023, 54(4): 2689−2703.
［28］ ZOU D, JIANG X D, JIANG C, et al. Identification of a transglutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens*: Gene mining, protein expression, mechanism analysis and enzymatic characterization[J]. Results in Engineering, 2024, 24: 102888.
［29］ MAJEED T, LEE C C, ORTS W J, et al. Characterization of a thermostable protease from *Bacillus subtilis* BSP strain[J]. BMC Biotechnology, 2024, 24(1): 49.
［30］ ZHANG Y, LI S S, ZHAO L Z. Effects of thermal processing and temperature on the quality, protein oxidation, and structural characteristics of yak meat[J]. Journal of Texture Studies, 2023, 54(5): 659−670.
［31］ GAGAOUA M, DIB A L, LAKHDARA N, et al. Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases[J]. Current Opinion in Food Science, 2021, 38: 177−188.
［32］ 孙树远, 陈琪, 何静, 等. 木瓜蛋白酶与超高压技术嫩化驼肉的研究[J]. 中国食品学报, 2023, 23(4): 239−250. ［SUN S Y, CHEN Q, HE J, et al. Tenderization and comparison of camel meat by papain and ultra-high pressure technology[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(4): 239−250.］
［33］ GONZALEZ-GONZALEZ L, ALARCON-ROJO A D, CARRILLO-LOPEZ L M, et al. Does ultrasound equally improve the quality of beef? an insight into *Longissimus lumborum, Infraspinatus* and *Cleidooccipitalis*[J]. Meat Science, 2020, 160: 107963.
［34］ 王颂萍, 王雪羽, 杨欣悦, 等. 超声波技术嫩化机理及其在肉制品中应用效果的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 423−431. ［WANG S P, WANG X Y, YANG X Y, et al. Research progress on the mechanism of ultrasound tenderization and application effect in meat products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 423−431.］
［35］ LIU H Y, LING X C, LI F, et al. Ultrasonic treatment improves the tenderness and retains organoleptic properties of squid (*Illex argentinus*) before and after high/low temperature cooking[J]. Food Biophysics, 2024, 20(1): 31.
［36］ 马旭华, 杨波, 李亚蕾, 等. 宰后成熟期间结构蛋白对秦川牛肉嫩度的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(17): 199−207. ［MA X H, YANG B, LI Y L, et al. Effect of structural protein on tenderness of beef from Qinchuan cattleduring postmortem aging[J]. Food Science, 2022, 43(17): 199−207.］
［37］ YOON D Y, LEE K Y, LEE H G. Effect of ultrasound-assisted treatment on meat tenderization for elderly individuals[J]. Food Sci Biotechnol, 2024, 33(13): 3029−3036.
［38］ WANG Y, TIAN X J, LIU X Z, et al. Effects of different cooking methods on physicochemical, textural properties of yak meat and its changes with intramuscular connective tissue during *in vitro* digestion[J]. Food Chemistry, 2023, 422: 136188.
［39］ 陈依楠, 柳嘉扬, 毕琳格, 等. 超声波辅助风味蛋白酶嫩化海肠(单环刺蛄)的研究[J]. 食品科技, 2024, 49(10): 164−170. ［CHEN Y N, LIU J Y, BI L G, et al. Ultrasound assisted flavor protease tenderizing of sea intestine (*Urechis unicinctus*)[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(10): 164−170.］
［40］ SZMAŃKO T, LESIÓW T, GÓRECKA J. The water-holding capacity of meat: A reference analytical method[J]. Food Chemistry, 2021, 357: 129727.
［41］ 王文艳, 陈睿璇, 魏贞, 等. 超声波辅助菠萝蛋白酶对牛肉嫩度的影响[J]. 食品科技, 2023, 48(6): 110−116. ［WANG W Y, CHEN R X, WEI Z, et al. Effect of ultrasound-assisted bromelain on tenderness of beef[J]. Food Science and Technology, 2023, 48(6): 110−116.］
［42］ QIAN S Y, LI X, WANG H, et al. Contribution of calpain to protein degradation, variation in myowater properties and the water-holding capacity of pork during postmortem ageing[J]. Food Chemistry, 2020, 324: 126892.
［43］ LI J Q, WANG Q T, LIANG R R, et al. Effects and mechanism of sub-freezing storage on water holding capacity and tenderness of beef[J]. Meat Science, 2024, 215: 109540.
［44］ WANG T T, FENG X C, LI L Z, et al. Effects of quercetin on tenderness, apoptotic and autophagy signalling in chickens during post-mortem ageing[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132409.
［45］ DANG D S, STAFFORD C D, TAYLOR M J, et al. Ultrasonication of beef improves calpain-1 autolysis and caspase-3 activity by elevating cytosolic calcium and inducing mitochondrial dysfunction[J]. Meat Science, 2022, 183: 108646.