

## 2种蛋白酶水解牦牛血液蛋白工艺优化

刘元林<sup>1</sup>, 田晓静<sup>1,2</sup>, 黄汇惠<sup>1</sup>, 柏家林<sup>1,2\*</sup>, 丁功涛<sup>1,2</sup>, 孙娜<sup>1,2</sup>, 马忠仁<sup>1,2</sup>, 马占龙<sup>3</sup>

(1. 西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730124; 2. 西北民族大学 生物医学研究中心 中国-马来西亚国家联合实验室, 兰州 730030; 3. 临夏市俊林清真肉制品有限责任公司, 临夏 731100)

**摘要:** **目的** 探究碱性蛋白酶和风味蛋白酶水解牦牛血液蛋白的工艺。**方法** 以蛋白水解率为指标, 运用单因素与正交试验获得碱性蛋白酶水解工艺, 在此基础上采用四因素三水平正交试验优化复合酶水解 pH、水解温度、酶浓度、水解时间, 获得碱性蛋白酶与风味蛋白酶分步水解工艺参数。**结果** 复合酶水解工艺为在底物浓度为 1:6 g/mL、最适 pH 9.0、最适温度为 55 °C、1.00%的碱性蛋白酶(w:w)水解 1 h 后, 调节 pH 到 7.0, 添加 0.75%的风味蛋白酶(w:w)继续水解 5 h, 可获得最高蛋白水解率为(30.77±0.18)%。**结论** 对研究酶水解牦牛血制备高附加值产品具有重要参考作用。

**关键词:** 牦牛血; 碱性蛋白酶; 风味蛋白酶; 蛋白水解率; 工艺优化

### Optimization of hydrolysis process of yak blood protein by 2 kinds of proteases

LIU Yuan-Lin<sup>1</sup>, TIAN Xiao-Jing<sup>1,2</sup>, HUANG Hui-Hui<sup>1</sup>, BAI Jia-Lin<sup>1,2\*</sup>, DING Gong-Tao<sup>1,2</sup>, SUN Na<sup>1,2</sup>, MA Zhong-Ren<sup>1,2</sup>, MA Zhan-Long<sup>3</sup>

(1. College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730124, China; 2. China-Malaysia National Joint Laboratory of Biomedical Research Center, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China; 3. Linxia Junlin Muslim Meat Products Co. Ltd., Linxia 731100, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the hydrolysis process of yak blood protein by alkaline protease and flavourase **Methods** The protein hydrolysis rate was used as the index. The optimum process for alkaline protease hydrolysis of yak blood was obtained by using single-factor and orthogonal experiments. On the basis of the four-factor and three-level orthogonal experiment, hydrolysis pH, temperature, enzyme concentration, and time were optimized to obtain the alkaline protease and flavor protease hydrolysis process step by step. **Results** In the complex enzymatic hydrolysis process, the substrate concentration was 1:6 g/mL, the optimum pH was 9.0, the optimum temperature was 55 °C, 1.00% alkaline protease (w:w) was used for hydrolysis for 1 h, the pH was adjusted to 7.0, and 0.75% flavor protease(w:w) was added for 5 h, as the result, the highest proteolytic rate was (30.77±0.18)%. **Conclusion** It is an important reference for the study of enzymatic hydrolysis of yak blood to produce high value-added products.

**基金项目:** “科技助力经济 2020”重点专项(SQ2020YFF0405583)、中央高校基本科研项目(XBMU-BYL19116)、西北民族大学中央高校基本科研业务费资助项目(31920200115、31920190022)

**Fund:** Supported by " Science and Technology to Boost Economy 2020" Focus on the Special (SQ2020YFF0405583), Central Universities Basic Scientific Research Projects (XBMU-BYL19116), and Northwest Minzu University Central University Basic Scientific Research Operating Expenses Subsidy Project (31920200115, 31920190022)

\***通信作者:** 柏家林, 博士, 教授, 主要研究方向为功能基因组学与动物分子育种、生物技术。E-mail: jlbai@xbmu.edu.cn

\***Corresponding author:** BAI Jia-Lin, Ph.D, Professor, College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730124, China. E-mail: jlbai@xbmu.edu.cn

**KEY WORDS:** yak blood; alkaline protease; flavourzyme; protein hydrolysis rate; process optimization

## 0 引言

我国是世界上牦牛拥有量最多的国家,占全世界总量 85%左右<sup>[1]</sup>,牦牛养殖是西北地区畜牧业主体之一,肉用牦牛养殖成为农牧民脱贫增收的有力武器<sup>[2]</sup>。2019 年,全国屠宰牦牛约 360 万头<sup>[3]</sup>,随集约化养殖业的迅猛发展,畜产品加工中的副产物也随之大量增加,血液是其中最大的副产品之一<sup>[4]</sup>。牦牛血作为一种优质动物血资源,有较重血腥味、消化性和适口性差、色泽感官不佳且原料血液极难保存,严重制约牦牛血资源的综合利用,造成资源浪费和环境污染等问题<sup>[5]</sup>。

随生物技术和酶制剂生产的进步,酶处理废弃物成为较理想的方法。动物屠宰血液经酶解后可用于高价值产品生产,如祝霞等<sup>[6]</sup>酶解 1 L 羊血可提取 3.93 g 血红素,秦春青等<sup>[7]</sup>酶解鹅血提取高氨基酸血红素,水解液中血红素含量为 1.21 mg/mL,铁离子的含量为 90.42 μg/mL。酶切位点不同会造成其酶解产物性质不一样,研究发现血液经酶解后,水解物具有较好的溶解性、吸湿性、保湿性、起泡性,较弱的乳化性和泡沫稳定性<sup>[8]</sup>,并且能够有效地清除自由基<sup>[9]</sup>,具有较强的抗氧化能力<sup>[10-11]</sup>,如猪血酶解产物对 DPPH 自由基的清除率达 96.94%<sup>[12]</sup>。此外内切酶对提高水解率效果较理想,外切酶能将氨基端的氨基酸水解为游离氨基酸<sup>[13]</sup>,江霞等<sup>[14]</sup>采用风味蛋白酶与胰酶同步添加酶解工艺,可提高猪血蛋白水解率获得更加丰富的小分子肽及游离氨基酸,刘成梅等<sup>[15]</sup>建立中性蛋白酶和风味蛋白酶同步酶解鸭血血浆蛋白工艺,得到的小分子肽无异味且苦味轻。

目前对牦牛血酶解主要集中在多肽<sup>[16-17]</sup>、球蛋白<sup>[18]</sup>、血红素<sup>[19-20]</sup>等产物上,研究表明,复合酶水解比单酶水解更具有优势,可以得到质量更高的水解液。赫玉兰等<sup>[21]</sup>采用碱性蛋白酶和风味蛋白酶对牛血红蛋白进行分步酶解,获得苦味值较低的血红素多肽产物,复合酶水解工艺较单

酶水解工艺复杂,探究水解 pH、水解温度、酶添加比、酶水解时间比成为研究重点。

本研究通过单因素与正交试验研究水解 pH、水解温度、料液比、酶浓度、水解时间对碱性蛋白酶水解牦牛血液蛋白水解率的影响,优化获得碱性蛋白酶水解牦牛血工艺,在此基础上采用四因素三水平正交试验优化碱性蛋白酶与风味蛋白酶水解牦牛血液蛋白的复合酶水解工艺,为有效利用牦牛血资源提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料及样品预处理

牦牛血采于甘肃省临夏市俊林清真肉制品有限责任公司,经粗滤后运至实验室。将采集的新鲜血液,于真空冷冻干燥机-45℃预冻 2 h,于 0.01 Pa 真空度下-40~25℃线性降温、升温的方法,将血液冻干成血粉,血粉得率为(22.41±0.01)%,过 80 目筛,除去毛、碎肉等杂物,自封袋封存于冰箱-4℃保存。

#### 1.1.2 仪器与试剂

L-8900 全自动氨基酸分析仪(日本 Hitachi 公司); LGJ-100F 真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司); FOSS scrubber 2501 福斯蛋白质消化仪(福斯中国有限公司); S2-Field Kit 便携式 pH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); L3S 可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);

碱性蛋白酶(20 万 U/g)、风味蛋白酶(10 万 U/g)(山东隆科特酶制剂有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酶的筛选

对市售 8 种蛋白酶,在其较适条件下,添加 50000 U 酶活量,对牦牛血液蛋白进行 4 h 水解,之后进行沸水浴 15 min 灭活,发现碱性蛋白酶与风味蛋白酶的蛋白水解率较高(表 1)。

表 1 8 种酶水解牦牛血液蛋白水解率结果  
Table 1 Results of protein hydrolysis of yak blood by 8 kinds of enzymes

酶种类	较适 pH	较适温度/℃	时间/h	酶活/(万 U/g)	酶添加量/g	蛋白水解率 <sup>a</sup> /%
木瓜蛋白酶	7.5	50	4	10	0.50	3.09±0.13 <sup>c</sup>
菠萝蛋白酶	8.0	55	4	10	0.50	2.00±0.21 <sup>f</sup>
中性蛋白酶	7.5	55	4	15	0.33	3.91±0.06 <sup>d</sup>
酸性蛋白酶	4.0	50	4	10	0.50	4.73±0.37 <sup>c</sup>
碱性蛋白酶	8.5	55	4	20	0.25	5.61±0.21 <sup>b</sup>
胃蛋白酶	3.0	37	4	2	2.50	2.00±0.42 <sup>f</sup>
胰蛋白酶	8.5	50	4	2	2.50	1.49±0.12 <sup>f</sup>
风味蛋白酶	6.5	50	4	10	0.50	16.50±0.27 <sup>a</sup>

注:不同字母表示差异有显著性( $P < 0.05$ )。

### 1.2.2 不同水解工艺试验设计

#### (1)碱性蛋白酶单因素试验设计

酶解效果受酶水解时间、料液比、温度、酶浓度和pH等因素影响,本研究以蛋白水解率为指标,通过单因素试验研究水解时间(2、3、4、5、6 h)、料液比(1:3、1:4.5、1:6、1:7.5、1:9 g/mL)、水解温度(45、50、55、60、65 °C)、酶浓度(0.50%、0.75%、1.00%、1.25%、1.50%)、水解pH(8.0、8.5、9.0、9.5、10.0)对耗牛血液蛋白水解效果的影响规律,每隔30 min以1 mol/L NaOH或1 mol/L HCl溶液调节pH至设定值。

#### (2)碱性蛋白酶正交试验设计

在单因素实验基础上,采用五因素三水平 $L_{18}(3^5)$ 正交试验优化碱性蛋白酶水解耗牛血液蛋白工艺,正交实验因素水平设计见表2。

表2 碱性蛋白酶正交试验因素水平表  
Table 2 Orthogonal experimental factors and levels of alkaline protease

水平	因素				
	A: 水解pH	B: 水解温度/°C	C: 料液比/(g/mL)	D: 酶浓度/%	E: 水解时间/h
1	8.5	50	1:3	0.75	4
2	9.0	55	1:4.5	1.00	5
3	9.5	60	1:6	1.25	6

### 1.2.3 复合酶解试验设计

在碱性蛋白酶水解基础上,不改变料液比、水解总时间为6 h、酶总浓度1.75%(w:w)条件下。结合风味蛋白酶较适条件,探究加入风味蛋白酶时的pH、温度、酶浓度、水解时间。采用四因素三水平正交试验优化复合酶分步水解耗牛血工艺,正交实验因素水平设计见表3。

表3 复合酶水解正交试验因素水平表  
Table 3 Orthogonal experimental factors and levels of complex enzymes

水平	因素			
	F: 水解pH	G: 水解温度/°C	H: 风味蛋白酶浓度/%	I: 风味蛋白酶水解时间/h
1	6.0	45	0.25	5.0
2	6.5	50	0.50	4.5
3	7.0	55	0.75	4.0

### 1.2.4 蛋白酶活力测定

参照GB/T 23527—2009《蛋白酶制剂》<sup>[22]</sup>蛋白酶制

剂制作标准曲线,于680 nm波长下测酶试样的吸光值,并做空白对照实验,以酪氨酸浓度为X轴,吸光值为Y轴绘制标准曲线,曲线的回归方程为: $Y=0.0104X-0.0072$ , $r^2=0.9987$ ,线性结果良好。

### 1.2.5 蛋白质含量测定

参照GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的凯氏定氮法》<sup>[23]</sup>测耗牛血粉总蛋白含量,平行检测3次,以平均值计算。

### 1.2.6 蛋白水解率的测定

采用甲醛滴定法,蛋白水解率<sup>[24]</sup>计算公式如下:

$$DH = \frac{N - N_0}{N_t - N_0} \times 100$$

式中:DH:蛋白水解率,%;N<sub>0</sub>:样品中游离氨基酸的含量,%;N:水解液中氨基酸的含量,%;N<sub>t</sub>:底物蛋白中的总氮的含量,%。

### 1.2.7 氨基酸的测定

样品处理:样品液中加入5%的5-磺基水杨酸,1200 r/min离心15 min,去除蛋白后取上清液,使用全自动氨基酸分析仪检测水解产物中的游离氨基酸。

色谱条件:色谱柱:4.6 mm×60 mm 磺酸型阳离子树脂,分离柱柱温:50 °C,反应柱柱温:135 °C,进样体积为10 μL。

## 1.3 数据处理

采用Compare Means-One-Way ANOVA进行显著性分析,由SPSS V17完成;试验结果图由Origin 8.0软件(美国OriginLab公司)绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 碱性蛋白酶水解条件优化

#### 2.1.1 碱性蛋白酶水解单因素实验结果

##### (1)水解时间对耗牛血液蛋白水解率的影响

在酶浓度1.00%(w:w)、水解温度55 °C、料液比1:6 g/mL、pH 9.0条件下,探究水解时间(2、3、4、5、6 h)对蛋白水解率的影响规律。结果如图1(A)所示,随水解时间不断延长蛋白水解率也不断上升,5 h后逐渐趋于平缓,且水解5 h与6 h的蛋白水解率差异不显著( $P>0.05$ ),结合生产周期的经济效益和耗能角度,故选较佳水解时间为5 h。

##### (2)料液比对耗牛血液蛋白水解率的影响

在酶浓度1.00%(w:w)、水解温度55 °C、pH 9.0、水解时间5 h条件下,探究料液比(1:3、1:4.5、1:6、1:7.5、1:9 g/mL)对蛋白水解率的影响规律。结果如图1(B)所示,料液比对蛋白水解率影响呈现倒V规律,在料液比1:4.5 g/mL时蛋白水解率最高,且该比例与血粉复原成血液比例较为接近,符合实际生产对鲜血直接加工工艺,故选较佳料液比为1:4.5 g/mL。

### (3) 水解温度对牦牛血液蛋白水解率的影响

在酶浓度 1.00%(w:w)、料液比 1:4.5 g/mL、水解时间 5 h、pH 9.0 条件下, 探究水解温度(45、50、55、60、65 °C)对蛋白水解率的影响规律。结果如图 1(C)所示, 蛋白水解率先上升后下降, 呈现倒 U 形规律, 当水解温度为 55 °C 时蛋白水解率最高。水解温度过高会导致碱性蛋白酶失活, 使蛋白水解率降低, 故选较佳水解温度为 55 °C。

### (4) 酶浓度对牦牛血液蛋白水解率的影响

在水解温度 55 °C、料液比 1:4.5 g/mL、水解时间 5 h、pH 9.0 条件下, 探究酶浓度(0.50%、0.75%、1.00%、1.25%、1.50%)(w:w)对蛋白水解率的影响规律。结果如图 1(D)所示, 随酶浓度的增加蛋白水解率持续增加, 其中 0.50%~1.00% 酶浓度(w:w)时蛋白水解率增加趋势较快, 1.00%~1.50% 酶浓度(w:w)时蛋白水解率增加趋势变平缓。方差分析发现酶

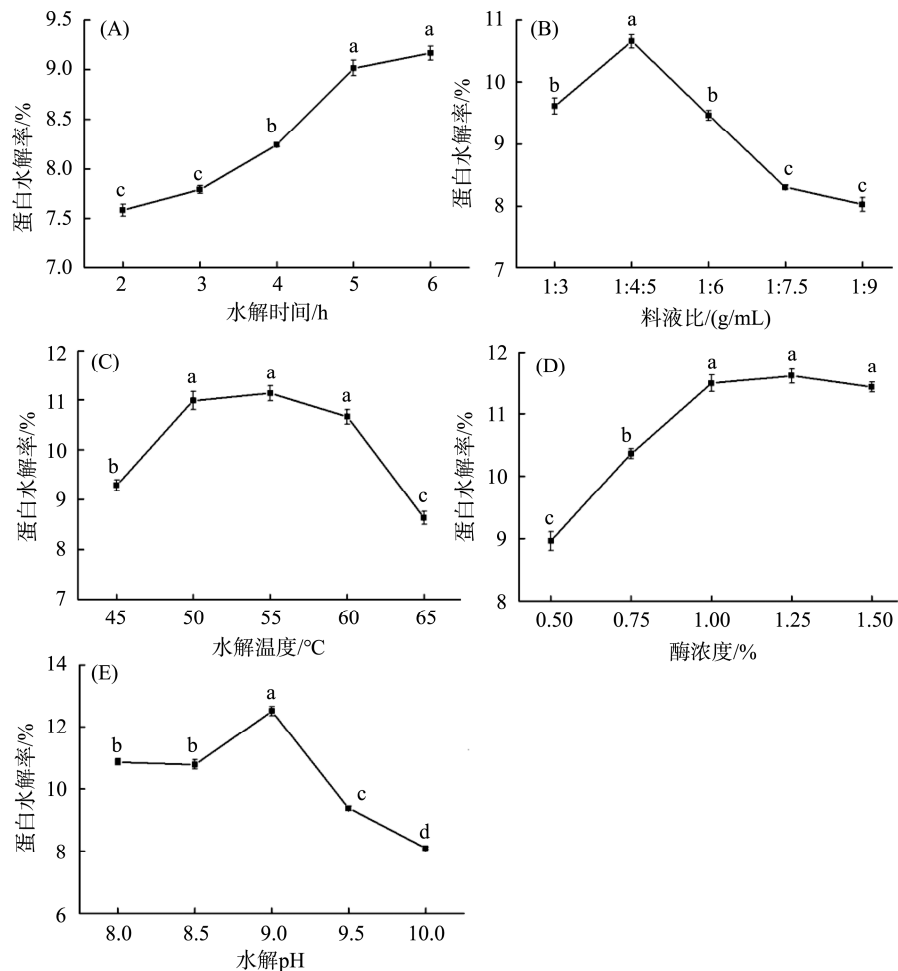
浓度 1.00% 与 1.25%、1.50%(w:w)的蛋白水解率结果差异性不显著( $P>0.05$ ), 综合水解率与成本考虑, 故选较佳酶浓度为 1.00%(w:w)。

### (5) 水解 pH 对牦牛血液蛋白水解率的影响

在酶浓度 1.00%(w:w)、水解温度 55 °C、料液比 1:4.5 g/mL、水解时间 5 h 条件下, 探究 pH(8.0、8.5、9.0、9.5、10.0)对蛋白水解率的影响规律。结果如图 1(E)所示, 随 pH 的变化, 蛋白水解率先增大后减小的规律, pH 为 9.0 时最大, 且蛋白水解率显著高于其他 pH( $P<0.05$ ), 故选较佳水解 pH 为 9.0。

### 2.1.2 碱性蛋白酶正交试验结果与分析

在单因素试验基础上, 以水解 pH、水解温度、料液比、酶浓度、水解时间为因素, 以蛋白水解率为指标, 采用五因素三水平正交实验优化工艺, 其设计表结果见表 4。



注: A: 水解时间、B: 料液比、C: 水解温度、D: 酶浓度、E: 水解 pH。

图 1 单因素水解实验结果( $n=3$ )

Fig.1 Results of single-factor hydrolysis experiment ( $n=3$ )

表4 正交试验极差分析  
Table 4 Range analysis of orthogonal experiment

组号	因素					蛋白水解率/%
	A: 水解 pH	B: 水解温度/°C	C: 料液比/(g/mL)	D: 酶浓度/%	E: 水解时间/h	
1	1	1	1	1	1	6.56±0.25
2	1	2	2	2	2	12.06±0.17
3	1	3	3	3	3	13.38±0.09
4	2	1	1	2	2	7.60±0.16
5	2	2	2	3	3	11.96±0.17
6	2	3	3	1	1	10.21±0.15
7	3	1	2	1	3	7.67±0.11
8	3	2	3	2	1	9.49±0.15
9	3	3	1	3	2	7.86±0.19
10	1	1	3	3	2	8.89±0.22
11	1	2	1	1	3	6.63±0.86
12	1	3	2	2	1	8.05±0.17
13	2	1	2	3	1	7.63±0.13
14	2	2	3	1	2	11.65±0.29
15	2	3	1	2	3	8.64±0.17
16	3	1	3	2	3	7.91±0.28
17	3	2	1	3	1	8.27±0.10
18	3	3	2	1	2	8.30±0.15
$K_{1j}$	56.39	46.34	46.36	51.88	50.28	
$K_{2j}$	57.74	60.88	55.66	53.79	56.40	
$K_{3j}$	49.54	56.46	61.66	58.01	56.99	
$R_j$	1.37	2.42	2.55	1.02	1.02	

结果由极差分析(表4)和方差分析(表5)可知, 5个因素对酶水解影响均存在差异显著性, 影响顺序依次为: 料液比(C)>水解温度(B)>水解 pH(A)>水解时间(E)>酶浓度(D)。碱性蛋白酶水解牦牛血液蛋白较佳组合是  $A_2B_2C_3D_3E_3$ , 即 pH 9.0, 水解温度 55 °C, 料液比 1:6 g/mL, 酶浓度 1.25 %(w:w), 水解时间 6 h, 验证实验牦牛血液蛋白水解率为(13.56±0.39)%, 水解液游离氨基酸总量为(661.14 ± 16.44) mg/100 mL。

王燕等<sup>[25]</sup>在血粉底物浓度为 41.44 mg/mL、温度为 45 °C、酶/底物比为 0.8034、酶解时间为 14 h 条件下探究碱性蛋白酶酶解血粉水解度达到了 16.39%。但其底物浓度

较低、酶解时间过长, 不利于生产周期规范性循环, 从经济和耗能角度考虑, 本次研究结果更有利于工厂的大批量生产, 工厂生产线的循环及符合绿色经济的号召。

## 2.2 复合酶分步水解正交试验结果

为提高水解液中氨基酸含量, 在碱性蛋白酶水解工艺优化基础上不改变料液比, 酶浓度总量为 1.75%(w:w)、水解总时间为 6 h, 以蛋白水解率为指标, 采用四因素三水平正交试验优化复合酶分步水解牦牛血工艺, 正交实验结果见表6。

结果由极差分析(表6)和方差分析(表7)可知, 4个因

素对酶水解影响顺序依次为: 酶浓度( $H$ )>水解时间( $I$ )>水解温度( $G$ )>水解 pH( $F$ )。复合酶水解最后的工艺参数为: 在上述碱性蛋白酶较优条件下, 加 1.00%的碱性蛋白酶( $w:w$ )

水解 1 h 后, 调 pH 为 7.0, 加入 0.75%风味蛋白酶( $w:w$ )水解 5 h, 验证实验牦牛血液蛋白水解率为 $(30.77\pm 0.18)\%$ , 水解液游离氨基酸总量为 $(3299.07 \pm 39.43)$  mg/100 mL。

表 5 正交试验方差分析  
Table 5 Analysis of variance of orthogonal experiment

源	III 型平方和	$df$	均方	$F$	$Sig.$
水解 pH	19.316	2	9.658	10.461	0.000
水解温度	55.498	2	27.749	30.056	0.000
料液比	59.409	2	29.704	32.174	0.000
酶浓度	9.833	2	4.916	5.325	0.009
水解时间	13.786	2	6.893	7.466	0.002
误差	39.699	43	0.923		
总计	4662.449	54			
校正的总计	197.540	53			

表 6 复合酶分步正交试验极差分析  
Table 6 Range analysis of stepwise orthogonal experiment for complex enzymes

组号	因素				蛋白水解率/%
	$F$ : 水解 pH	$G$ : 水解温度/ $^{\circ}C$	$H$ : 风味蛋白酶浓度/%	$I$ : 风味蛋白酶水解时间/h	
1	1	1	1	1	18.34±0.26
2	1	2	2	2	20.93±0.09
3	1	3	3	3	26.90±0.38
4	2	1	2	2	17.90±0.38
5	2	2	3	3	30.51±0.09
6	2	3	1	1	16.43±0.44
7	3	1	1	3	27.02±0.36
8	3	2	2	1	15.73±0.08
9	3	3	3	2	26.54±0.29
$K_{1j}$	66.17	63.26	50.50	75.40	
$K_{2j}$	64.85	67.17	65.38	64.38	
$K_{3j}$	69.29	69.87	84.43	60.53	
$R_j$	1.48	2.20	11.31	4.96	

表 7 复合酶分步正交试验方差分析  
Table 7 Analysis of variance of stepwise orthogonal experiment for complex enzymes

源	III 型平方和	$df$	均方	$F$	$Sig.$
水解 pH	9.957	2	4.978	39.190	0.000
水解温度	24.270	2	12.135	95.531	0.000
酶添加比	575.809	2	287.904	2266.476	0.000
水解时间比	114.129	2	57.065	449.231	0.000
误差	2.286	18	0.127		
总计	14273.768	27			
校正的总计	726.451	26			

杨万根等<sup>[26]</sup>在猪血血红蛋白底物质量分数为6%、pH为8、水解温度55℃、加酶比例5:5(木瓜蛋白酶:中性蛋白酶)条件下水解率为17.5%。于美娟等<sup>[27]</sup>将木瓜蛋白酶与中性蛋白酶复合水解猪血红蛋白,在pH为7.5,温度为50~55℃,酶底物浓度比8000 U/g,水解8 h,水解率达24.50%。江霞等<sup>[14]</sup>为提高猪血蛋白水解率以获得更加丰富的小分子肽及游离氨基酸,在风味蛋白酶与胰酶复合酶配比为0.96:1,水解温度50.88℃,初始pH为8.15,底物浓度6%,水解时间6 h条件下,水解度为43.13%。本研究复合酶水解率结果稍高于木瓜蛋白酶与中性蛋白酶复合,而低于风味蛋白酶与胰酶复合酶解,原因在于酶的种类不一样,其酶切点也不一样。付彩霞<sup>[28]</sup>对比蛋白酶种类和酶解方式对鹿血酶解效果的影响,发现碱性蛋白酶和风味蛋白酶分步酶解工艺可显著提高鹿血血红蛋白的水解效率,本实验与其研究结果一致。

### 3 结 论

采用单因素实验和五因素三水平正交实验优化碱性蛋白酶水解牦牛血工艺,其最佳工艺条件为  $A_2B_2C_3D_3E_3$ ,即:水解pH 9,水解温度55℃,料液比1:6 g/mL,酶浓度1.25%(w:w),水解时间6 h,此时牦牛血液蛋白的水解率为(13.56±0.39)%。在此基础上采用四因素三水平正交实验进行复合酶分步水解工艺,最后的工艺参数为:在pH 9,水解温度55℃,料液比1:6 g/mL,1.00%的碱性蛋白酶(w:w)条件下酶解1 h,之后调pH到7.0,加入0.75%风味蛋白酶(w:w)水解5 h,牦牛血液蛋白的水解率为(30.77±0.18)%。复合酶分步水解较碱性蛋白酶水解显著提高蛋白水解率,复合酶水解液中的氨基酸总量高于单一的碱性蛋白酶水解液。本实验方法能合理利用畜禽血液资源,适合工厂大规模生产,可提高酶水解牦牛血利用率,为利用牦牛血资源提供新途径,为酶解牦牛血制备氨基酸液体肥的研究奠定了基础,在解决环境污染问题上,将畜禽血液合理加工化。

### 参考文献

- [1] 杜美云. 三江源地区放牧牦牛种群优化模型与可持续发展决策支持系统[D]. 西宁: 青海大学, 2019.  
DU MY. Grazing yak population in three rivers source region optimization model and sustainable development decision support system [D]. Xining: Qinghai University, 2019.
- [2] 曹兵海, 张越杰, 李俊雅, 等. 2020年肉牛牦牛产业发展趋势分析与政策建议[J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(3): 179-182.  
CAO BH, ZHANG YJ, LI JY, *et al.* Analysis and policy suggestions on the development Trend of beef cattle and yak industry in 2020 [J]. Chin J Anim Sci, 2020, 56(3): 179-182.
- [3] 曹兵海, 李俊雅, 王之盛, 等. 2019年度肉牛牦牛产业技术发展报告[J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(3): 173-178.  
CAO BH, LI JY, WANG ZS, *et al.* 2019 Annual beef yak industry technology development report [J]. Chin J Anim Sci, 2020, 56(3): 173-178.
- [4] 张玉斌, 曹晖, 郭兆斌, 等. 牛血资源综合开发利用研究进展[J]. 肉类研究, 2011, 25(9): 30-34.  
ZHANG YB, CAO H, GOU ZB, *et al.* Advances in comprehensive exploitation and utilization of bovine blood [J]. Meat Res, 2011, 25(9): 30-34.
- [5] 王华清, 来进君, 段培琪, 等. 青海牦牛血液资源的研究现状及开发利用[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2016, 46(2): 43-44.  
WANG HQ, LAI JJ, DUAN PQ, *et al.* Research status and development of yak blood resources in Qinghai province [J]. Chin Qinghai J Anim Vet Sci, 2016, 46(2): 43-44.
- [6] 祝霞, 李颖, 付文力, 等. 碱性蛋白酶酶解提取羊血血红素工艺条件优化[J]. 食品工业科技, 2014, 35(18): 199-202.  
ZHU X, LI Y, FU WL, *et al.* Process optimization of the alkaline enzymatic extracting heme from sheep blood [J]. Sci Tech Food Ind, 2014, 35(18): 199-202.
- [7] 秦春青, 黄可, 李本姣, 等. 酶解鹅血制备高氨基酸血红素[J]. 食品工业科技, 2016, 37(12): 172-177.  
QIN CQ, HUANG K, LI BJ, *et al.* Enzymolysis goose blood preparation high amino acid goose blood heme [J]. Sci Technol Food Ind, 2016, 37(12): 172-177.
- [8] 姚晓蕾, 熊双丽, 张晓娟, 等. 猪血球水解蛋白质的功能特性和抗氧化性[J]. 精细化工, 2014, 31(5): 617-622, 626.  
YAO XL, XIONG SL, ZHANG XJ, *et al.* Functional characteristics and hydrolysate from porcine antioxidation of protein red blood corpuscle [J]. Fine Chem, 2014, 31(5): 617-622, 626.
- [9] 韩欢胜, 徐馨. 鹿血血红蛋白最佳酶解用酶的筛选[J]. 现代化农业, 2017, (5): 55-57.  
HAN HS, XU X. Selection of the best enzyme for deer hemoglobin hydrolysis [J]. Mod Agric, 2017, (5): 55-57.
- [10] 徐馨, 韩欢胜, 章许冉. 响应面法优化鹿血血红蛋白酶解工艺的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018, (1): 192-194.  
XU X, HAN HS, ZHANG XR. Study on optimization of deer-blood hemoglobin enzymolysis by response surface method [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2018, (1): 192-194.
- [11] 刘丽君. 驼血抗氧化与降糖活性肽的制备与鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.  
LIU LJ. Preparation and identification of antioxidant and hypoglycemic bioactive peptide from camel blood [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [12] 章斌, 侯小桢, 杨胜远, 等. 猪血红蛋白酶解条件优化及酶解物抗氧化研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(15): 99-103.  
ZHANG B, HOU XZ, YANG SY, *et al.* Research on optimization of enzymatic hydrolysis conditions of porcine hemoglobin and its antioxidant properties [J]. Food Res Dev, 2017, 38(15): 99-103.
- [13] 都荣强, 王天泽, 杜文斌, 等. 猪肉不同蛋白酶解呈味组分及热反应风味物质比较[J]. 中国食品学报, 2017, 17(10): 211-219.  
DU RQ, WANG TZ, DU WB, *et al.* Comparison of Taste components of pork's hydrolysates by different enzymes and volatile flavor compounds of thermal reaction [J]. J Chin Inst Food Sci Tech, 2017, 17(10): 211-219.
- [14] 江霞, 周成, 朱秋劲. 猪血蛋白的复合酶水解工艺条件优化研究[J].

- 中国调味品, 2012, 37(2): 35–41.
- JIANG X, ZHOU C, ZHU QJ. Study on optimum hydrolysis conditions of porcine blood protein by compound enzyme [J]. China Cond, 2012, 37(2): 35–41.
- [15] 刘成梅, 吴孝, 钟业俊, 等. 鸭血小分子肽同步酶解工艺的优化[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 151–154.
- LIU CM, WU B, ZHONG YJ, *et al.* Optimization of bienzymatic hydrolysis of duck plasma proteins for production of small peptides [J]. Food Sci, 2010, 31(10): 151–154.
- [16] 肖岚, 李诚, 杜昕, 等. 牦牛血低聚肽对小鼠抗疲劳能力和缺氧 H9c2 细胞的影响[J]. 核农学报, 2020, 34(4): 831–838.
- XIAO L, LI C, DU X, *et al.* Effects of yak blood oligopeptides on anti-fatigue ability of mice and hypoxia H9c2 cells [J]. J Nucl Agric Sci, 2020, 34(4): 831–838.
- [17] 杜昕. 菌酶联合制备牦牛血抗氧化肽及其分离纯化的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
- DU X. Preparation and purification of Antioxidant Peptides from Yak blood through Fermentation-enzymolysis strategy [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2016.
- [18] 肖雪莉.  $\alpha/\beta$ -半乳糖苷酶辅助饱和和硫酸铵法提取牦牛血中免疫球蛋白 G 及其活性稳定性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- XIAO XL. Research on extraction, activity and stability of immunoglobulin G by  $\alpha/\beta$ -galactosidase-assisted saturated ammonium sulfate method (from yak blood) [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.
- [19] 贾志春. 酶解牦牛血红蛋白制备氯化血红素工艺及其结构研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- JIA ZC. The preparation of heme chloride by Enzymatic hydrolysis of yak hemoglobin and the structure of hemIn [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016.
- [20] 刘振斌. 牦牛血红素提取工艺研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- LIU ZB. Study on the reaction condition of the heme extraction of the yak blood [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2012.
- [21] 赫玉兰, 卢士玲, 王琦翔, 等. 分步酶解牛血红蛋白制备血红素多肽[J]. 食品工业, 2015, 36(11): 202–206.
- HU YL, LU SL, WANG QX, *et al.* Preparation of heme-rich polypeptides from bovine hemoglobin by two-step enzymatic hydrolysis [J]. Food Ind, 2015, 36(11): 202–206.
- [22] GB/T 23527—2009 蛋白酶制剂[S].
- GB/T 23527—2009 Protease preparations [S].
- [23] GB 5009.5—2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S].
- GB/T 5009.5—2016 National food safety standard-Determination of protein in foods [S].
- [24] 邓佳, 刘学文, 邓冕. 猪血血红蛋白酶解的优化研究[J]. 食品科技, 2007, (11): 220–223.
- DENG J, LIU XW, DENG M. Study on optimum hydrolysis conditions of porcine hemoglobin by combinative enzyme [J]. Food Sci Tech, 2007, (11): 220–223.
- [25] 王燕, 易春霞, 文奇男, 等. 酶解血粉的单因素和响应面条件的优化[J]. 饲料工业, 2017, 38(15): 48–54.
- WANG Y, YI CX, WEN QN. Optimization of condition of the single factor and the response surface of the hydrolytic enzyme [J]. Feed Ind, 2017, 38(15): 48–54.
- [26] 杨万根, 王卫东, 孙会刚, 等. 复合酶水解猪血红蛋白制备富血红素多肽[J]. 食品科学, 2011, 32(6): 7–10.
- YANG WG, WANG WD, SUN HG. Preparation of heme-rich polypeptides from porcine hemoglobin by enzymatic hydrolysis [J]. Food Sci, 2011, 32(6): 7–10.
- [27] 于美娟, 马美湖, 单杨, 等. 采用两酶复合水解猪血红蛋白(Hb)制备水解蛋白的研究[J]. 食品科学, 2007, (1): 196–200.
- YU MJ, MA MH, SHAN Y. Study on preparation of hemoglobin hydrolysates with combinative enzymes [J]. Food Sci, 2007, (1): 196–200.
- [28] 付彩霞. 梅花鹿血的蛋白酶水解及水解产物的抗衰老功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- FU CX. Studies on enzymatic hydrolysis of sika deer blood and anti-aging activity of hydrolysate [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.

(责任编辑: 王 欣)

## 作者简介



刘元林, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全与检测分析。  
E-mail: 1056004130@qq.com



柏家林, 博士, 教授, 主要研究方向为功能基因组学与动物分子育种、生物技术。  
E-mail: jlbai@xbmu.edu.cn